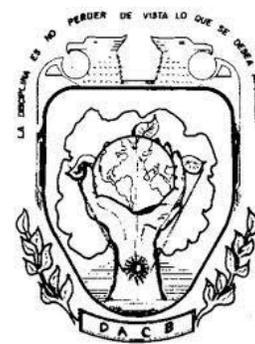




UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
División Académica de Ciencias Biológicas



**“CONSORCIOS BACTERIANOS PRODUCTORES DE
BIOSURFACTANTES BAJO CONDICIONES DE CULTIVO
SÉSILES”**

Trabajo recepcional, en la modalidad de:

Tesis

Para obtener el título en:

Licenciatura en Ingeniería Ambiental

Presenta:

Rogelio Arias Sastré

Directores:

Dra. Susana del Carmen de la Rosa García
Dra. Erika Escalante Espinosa

Consortios Bacterianos Productores De Biosurfactantes Bajo Condiciones De Cultivo Sésiles

Por Rogelio Arias Sastre

CANTIDAD DE PALABRAS 19923

HORA DE ENTREGA

01-JUL-2025 02:02P. M.

NÚMERO DE
IDENTIFICACIÓN DEL
TRABAJO

117018724

Consortios Bacterianos Productores De Biosurfactantes Bajo Condiciones De Cultivo Sésiles

INFORME DE ORIGINALIDAD

2%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Internet	80 palabras — 1%
2	educapes.capes.gov.br Internet	63 palabras — < 1%
3	www.revistadelcentrodegraduados.com Internet	60 palabras — < 1%
4	bdigital.unal.edu.co Internet	35 palabras — < 1%
5	riaa.uaem.mx:8080 Internet	26 palabras — < 1%
6	www.scielo.org.mx Internet	21 palabras — < 1%
7	pt.scribd.com Internet	17 palabras — < 1%
8	core.ac.uk Internet	15 palabras — < 1%
9	eprints.uanl.mx Internet	15 palabras — < 1%

10 riaa.uaem.mx Internet 15 palabras — < 1%

11 www.redalyc.org Internet 15 palabras — < 1%

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS < 15 PALABRAS

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN

JUNIO 18 DE 2019

C. ROGELIO ARIAS SASTRÉ
PAS. DE LA LIC. EN ING. AMBIENTAL
PRESENTE

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se les autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis denominado: **"CONSORCIOS BACTERIANOS PRODUCTORES DE BIOSURFACTANTES BAJO CONDICIONES DE CULTIVO SÉSILES"**, asesorado por la Dra. Susana del Carmen de la Rosa García y Dra. Erika Escalante Espinosa, sobre el cual sustentará su Examen Profesional, cuyo jurado está integrado el Dr. Idefonso Jesús Díaz Ramírez, M. en C. Reyna Lourdes Fócil Monterrubio, Dra. Susana del Carmen de la Rosa García, Dra. Liliana Pampillón González y Q.B.P. Leonardo García Hernández.

ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCION EN LA FE


DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR

C.c.p.- Expediente del Alumno.
Archivo.

UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis denominado: **“CONSORCIOS BACTERIANOS PRODUCTORES DE BIOSURFACTANTES BAJO CONDICIONES DE CULTIVO SÉSILES”**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el Día 18 de Junio de 2019

AUTORIZO

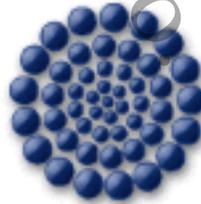


ROGELIO ARIAS SASTRÉ

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología Aplicada de la División Académica de Ciencias Biológicas (DACBIOL) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) bajo la dirección de la **Dra. Susana del Carmen de la Rosa García**.



Financiado en el marco de los proyectos **Prodep 2017** clave "Producción de biosurfactantes por consorcios bacterianos en condiciones de cultivo planctónico y sésiles" PTC-UJAT-257, y **Ciencia Básica 2016** "Producción de biosurfactantes por consorcios bacterianos en condiciones de cultivo planctónico y sésiles" **No. 283643**.



SEP • CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

M É X I C O 

Agradezco enormemente el apoyo brindado mediante la beca otorgada por el Prodep.

Agradecimientos

Son muchas las personas que han contribuido en este logro, desde el inicio hasta la culminación. Es por ello que quiero agradecer, antes que nada, a mi mamá, sin tus esfuerzos no habría podido llegar a ser quien soy ahora, así que todos mis logros también te pertenecen.

A mi hermana, gracias por apoyar mis decisiones, alentarme a salir adelante, sin tu apoyo y el de nuestra madre no habría llegado a este punto.

A mi asesora la Dra. Susana, por confiar en mis capacidades, por el tiempo y dedicación invertida, así como por los conocimientos aportados en esta investigación. Al Dr. Sergio, sin sus consejos y conocimiento aportado a este trabajo no habría logrado finalizar.

A mis compañeros de laboratorio, quienes estuvieron apoyándome en ciertas etapas de los experimentos, por los momentos de diversión y por todos los demás momentos de convivencia dentro del laboratorio.

A mis amigos, ustedes saben que forman parte importante también, sin ustedes, el proceso de la vida universitaria habría sido muy aburrido. A quienes aportaron de sus conocimientos y a quienes estuvieron en los momentos en los que quería rendirme, dándome ánimos, haber llegado a este punto también es gracias a ustedes.

A todas las demás personas que estuvieron apoyándome a lo largo de este camino, gracias.

De todo corazón, gracias.

Rogelio Arias Sastré

RESUMEN

Las bacterias halotolerantes se han adaptado a diferentes condiciones a través de mecanismos como la expresión de metabolitos con actividad biosurfactantes (BS) y bioemulsificantes (BE), que tienen una gran aplicación en las industrias y la biorremediación. En este trabajo, se evaluó el potencial biosurfactante (mediante la técnica de gota colapsada) y bioemulsificante (mediante el índice de emulsificación IE₂₄) de 44 cepas halotolerantes recuperadas de suelo contaminado con hidrocarburos y un cenote prístino. Se seleccionaron diez cepas que cumplieron con los criterios de halotolerancia $\geq 5\%$, capacidad para formar biopelículas, con IE₂₄ superior al 50% y una gota colapsada ≥ 4 mm. Los ensayos de compatibilidad permitieron elegir cinco cepas compatibles (8c, 20a, 51, 59a y 66), a las cuales se les realizaron cinéticas para determinar el tiempo de mayor producción BS y BE, bajo condiciones planctónicas y sésiles. Con las cinco cepas activas se elaboraron tres consorcios, C1 (8c, 20a y 66) C2 (8c, 20a, 59a y 66) y C3 (8c, 20a, 51, 59a y 66) y se evaluó nuevamente la actividad BS y BE. Los resultados de la actividad BS y BE bajo condiciones planctónicas y sésiles, mostraron que los consorcios no superaron la actividad BS y BE de los cultivos puros; sin embargo, los tres consorcios son capaces de mantener un índice de emulsificación mayor al 55% después de un mes, en condiciones planctónicas; este resultado es mayor que el de los cultivos puros y que los resultados obtenidos en condiciones sésiles, por lo que demuestra el potencial uso de estas cepas para aplicaciones biotecnológicas.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	4
3. ANTECEDENTES	5
3.1 SURFACTANTES.....	5
3.2 BIOSURFACTANTES (BS) Y BIOEMULSIFICANTES (BE)	6
3.3 HALOTOLERANCIA Y BIOPELÍCULA	10
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS	14
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	14
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
6. DIAGRAMA EXPERIMENTAL	15
7. METODOLOGÍA	16
7.1 REACTIVACIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES:.....	16
7.2 SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES Y BIOEMULSIFICANTES:	16
7.2.1 ENSAYO DE HALOTOLERANCIA:	16
7.2.2 PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULAS:	16
7.2.3 PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES:.....	17
7.2.3.1 ACTIVIDAD EMULSIFICANTE (ÍNDICE DE EMULSIFICACIÓN IE_{24}):.....	17
7.2.3.2 ACTIVIDAD BIOSURFACTANTE POR LA TÉCNICA DE LA GOTA COLAPSADA:	17
7.3 ENSAYOS DE COMPATIBILIDAD:	18
7.4 CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES BAJO CONDICIONES DE CULTIVO PLANCTÓNICAS: 18	
7.5 PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES Y BIOEMULSIFICANTES BAJO CONDICIONES DE CULTIVO SÉSIL: 18	
7.6 ACTIVIDAD BIOSURFACTANTES DE LOS CONSORCIOS:	19
7.6.1 CONSORCIOS EN CONDICIONES DE CULTIVO PLANCTÓNICAS:	19
7.6.2 CONSORCIOS EN CONDICIONES DE CULTIVO SÉSILES:.....	19
7.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD EMULSIFICANTE EN DIVERSOS SUSTRATOS HIDROFÓBICOS:	20
7.8 CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOSURFACTANTES:	20
7.8.1 ACTIVIDAD HEMOLÍTICA EN PLACA:.....	20
7.8.2 DETERMINACIÓN DE CARGA IÓNICA:	20
7.9 ANÁLISIS DE LOS DATOS:.....	21
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
8.1 HALOTOLERANCIA:	23
8.2 BIOPELÍCULA:.....	25

8.3 ACTIVIDAD EMULSIFICANTE:.....	26
8.4 ACTIVIDAD BIOSURFACTANTE:	29
A) HEMÓLISIS.....	29
B) GOTA COLAPSADA.....	29
8.5 NATURALEZA DE LAS CARGAS IÓNICAS DE LOS SOBRENADANTES LIBRES DE CÉLULAS (SLC)	31
8.6 SELECCIÓN DE LAS CÉPAS ACTIVAS:.....	32
8.7 ENSAYOS DE COMPATIBILIDAD:	34
8.8 CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE BS/BE:.....	36
8.9 CONSORCIOS BACTERIANOS EN CONDICIONES DE CULTIVO PLANCTÓNICO:.....	41
8.10 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD EMULSIFICANTE EN DIVERSOS SUSTRATOS HIDROFÓBICOS:	44
8.11 CINÉTICAS DE LOS CONSORCIOS BACTERIANOS EN CONDICIONES DE CULTIVO SÉSIL:	45
8.12 CARACTERIZACIÓN:.....	47
A) HEMOLÍTICA BIOSURFACTANTE.....	47
8.13 DENDROGRAMA DE SIMILITUD:.....	48
9. CONCLUSIONES.....	51
10. PERSPECTIVAS.....	53
11. BIBLIOGRAFÍA.....	54
12. ANEXOS.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Estructura esquemática de un surfactante aniónico (Genapol LRO, lauril éter sulfato de sodio), para ilustrar la forma de una molécula anfifílica (recuperado de López-Ramírez *et al.*, 2016)..... 5
- Figura 2. Estructura química de los biosurfactantes más estudiados: a) Ramnolípido; b) Soforolípido; c) Surfactina y d) Emulsan (recuperado de Santos et al., 2016)..... 8
- Figura 3. Cuantificación durante el ensayo de formación de biopelícula *in vitro* en placas de 96 pozos. 26
- Figura 4. Ensayo de Agar Azul, actividad de las cepas aniónicas (halos azul intenso). SDS como control positivo..... 32
- Figura 5. Cultivos en agar soya tripticaseína de las 10 cepas más activas 33
- Figura 6. Ensayo de Compatibilidad en placa vaciada en AST, en la placa vaciada de las cepas; a) 8a y b), 59 a, donde se observa que la cepa 35 inhibe a ambas cepas. 35
- Figura 7. Cinética de crecimiento, de las cinco bacterias seleccionadas..... 37
- Figura 8. a) 59a, b) 51, c) 8c, d) 20a, e) 66. (1) Gráficas del índice de emulsificación, pH y gota colapsada, evaluadas durante las cinéticas de crecimiento de las cinco cepas. (2) Emulsificaciones de las cepas evaluadas durante la cinética de crecimiento y estabilidad en el tiempo. 40
- Figura 9. Cinética de crecimiento, pH y evaluación de la producción de BS por el ensayo de Gota Colapsada (GC), de los consorcios bacterianos..... 42
- Figura 10. a) C1, b) C2, c) C3. (1) Gráficas del índice de emulsificación, pH y gota colapsada, evaluadas durante las cinéticas de crecimiento de los consorcios. (2) Emulsificaciones de los consorcios evaluadas durante la cinética de crecimiento y estabilidad en el tiempo. 43
- Figura 11. Actividad Hemolítica en placa de Agar Sangre, de las cinco cepas seleccionadas y los tres consorcios. 48
- Figura 12. Dendrograma del ensayo de Gota Colapsada. (P = Planctónico; S = Sésil).. 49
- Figura 13. Dendrograma del ensayo de emulsificación. (P = Planctónico; S = Sésil). 50

ÍNDICE DE TABLAS

○ Tabla 1. Tipos de biosurfactantes producidos por diversas bacterias.	7
○ Tabla 2. Cepas halotolerantes formadoras de biopelículas, seleccionadas por mayor actividad biosurfactante y bioemulsificante	34
○ Tabla 3. Matriz del ensayo de compatibilidad de las 10 cepas seleccionadas.....	35
○ Tabla 4. Índices de emulsificación (con hexadecano) de las cepas individuales, obtenidos durante la cinética de crecimiento durante 120 h.....	38
○ Tabla 5. Estabilidad de las emulsiones producidas por las cepas solas después de un mes.....	39
○ Tabla 6. Consorcios bacterianos elaborados	41
○ Tabla 7. Cinética de emulsificación de los consorcios bacterianos bajo condiciones de cultivo planctónico	42
○ Tabla 8. Ensayo de emulsificación con diferentes sustratos	45
○ Tabla 9. Actividad BS/BE de las cepas seleccionadas cultivadas bajo condiciones sésiles después de 48h de incubación.	47
○ Tabla 10. Índices de emulsificación del consorcio C1, obtenidos durante la cinética de crecimiento en cultivo sésil, a diferentes horas.	47
○ Tabla 11. Actividad beta hemolítica de las cepas individuales y de los consorcios.	48

ÍNDICE DE ANEXOS

○ Anexo 1. Descripción morfológica de las 44 cepas.	63
○ Anexo 2. Características de las 44 cepas para la selección de las cepas potenciales. ...	65
○ Anexo 3. Estabilidad de las emulsificaciones.	67
○ Anexo 4. Datos usados para el análisis estadístico de los ensayos de Gota Colapsada e Índice de Emulsificación.	68

1. INTRODUCCIÓN

La actividad industrial causa una gran perturbación al medioambiente (Boulakradeche *et al.*, 2015). Indudablemente, los derrames por hidrocarburos son los que más impactan a muchos ambientes y cadenas tróficas. La primera alternativa para la remediación de estos sitios impactados es el uso de compuestos de superficie activa denominados como tensoactivos o surfactantes (Mao *et al.*, 2015).

El problema es que los surfactantes representan una solución momentánea y parcial, ya que son compuestos químicos derivados del petróleo que causan efectos negativos al ambiente, por su elevada persistencia y dificultad para ser degradados (Van Hamme *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2013). A pesar de esto, para el año 2015 la demanda mundial de los surfactantes ascendió aproximadamente a 30.65 billones de dólares (USD), con un crecimiento anual del 4.4%, y para el 2021 se espera que se alcancen los 39.69 billones de dólares (USD), (Acmite, 2013). De seguir esta tendencia, los surfactantes provocarán un mayor impacto en el ambiente, del que pueda mitigarse.

Por tal motivo, es necesario un cambio global en el uso de compuestos con las mismas funciones, pero amigables con el medioambiente, como los biosurfactantes (BS) y bioemulsificantes (BE). A pesar de que los surfactantes son más comercializados debido a su bajo costo (Banat *et al.*, 2010), para el 2011 la demanda mundial de biosurfactantes fue de 1.7 billones de dólares (USD), y se espera incremente a 2.2 billones de dólares (USD) al 2018 (Material & Trends, 2012).

Los BS y BE son compuestos resultado del metabolismo microbiano, y su función está determinada por su peso molecular. Los BS se caracterizan por tener un peso molecular bajo y actúan reduciendo la tensión superficial entre dos fases (Bognolo, 1999), lo que permite que los microorganismos que los producen puedan crecer en una variedad de sustratos inmiscibles en agua. Estructuralmente son muy diversos y tienen funciones, como detergencia, dispersión, formación de espuma,

humectación y solubilización de compuestos hidrófobos, especificidad en condiciones de altas temperaturas, pH y salinidad (Satpute *et al.*, 2010; Banat *et al.*, 2010; Perfumo *et al.*, 2010). Son altamente selectivos, tienen baja toxicidad y alta biodegradabilidad, que los hace compatibles con el medio ambiente. Además de otras múltiples propiedades, tales como su actividad antimicrobiana, antiviral, antifúngica. En contraste, los BE son de alto peso molecular, y son de suma importancia, porque son capaces de estabilizar las emulsiones por largos periodos de tiempo (Bach & Gutnick, 2004).

Es por ello que durante mucho tiempo se han estudiado múltiples microorganismos como bacterias y hongos, capaces de producir estos compuestos. Entre los géneros más reportados en la literatura se encuentran *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. (Gottfried *et al.*, 2010; Barros *et al.*, 2013). Estos pueden encontrarse en dos estados, como bacterias de vida libre o libre flotación (planctónicas) y en biopelículas (sésil), siendo esta última la forma predominante en la naturaleza (Costerton *et al.*, 1978; Nikolaev & Plakunov, 2007). Dicho esto, las biopelículas por lo regular están conformadas por diferentes colonias de microorganismos adheridos a una superficie, que a su vez representan consorcios multispecies, aunque también pueden encontrarse biopelículas conformadas por colonias de un mismo microorganismo (Sturman *et al.*, 1994). En los procesos de formación de las biopelículas, los BS participan en el proceso de adherencia celular y son necesarios para su establecimiento sobre distintas superficies (Sutherland, 2001; Branda *et al.*, 2005).

Algunos de estos ambientes donde se establecen los microorganismos, están sometidos a ciertas condiciones estresantes. Factores abióticos adversos como la alta salinidad, pH o temperatura, solo permiten la proliferación de microorganismos que han logrado adaptarse a dichas condiciones a través de diversos mecanismos como la expresión de metabolitos secundarios como los BS o la formación de biopelículas, así como la regulación de la osmolaridad (Gordon & Millero, 1984; Nikolaev & Plakunov, 2007). Las bacterias halotolerantes son un ejemplo de bacterias que se han adaptado a condiciones de estrés, ya que son capaces de

crecer en intervalos de salinidad alta y producen diversos metabolitos (Macleod, 1965; Meseguer, 2004).

Sin embargo, no hay muchos reportes sobre el efecto de las condiciones sésiles en la producción de estos metabolitos, comparándolas con las condiciones planctónicas, por lo que es importante estudiar si hay una mayor producción de los compuestos extracelulares, cuando las condiciones son lo más parecidas a las naturales (sésiles).

Tomando en cuenta todas estas estrategias de adaptación que tienen los microorganismos halotolerantes formadores de biopelículas, en este trabajo se seleccionaron de bacterias halotolerantes capaces de formar biopelículas *in vitro* para conformar consorcios bacterianos compatibles que, bajo condiciones de cultivo sésiles, produzcan una mayor cantidad de BS y BE estables. Los resultados obtenidos en este trabajo tienen aplicación en diferentes campos de la biotecnología, como las biomédicas, alimentaria, biorremediación, así como la Recuperación Asistida del Petróleo vía Microbiana (MEOR).

2. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, la ideología sobre el cuidado del medio ambiente se ha extendido por todo el mundo. Los esfuerzos de la comunidad científica por descubrir o inventar nuevos métodos, tecnologías o productos que sean ambientalmente amigables, ha llevado al estudio exhaustivo en la producción de biosurfactantes que sustituyan a la gran demanda del mercado actual de surfactantes sintéticos. Como resultado, la búsqueda de cepas bacterianas productoras de compuestos biosurfactantes capaces de reducir la tensión superficial entre fases inmiscible y de formar bioemulsificaciones estables (Santos *et al.*, 2016), se ha extendido a diversos sustratos y hábitats. En este sentido, la bioprospección de sitios sometidos a condiciones de estrés, resulta en una opción muy prometedora para la búsqueda de microorganismos con este potencial biotecnológico (de Pascale *et al.*, 2012).

El estudio de microorganismos halotolerantes en lugares poco explorados, puede ser una opción viable, ya que las condiciones de su entorno los han llevado a producir compuestos que les permitan sobrevivir, adaptarse y colonizar esos ambientes (Agwu & Oluwagunke, 2014). En ese aspecto, la capacidad para formar biopelículas es una condición sésil que les permite a los microorganismos establecerse y formar comunidades complejas (consorcios) exitosas en ambientes hostiles (Sutherland, 2001). Por lo tanto, la capacidad de los microorganismos para la producción de metabolitos biosurfactantes y bioemulsificantes bajo condiciones extremas es altamente apreciada en la biorremediación. Sin embargo, muy poco se conoce sobre microorganismos halotolerantes formadores de biopelículas que sean capaces de expresar ambas características: biosurfactantes y bioemulsificantes. De acuerdo a lo anterior, en este estudio se seleccionaron bacterias halotolerantes con capacidad dual biosurfactantes/bioemulsificantes para conformar consorcios bacterianos en condiciones de cultivo planctónicos y séviles.

3. ANTECEDENTES

3.1 Surfactantes

La actividad industrial ha causado grandes perturbaciones en diferentes ambientes debido a los desechos que son liberados de manera accidental o deliberada (Boulakradeche *et al.*, 2015). En este sentido, el claro ejemplo son los derrames de hidrocarburos al ambiente. La remediación de estos sitios impactados por diversos contaminantes se ha facilitado con el uso de compuestos de superficie activa (surfactantes) o tensoactivos (Mao *et al.*, 2015).

Los surfactantes son compuestos químicos que tienen la característica de ser moléculas anfifílicas o anfipáticas, que se componen de una parte hidrofílica (cabeza) y una parte hidrofóbica (cola) (Fig. 1), clasificándose en diversos grupos dependiendo de sus cargas: iónicos (aniónicos y catiónicos), no iónicos y zwitteriónicos (Ying, 2006; Ivanković & Hrenović, 2010). Estas características les otorgan propiedades como, reducir la tensión superficial de las diferentes fases, así como la capacidad de emulsificar sustratos insolubles, al mismo tiempo que, ayudan a que los compuestos se encuentren biodisponibles para su degradación, aumentando la solubilidad de los mismos (Gautam & Tyagi, 2006).

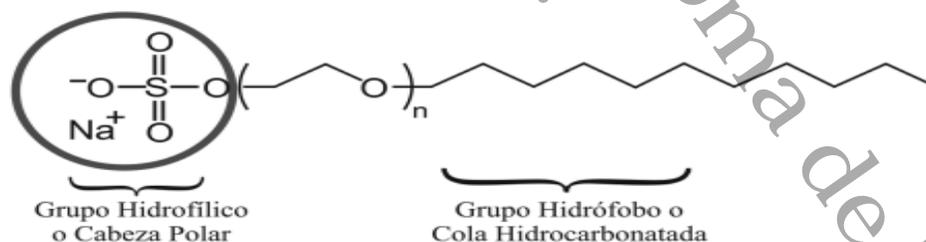


Figura 1. Estructura esquemática de un surfactante aniónico (Genapol LRO, lauril éter sulfato de sodio), para ilustrar la forma de una molécula anfifílica (recuperado de López-Ramírez *et al.*, 2016).

Parámetros como la concentración micelar crítica (CMC) y el balance hidrofílico-lipofílico (HLB) también son usados para determinar el potencial de los surfactantes (Van Hamme *et al.*, 2006). La CMC indica la concentración de surfactante mínima para que se formen agregados o micelas y corresponde al punto en el que el tensoactivo logra el punto más bajo y estable de tensión superficial. Por debajo de

estos valores el surfactante se encuentra en forma de monómero y por arriba de ellos se da una mayor formación de micelas que otorga una mayor solubilización de los compuestos (Campos *et al.*, 2013; Ishiguro & Koopal, 2016). Por otra parte, la HLB es un valor que representa la capacidad del surfactante para formar emulsiones estables en sistemas agua-aceite o aceite-agua (Griffin, 1949; Islas *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2013).

Dadas estas propiedades, los surfactantes han sido utilizados en diferentes industrias y se han vuelto una parte importante para la desorción de compuestos químicos en el suelo y otros ambientes (Mulligan *et al.*, 2001; Burgos-Díaz, 2012). No obstante, las desventajas que presentan los surfactantes se deben a su elevada toxicidad, persistencia y dificultad para ser degradados (Van Hamme *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2013). Un ejemplo de esto sería el ácido perfluorooctanoico, que es un compuesto ampliamente distribuido en el ambiente, además de ser persistente en el suelo y mostrar efectos carcinogénicos en animales (Paustenbach *et al.*, 2007). Por esa razón, el interés en utilizar productos amigables con el ambiente ha resultado en la investigación y descubrimiento de compuestos producidos por microorganismos (BS y BE).

3.2 Biosurfactantes (BS) y Bioemulsificantes (BE)

Los BS y BE son compuestos resultado del metabolismo microbiano. Al igual que los surfactantes, estos compuestos también son moléculas anfífilas (Banat *et al.*, 2010), que son metabolitos secundarios producidos al final de la fase logarítmica o en la fase estacionaria de crecimiento (Dhiman *et al.*, 2016). El uso de los términos BS y BE aún no queda muy claro, algunos autores los usan indistintamente, mientras que otros han puntualizado en sus definiciones. A pesar de dichas discusiones sobre terminología, los BS son moléculas capaces de reducir la tensión superficial (algunos muestran propiedades emulsificantes), mientras que los BE son capaces de formar emulsiones estables, pero no logran un cambio en la tensión superficial. Por otro lado, hay cepas capaces de producir moléculas con ambas propiedades por lo que son de mayor interés industrial (Uzoigwe *et al.*, 2015).

En este sentido, los BS y BE se clasifican generalmente en dos categorías según su estructura química, los BS son de bajo peso molecular, mientras que los BE son los de alto peso molecular (Bognolo, 1999; Bach & Gutnick, 2004). La mayor parte de los BS son aniónicos y neutros, mientras que aquellos con grupo amino son catiónicos (Santos *et al.*, 2016). También han sido clasificados por su estructura química y origen microbiano (Tabla 1; Fig. 2).

Tabla 1. Tipos de biosurfactantes producidos por diversas bacterias.

Biosurfactante		Microorganismo	Referencia
Grupo	Clase	Productor	
	Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas</i> spp.	(Dhiman <i>et al.</i> , 2016)
Glicolípidos	Trehalolípidos	<i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Corynebacterium</i> y <i>Rhodococcus</i>	(Perfumo <i>et al.</i> , 2010)
	Soforolípidos	<i>Candida bambicola</i> <i>Candida apicola</i> <i>Rhodotorula bogoriensis</i>	
Lipopéptidos		Surfactina, iturina, bacilomicina etc.	(Dhiman <i>et al.</i> , 2016; Jha <i>et al.</i> , 2016)
Fosfolípidos		Fosfatidiletanolamina	(Desai & Banat, 1997)
Biosurfactantes Poliméricos		Emulsan	(Suthar <i>et al.</i> , 2008)
		Alasan	(Navon-Venezia <i>et al.</i> , 1995)
Ácidos grasos y lípidos neutrales		Ácido Corinomicólico	(Muthusamy <i>et al.</i> , 2008)

Particularmente, los BS son de gran importancia debido a su diversidad estructural y funcional así como sus múltiples propiedades, tales como su actividad antimicrobiana y antiviral, agentes de biocontrol de enfermedades de plantas, alta biodegradabilidad y selectividad, baja toxicidad, compatibilidad con el medio ambiente, detergencia, dispersión, especificidad en condiciones de altas temperaturas, pH y salinidad, formación de espuma, humectación y solubilización.

de compuestos hidrófobos (Satpute *et al.*, 2010; Banat *et al.*, 2010; Perfumo *et al.*, 2010).

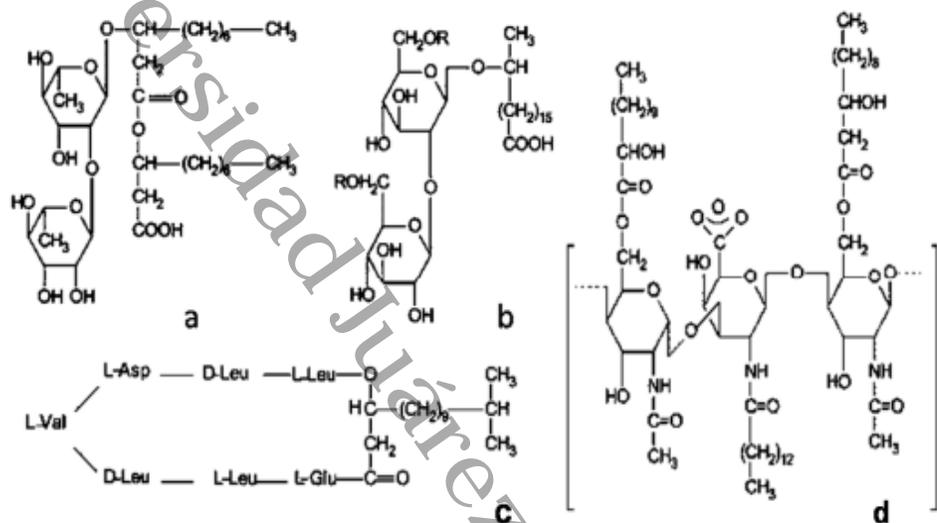


Figura 2. Estructura química de los biosurfactantes más estudiados: a) Ramnolípido; b) Soforolípido; c) Surfactina y d) Emulsan (recuperado de Santos *et al.*, 2016).

Entre los biosurfactantes, los ramnolípidos han sido reportados como uno de los surfactantes más estudiados para su uso en procesos industriales. Los ramnolípidos son biosurfactantes producidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*. Estos reducen la tensión superficial e interfacial y ofrecen excelentes propiedades como emulsificación y solubilización (Desai & Banat, 1997; Maier & Soberón-Chávez, 2000). Por otra parte, los lipopéptidos, producidos por una variedad de *Bacillus sp.* han sido reportados como los mejores en la reducción de la tensión superficial, así como con un alto potencial para aplicaciones de control biológico (Liu *et al.*, 2015; Dhiman *et al.*, 2016).

La principal desventaja de los BS y BE con su contraparte sintética es debido a los altos costos de producción a escala industrial (Banat *et al.*, 2010); sin embargo, pueden ser producidos a partir de sustratos de desecho, lo que ayuda a reducir el costo de producción y la reutilización de dichos desechos como estrategia ambiental (Das & Mukherjee, 2007).

No obstante, el potencial de estos compuestos en aplicaciones industriales sigue ganando terreno. Su uso en la industria del petróleo como una alternativa en la recuperación de petróleo, técnica conocida como Recuperación Asistida del Petróleo vía Microbiana (MEOR), combustibles basados en emulsiones, transporte del petróleo facilitado por emulsiones, limpieza de aceites en los tanques, así como beneficiar en las técnicas de biorremediación (Banat *et al.*, 2000; Bach & Gutnick, 2004). Un caso exitoso en la técnica de MEOR fue reportado por Li *et al.*, (2002) para el yacimiento petrolífero Daqing, el cual es el yacimiento petrolífero más grande de China. En este estudio se usó a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (P-1) y sus productos metabólicos, los cuales redujeron la viscosidad del aceite en un 38.5%, además fue reportado que el 80% de los pozos mostraron un incremento en la producción de petróleo y se observó una recuperación de petróleo del 11%. Por otro lado, algunos estudios sobre aplicaciones en las técnicas de biorremediación demuestran el potencial de los BS y BE. Rahman *et al.*, (2002) llevaron a cabo un estudio *ex situ* de la biorremediación de un suelo contaminado con gasolina, en el cual el tratamiento adicionado con un biosurfactante producido por la bacteria *Pseudomonas* sp. DS10-129, identificado como un ramnolípido, obtuvo la mayor tasa de degradación con 67% y 78% a concentraciones del 0.1 y 1% del BS respectivamente. Asimismo, Cameotra y Singh (2008) reportan eficiencias de degradación (después de 5 semanas) arriba del 91% para un suelo contaminado con petróleo proveniente de Ratnagiri, India, usando un consorcio microbiano. Pero cuando a uno de los tratamientos se le agregó una mezcla de biosurfactante, la eficiencia de degradación aumentó por arriba del 98%.

Por otro lado, dada las duras condiciones que se presentan en las reservas de petróleo como alta temperatura, salinidad, presión, falta de oxígeno y posible toxicidad por los compuestos presentes en el sitio, es necesaria la búsqueda de microorganismos capaces de tolerar dichas condiciones y que además expresen actividad BS y BE (Dastgheib *et al.*, 2008).

Es por ello que el interés en estos compuestos sigue en aumento y la búsqueda de nuevos microorganismos mejores adaptados a estas condiciones, continúa. Por esa razón, el aislamiento e identificación de nuevas cepas provenientes de sitios sometidos a condiciones de estrés para los microorganismos, es una estrategia para estudiar la producción de metabolitos secundarios y los mecanismos de adaptación de los mismos en estos ambientes.

3.3 Halotolerancia y Biopelícula

Existen en el mundo microorganismos capaces de desarrollarse en ambientes extremos con elevadas concentraciones de sal. La salinidad de sistemas costeros y estuarinos, varía considerablemente como resultado de la escorrentía, lluvia o el flujo de agua desde ríos. La salinidad afecta fuertemente a los organismos acuáticos; algunas bacterias exhiben ciertos tipos de cambios morfológicos cuando la salinidad incrementa arriba del 5%, y mayores incrementos afectan la reproducción (McArthur, 2006). En adición, se conoce que la diversidad microbiana decrece con el aumento en la salinidad (Jiang *et al.*, 2006). Por lo tanto, microorganismos habitando estos ambientes desarrollaron estrategias de osmoadaptación para hacer frente a tales fluctuaciones en la salinidad (Welsh, 2000).

Estos microorganismos pueden catalogarse como halófilos o halotolerantes; de manera más específica, los halófilos dependen de altas concentraciones de sal para realizar funciones metabólicas y reproducirse de manera más eficaz, que en ausencia de ella. Los halófilos ligeros o débiles crecen con una concentración de NaCl que oscila entre 0.2-0.85 M (2-5%); los halófilos moderados, con 0.85-3.4 M (5-20%) de NaCl y los halófilos extremos con 3.4-5.1 M (20-30%) de NaCl (González-Hernández & Peña, 2002). Por otra parte, los organismos no halófilos crecen por debajo de 0.2 M de NaCl. En contraste, los organismos halotolerantes habitualmente viven mejor sin sal; no obstante, admiten cierta concentración en su medio ambiente siendo capaces de crecer en altas concentraciones de sal (Meseguer, 2004). Aquellos que son capaces de crecer aproximadamente arriba del

15% de NaCl (2.5 M), son considerados extremadamente halotolerantes (Margesin & Schinner, 2001).

El creciente interés por microorganismos halotolerantes se debe a su capacidad para crecer en ambientes con fluctuaciones en la salinidad y la producción de compuestos que les permiten sobrevivir en dichas condiciones (Agwu & Oluwagunke, 2014). Dentro de dichos compuestos se pueden encontrar biopolímeros con propiedades BS y BE (Margesin & Schinner, 2001).

Como resultado de la adaptación a las condiciones de estos ambientes, diversos microorganismos han expresado la formación de biopelículas para protegerse de las condiciones adversas de su entorno.

Las bacterias pueden encontrarse en dos estados, como bacterias de vida libre o libre flotación (planctónicas) y en biopelículas (sésil), siendo esta última la forma predominante en la naturaleza (Costerton et al., 1978; Nikolaev & Plakunov, 2007). Las biopelículas son comunidades microbianas de células adheridas a la superficie, introducidas en una matriz polimérica extracelular, que ellas mismas producen (Donlan & Costerton, 2002).

La formación de la biopelícula puede resumirse en tres pasos: adhesión, crecimiento y desprendimiento. En el primer paso, la adhesión reversible e irreversible se lleva a cabo con ayuda de los flagelos, pilis (tipo I y IV) y compuestos de superficie producidos por el microorganismo. Cuando las células en estado planctónico se establecen en una superficie (normalmente en aquellas donde un líquido hace contacto), comienzan a adherirse venciendo las fuerzas de repulsión. Posteriormente, la célula adherida se reproduce y coloniza la superficie formando micro-colonias. A medida que esto ocurre, los microorganismos comienzan a producir exopolisacáridos que constituyen la matriz de la biopelícula y forman estructuras tridimensionales en los cuales se crean canales o conductos (Lasa et al., 2005). Dicho esto, las sustancias exopoliméricas que ayudan en la formación de la biopelícula, son BE, que además otorgan protección contra las condiciones ambientales y la pérdida de agua (Karlupudi et al., 2018). Después, los

colonizadores secundarios aparecen, esto es, microorganismos que se unen a las células localizadas en la superficie (Nikolaev & Plakunov, 2007). Bajo condiciones favorables, este paso de formación de una biopelícula madura, continúa por un tiempo suficiente; bajo condiciones no favorables, la biopelícula entra en su etapa final, desprendimiento, dando inicio a la pérdida de células, así como la liberación de células de flotación libre (células planctónicas), como ha sido demostrado para *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *Vibrio cholerae*, y *P. tunicata* (Webb *et al.*, 2003).

Los microorganismos utilizan la formación de la biopelícula como una estrategia para protegerse de los efectos ambientales (Banat *et al.*, 2014). Factores ambientales y propiedades de las células microbianas pueden afectar la formación de la biopelícula y sus características. Por lo general los factores que tienen un efecto real en la adhesión y formación de biopelículas, son aquellos factores que bajo ciertas condiciones pueden llegar a ser considerados factores estresantes para los microorganismos. Los factores ambientales más importantes a considerar son: pH, salinidad, osmolaridad, accesibilidad a fuentes de carbono, y también la hidrofobicidad entre fases, la fuerza y el tipo de movimiento del líquido en relación con la superficie (Nikolaev & Plakunov, 2007).

Estos factores estresantes inducen la formación y expresión de diversos metabolitos secundarios que les permiten adaptarse y subsistir en dichos ambientes. Un ejemplo claro se da en los procesos de formación de las biopelículas, donde los BS participan en el proceso de adherencia celular y son necesarios para su establecimiento sobre distintas superficies ya que gracias a las propiedades de humectación crean un ambiente adecuado para la adherencia, además de que juegan un rol importante en la solubilización de sustratos haciéndolos biodisponibles para los microorganismos (Sutherland, 2001; Branda *et al.*, 2005; Karlapudi *et al.*, 2018). Otros beneficios que ofrece la biopelícula es la resistencia a los antibióticos y diferentes biocidas (Nikolaev & Plakunov, 2007).

La mayoría de las biopelículas que logran desarrollarse en estos ambientes de manera natural, están compuestas por diversas especies de microorganismos

conformando así consorcios multiespecie, por lo que las biopelículas de una sola especie son muy raras (Sutherland, 2001).

Por lo general, los consorcios microbianos establecen interacciones sinérgicas, lo que les permite realizar funciones que individualmente no podrían lograr. De esta manera, los consorcios microbianos tienen una mayor ventaja a sobrevivir en ambientes con condiciones desfavorables para los microorganismos.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

4. HIPÓTESIS

1. La producción de biosurfactantes con actividad emulsificante estable mejorará cuando las bacterias se encuentran formando consorcios microbianos, comparada con la actividad de las cepas puras.
2. Las condiciones de cultivo sésil para los consorcios, resultan en una mejora en la producción de biosurfactantes y bioemulsificantes, comparados con la producción de estos, en cultivos planctónicos

5. OBJETIVOS

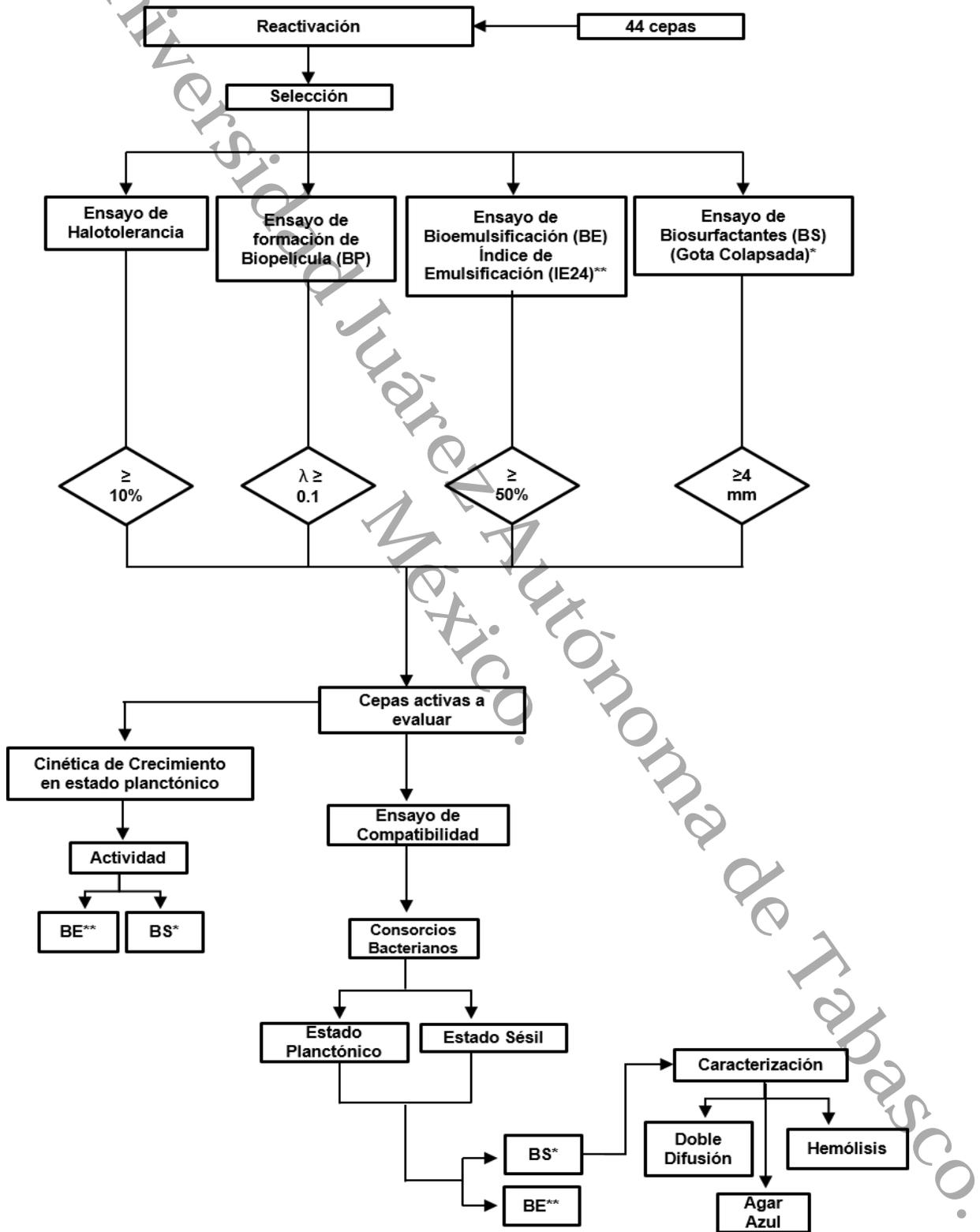
5.1 Objetivo General

Comparar la producción de biosurfactante y bioemulsificante entre consorcios de bacterias halotolerantes bajo condiciones de cultivo sésil y planctónicas con base en las características de actividad surfactante.

5.2 Objetivos Particulares

- Determinar la producción de biosurfactantes y bioemulsificantes de cepas aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos y de cenotes.
- Evaluar la formación de biopelículas por las cepas productoras de biosurfactantes y bioemulsificantes.
- Conformar consorcios bacterianos de cepas seleccionadas con base en los valores más altos de actividad biosurfactante, bioemulsificante y mayor capacidad de formación de biopelículas.
- Evaluar la producción de biosurfactantes y bioemulsificantes de los consorcios en condiciones de cultivo sésiles y planctónicas.

6. DIAGRAMA EXPERIMENTAL



7. METODOLOGÍA

7.1 Reactivación de cepas productoras de biosurfactantes:

El laboratorio de Microbiología Aplicada cuenta con un cepario de microorganismos, aislados de diversos ambientes como son cenotes y suelos contaminados con hidrocarburos, que se encuentran criopreservados en glicerol, en un ultracongelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, de los cuales se reactivaron 44 cepas en Agar Soya Tripticaseína (AST) y se verificó su estado axénico, por morfología colonial y microscópica (tinción de Gram).

7.2 Selección de cepas productoras de biosurfactantes y bioemulsificantes:

7.2.1 Ensayo de Halotolerancia:

Modificando el método de Agwu y Oluwagunke (2014) y Hacène *et al.*, (2004), las cepas se cultivaron en un gradiente de salinidad de 1-20% de NaCl. Para tal efecto, se realizaron pre-cultivos de 24 horas (h) de cada cepa en Caldo Soya Tripticaseína (CST). En placas de 96 pozos, se colocaron por cuadruplicado 100 μL del cultivo adicionado a diferentes concentraciones de sal: 1, 5, 10, 15, 17.5 y 20%. Posteriormente se colocaron 100 μL del cultivo bacteriano en cada pozo. Como control de crecimiento se inocularon las bacterias en CST sin sal. Se seleccionaron aquellas cepas capaces de crecer a una concentración $\geq 5\%$ de NaCl.

7.2.2 Producción de biopelículas:

Se realizó el precultivo de 24 h de cada bacteria y posteriormente en microplacas de 96 pozos se colocaron 100 μL de cada cultivo ajustado a una concentración de 1×10^6 unidades formadoras de colonia (UFC)/mL, y se incubaron a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h, por cuadruplicado. Transcurrido el tiempo, el cultivo fue retirado y se lavaron las microplacas con solución de Buffer Fosfato Salino (PBS); se adicionaron 125 μL de una solución de cristal violeta al 0.1% a cada pozo y se incubaron por 15 min a temperatura ambiente. Las microplacas se lavaron repetidas veces y se dejaron secar a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 125 μL de ácido acético al 30% y se incubaron a temperatura ambiente (TA) por 15 min. Los 125 μL se transfirieron a una microplaca limpia y se cuantificó la cantidad de cristal violeta

por espectrofotometría a una Densidad óptica (DO) de 550 nm; el ácido acético al 30% se usó como blanco (O'Toole, 2011). Se seleccionaron aquellas cepas con una absorbancia ≥ 0.1 .

7.2.3 Producción de biosurfactantes:

Para la selección de aquellas cepas con mayor actividad BS y BE, se reactivaron todas las bacterias en placas de AST, y se inocularon en agitación en CST por 48 h, se centrifugaron a 10,000 rpm (revoluciones por minuto) a 4 °C y el sobrenadante fue filtrado por membranas de denominación de poro de 0.45 μm . Con cada sobrenadante libre de células (SLC) se cuantificó la capacidad emulsificante por el índice de emulsificación de 24 h (IE_{24}) y la actividad biosurfactante por la técnica de gota colapsada.

7.2.3.1 Actividad emulsificante (índice de emulsificación IE_{24}):

Modificando el método de Cooper y Goldenberg (1987), en tubos de ensayo se agregaron 2 mL del SLC de cada bacteria y 2 mL de n-hexadecano, y se mezclaron vigorosamente durante 1 min. La mezcla se dejó reposar 24 h antes de medir la capacidad emulsificante. Las mediciones se realizaron por triplicado, y el valor promedio se usó para calcular el índice de emulsificación (IE_{24}). La actividad emulsificante se define como la altura de la emulsificación dividida por la altura total, expresada en porcentaje, usando la ecuación descrita abajo (Ecuación 1) (Maneerat y Phetrong, 2007). Se seleccionaron aquellas cepas con porcentajes \geq al 50%. Posterior a la medición de las 24 h, se continuó a realizar una nueva medición después de un mes, para determinar la estabilidad de las emulsificaciones.

$$IE_{24} = \frac{\text{Altura de la Emulsificación}}{\text{Altura Total}} \times 100 \quad (\text{Ec.1})$$

7.2.3.2 Actividad biosurfactante por la técnica de la gota colapsada:

En tapas de microplacas de 96 pozos, se depositaron 2 μL de aceite mineral y se dejaron 24 h para su estabilización. Posteriormente, se colocaron 5 μL del SLC y al minuto se inspeccionó el tamaño de la gota y su morfología. Los ensayos se

realizaron por quintuplicado y los resultados se reportaron en mm (Youssef *et al.*, 2004). Se seleccionaron las cepas con medidas \geq a 4 mm.

7.3 Ensayos de Compatibilidad:

Se realizaron los ensayos de compatibilidad de las diez cepas seleccionadas. Para tal efecto, en tubos de ensayo con 10 mL de solución salina se adicionaron y se ajustaron las bacterias a una DO de 1.5 (DO_{600 nm}). Posteriormente, se adicionaron 6 mL de cada cultivo bacteriano en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 45 mL de AST y se vaciaron en tres cajas de Petri (15 mL en cajas Petri). Se colocaron discos de papel filtro y las bacterias seleccionadas fueron sembradas por punto empleando palillos estériles. Las cajas se incubaron a 35 °C por 24 h. Transcurrido el tiempo se observó ausencia o presencia de halos de inhibición (en mm). Resultando compatibles 5 cepas que se usaron para la elaboración de los consorcios (Heatley, 1944; Balouiri *et al.*, 2016).

7.4 Cinética de producción de biosurfactantes bajo condiciones de cultivo planctónicas:

Se realizó la cinética de las cinco bacterias seleccionadas; para tal efecto, se reactivaron las bacterias tomando 100 μ L del cultivo criopreservado y se inoculó en 100 mL de CST, se incubaron a 120 rpm a 35 °C, por 24 h, después el precultivo se ajustó a una DO de 1.5 (DO_{600 nm}), 100 mL del precultivo ajustado se adicionó a 900 mL de CST y se incubó a 120 rpm a 35 °C por 144 h. El seguimiento de la DO a 600nm, y la actividad BE y BS realizó tomando por triplicado alícuotas de 35 mL cada 24 h. La actividad BE y BS se determinó de acuerdo a lo descrito en el numeral 7.2.3.

7.5 Producción de biosurfactantes y bioemulsificantes bajo condiciones de cultivo sésil:

Para este tipo de cultivo, se emplearon botellas de 500 mL con tapa de rosca. Dentro de cada botella fueron depositados 100 mL de AST y se recubrió toda la superficie interna, sobre la capa de agar se colocaron 1 mL de un cultivo de 24 h ajustado a una DO de 1.5 a 600 nm. Las botellas se incubaron por 24 h a 35 °C bajo

condiciones estáticas, transcurrido el tiempo, se adicionaron 200 mL de CST y se incubaron en rotación a 5 rpm en un equipo modulador rotatorio de células (cell roll) por 48 h a 35 °C (Yan *et al.*, 2003). La actividad BS y BE se evaluó a los tiempos de mayor expresión determinadas bajo las condiciones planctónicas.

7.6 Actividad biosurfactantes de los consorcios:

Se realizó una matriz de cultivos multiespecie (consorcios) de las cinco bacterias seleccionadas, en todas las combinaciones posibles. El número de consorcios fueron dependientes de la compatibilidad de las especies y del tiempo en el cual expresaron la mayor cantidad de biosurfactantes y bioemulsificantes. Se realizó la cinética de producción de biosurfactantes con todas las combinaciones de bacterias posibles.

7.6.1 Consorcios en condiciones de cultivo planctónicas:

Para esto, modificando el método de Mukred *et al.*, (2008) se realizó el pre-cultivo de las cinco bacterias, todas se ajustaron a una DO de 1.5 (DO_{600nm}), y se elaboraron consorcios dependiendo la compatibilidad, con tres bacterias diferentes. Se adicionaron 5.0 mL de cada bacteria en un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 180 mL de CST y cada consorcio se incubó a 120 rpm a 35 °C.

La producción de biosurfactantes y bioemulsificantes se determinó a los tiempos óptimos para cada consorcio y los resultados se contrastaron con los resultados obtenidos bajo condiciones sésiles.

7.6.2 Consorcios en condiciones de cultivo sésiles:

Para las condiciones sésiles se usaron las mismas combinaciones que en los consorcios planctónicos, pero se adicionaron 250 µL de cada cultivo a las botellas previamente recubiertas con AST a 35 °C bajo condiciones estáticas, después de 24 h, se adicionaron 200 mL de CST y se incubaron en un equipo modulador rotatorio de células a 5 rpm a 35 °C. Los ensayos se realizaron por triplicado y se tomaron muestras a los tiempos óptimos de cada consorcio. Los resultados se contrastaron con los resultados obtenidos en estado planctónico.

7.7 Evaluación de la actividad emulsificante en diversos sustratos hidrofóbicos:

Para estudiar la habilidad de los compuestos obtenidos de las cepas individuales y consorcios, de formar emulsiones estables, se realizaron pruebas con diferentes sustratos hidrofóbicos. En el ensayo de emulsificación el n-hexadecano fue sustituido por los siguientes compuestos: aceite de motor, aceite de motor quemado, xileno y petróleo crudo (Gudiña *et al.*, 2015).

El ensayo se realizó de acuerdo a la metodología descrita en el numeral 7.2.3.1. Como controles positivos se usaron el Tritón X-100 y el Dodecil sulfato de sodio (SDS) a una concentración del 0.5 %.

7.8 Caracterización de los compuestos biosurfactantes:

7.8.1 Actividad Hemolítica en placa:

Se prepararon placas de agar sangre al 5% (v/v) empleando sangre humana. Previamente, se colocaron en una caja de Petri cuadrada de 10 x 10 cm, 25 cilindros metálicos ubicados equidistantemente entre ellos, se preparó el medio base de agar sangre y se esterilizó. Después, cuando la temperatura estuvo a 50 °C aprox. se le agregó la sangre a una concentración final del (5% (v/v), se agitó y se depositaron 25 mL de agar sangre en cada placa, una vez gelificado el agar se retiraron los cilindros y se colocaron 100 µL de SLC de cada una de las cepas por pozo. Como control positivo (+) se utilizó Tritón X-100 al 1% y CST estéril sin inocular como control negativo (-) (Bodour y Miller-Maier, 1998). Las placas se incubaron a TA por 24 h. La actividad hemolítica se detectó por la presencia de una zona con cambios en la coloración alrededor de la colonia (Carrillo *et al.*, 1996). Se reconocieron tres tipos de hemólisis en función de la coloración del medio, alfa (coloración oscura en tono verdoso), beta (coloración amarillenta o un evidente halo de hemólisis) y gamma en caso de que no se produzcan cambios en el medio (Shah *et al.*, 2016; Obelenwa *et al.*, 2017).

7.8.2 Determinación de carga iónica:

Para las cargas aniónicas se prepararon placas de agar azul empleando agar bacteriológico y se adicionó 0.005 g/L de azul de metileno y 0.2 g/L de CTAB

(Siegmond & Wagner, 1991; Aparna *et al.*, 2012). Se realizaron perforaciones de 8 mm a las placas con ayuda de cilindros metálicos, en cada pozo se colocaron 100 μ L de SLC, como control positivo (+) y negativo (-) se emplearon Tritón al 1% y CST estéril, respectivamente. Las placas se incubaron por 24 h a TA para después observar la aparición de halos de coloración azul intenso o morado como indicadores de la presencia de biosurfactantes aniónicos. Por otra parte, la determinación de las cargas catiónicas de los metabolitos tensoactivos se realizó mediante la técnica de doble difusión en agar azul. El agar azul se preparó usando agar bacteriológico adicionado con 0.005 g/L de azul de metileno. Las placas con agar azul se perforaron con ayuda de cilindros metálicos de 8 mm, considerando distancias de 0.3 cm entre los pozos dobles y de 1.5 cm entre muestra. En el primer pozo se colocarán 100 μ L de SLC y en el segundo pozo 100 μ L de una solución del detergente aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS) 20 mM. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 24 h y se registró como resultado positivo a la presencia de una zona con precipitación entre los pozos dobles (Saranya *et al.*, 2015).

7.9 Análisis de los datos:

A los resultados de la producción de biosurfactantes y bioemulsificantes bajo condiciones planctónicas y sésiles en cultivos puros y consorcios, se comprobó si cumplían con los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianza de los datos, para posteriormente realizar un análisis de varianza (ANDEVA) con un criterio de clasificación, además de comparaciones múltiples con la prueba de Tukey para detectar la significancia de las posibles diferencias en la actividad biosurfactante y bioemulsificante entre los cultivos solos y en consorcios bajo condiciones planctónicas y sésiles.

Para los ensayos de actividad biosurfactante y emulsificación, se realizó un análisis multivariado de agrupamiento para delimitar los grupos de mayor eficiencia, en función de los valores de emulsificación y gota colapsada. El análisis se realizó utilizando un algoritmo de grupo pareado (UPGMA) con su índice de similitud euclidiana con el software PAST versión 3.23 (Hammer *et al.*, 2001).

	VARIABLES INDEPENDIENTES	VARIABLES DEPENDIENTES
5 BACTERIAS	CULTIVO PLANCTÓNICO	Bacterias Individuales Conorcios
	CULTIVO SÉSIL	Bacterias Individuales Conorcios
		Actividad Biosurfactante y Bioemulsificante

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

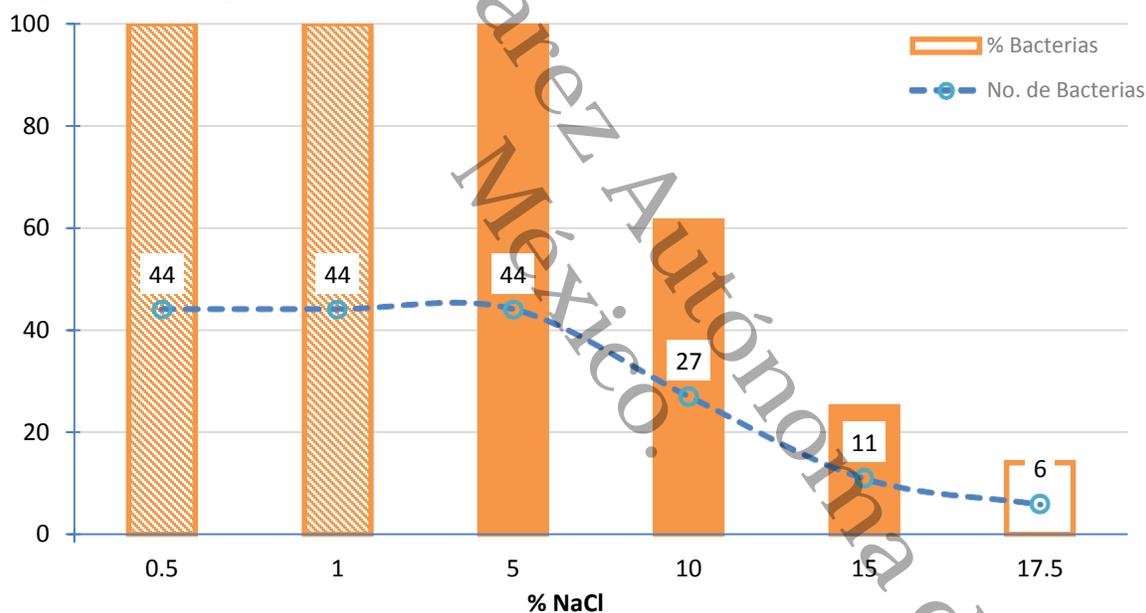
Las cepas se reactivaron de una colección de bacterias perteneciente al laboratorio de Microbiología Aplicada, se describieron las características morfológicas de las colonias en medio AST (Anexo 1) y se verificó la pureza de los cultivos por tinción de Gram. Las 44 cepas usadas en este trabajo son capaces de crecer a una salinidad igual o superior al 5%, por lo tanto, al no ser bacterias de origen marino, se consideran como halotolerantes (Agwu & Oluwagunke, 2014).

Para el proceso de selección de las mejores cepas se consideraron cuatro criterios: a) una tolerancia a la sal $\geq 10\%$; b) capacidad para producir biopelículas; c) ensayo de gota colapsada ≥ 4 mm y; d) índice de emulsificación a las 24 h $\geq 50\%$. La determinación de la actividad BS y BE se realizó bajo condiciones de cultivo en matraz agitado (planctónico). El sobrenadante de cada una de ellas fue utilizado para estimar la producción de los compuestos BS y la actividad emulsificante debido a que las bacterias pueden expresar dichos compuestos, adheridos a la célula (intracelularmente) y secretarlos fuera de ella (extracelularmente) (Mukherjee *et al.*, 2006). A continuación, se describen los resultados que permitieron la elección de las cepas a utilizar para la conformación de los consorcios bacterianos.

8.1 Halotolerancia:

Las 44 cepas evaluadas mostraron la capacidad de crecer en ausencia de sal o en medio sólido y líquido suplementado con concentraciones de NaCl, desde el 1% hasta 17.5%. Contrario a las bacterias halófilas que requieren de la sal para su crecimiento óptimo (Margesin & Schinner, 2001), las bacterias halotolerantes son capaces de crecer en ausencia o presencia del NaCl; sin embargo, para ser consideradas halotolerantes estas deben crecer en concentraciones de sal con valor igual o superior al 1% (Nanjani & Soni, 2012). El grado de halotolerancia se clasifica en bajo (0-4%), moderado (5 al 10%) y por arriba del 10% se clasifican como altamente halotolerantes (Agwu & Oluwagunke, 2014).

Los resultados muestran que todas las bacterias evaluadas tienen la habilidad para crecer en concentraciones superiores al 1% de NaCl, con lo que se puede confirmar que todas las bacterias evaluadas en este trabajo son halotolerantes. Además, y como era de esperarse, conforme aumentó la concentración de sal en los medios, el número de bacterias capaces de crecer, disminuyó (Gráfica 1), de esa manera sólo 27 cepas (61%) fueron capaces de crecer al 10% de NaCl, y sólo 11 cepas (25%) siguen creciendo aún en presencia del 15% de sal. Destacan seis cepas: 43, 46, 51a, 52, 52b y S2 (14%), que lograron crecer a una concentración de 17.5% de NaCl, este resultado clasifica a estas bacterias como altamente halotolerantes (Agwu & Oluwagunke, 2014).



Gráfica 1. Porcentaje de bacterias y su tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl.

La respuesta de los microorganismos al estrés de diferentes ambientes, ha originado que se sintetizen productos metabólicos que les permitan sobrevivir en ellos (Fenical, 1993). La osmoregulación es una estrategia que usan los microorganismos para colonizar ambientes donde la salinidad es alta. Las bacterias halotolerantes por su parte, implementan un mecanismo de regulación al sintetizar y/o acumular solutos compatibles dentro de la célula para mantener el balance osmótico (Shivanand & Mugeraya, 2011; Vaidya *et al.*, 2018). Se ha observado que las bacterias halotolerantes pertenecen generalmente a los géneros como

Pseudomonas, *Flavobacterium*, *Virgibacillus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Micrococcus*, *Alteromonas* y *Bacillus* (Niето *et al.*, 1989; Caton *et al.*, 2004; Hrenovic & Ivankovic, 2009; Hezayen *et al.*, 2010; Solomon & Viswalingam, 2013).

En este sentido, la contaminación que se deriva de la industrialización, es uno de los mayores problemas a nivel mundial, contaminan suelos, sedimentos, aguas subterráneas y superficiales, y representan un peligro constante a los ecosistemas. Muchos sitios contaminados se caracterizan por presentar gradientes de salinidad altos, lo que dificulta su tratamiento por métodos convencionales de biorremediación. Altas salinidades o gradientes altos de salinidad pueden destruir la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células, lo que resulta letal para muchos microorganismos usados para el tratamiento de aguas y suelos contaminados. Por lo tanto, para tratar de remediar estos sitios, así como los ambientes marinos, una elección viable es el uso microorganismos halófilos o halotolerantes, que sean capaces de soportar las condiciones de los ambientes salinos (Díaz *et al.*, 2002).

8.2 Biopelícula:

Para el ensayo de biopelícula se usó el método descrito por O'Toole (2011), en el cual se usan microplacas de 96 pozos para detectar la formación de biopelículas *in vitro*. Las lecturas obtenidas después de teñir las biopelículas con CV al 0.1% y solubilizar el colorante con ácido acético al 30%, fueron determinadas por DO_{550 nm}. Los resultados obtenidos muestran evidentes diferencias en la formación de biopelículas *in vitro*. En general, se observó que la mayoría de las bacterias que forman biopelículas lo hacían firmemente en la interfase aire-líquido. Sin embargo, algunas cepas formaban las biopelículas en el fondo del pozo de las microplacas, en ese caso, la adherencia no era completa, y durante el proceso de cuantificación se observó un desprendimiento, conduciendo a la pérdida de la biopelícula y por tanto de la cuantificación real de esta (Stepanovic *et al.*, 2007).

Las cepas con los resultados más altos de absorbancia fueron 43>24>66>54a con valores de 2.1, 1.6, 1.42 y 1.2 respectivamente (Anexo 2). En la Figura 3 se

muestran diferentes cepas para ilustrar la técnica de cuantificación de BP, en específico, la tinción de la BP antes de hacer la lectura en el espectrofotómetro. De esta manera, se puede observar el colorante retenido por tres de las mejores cepas (24>66>54a), en contraste, cepas como la 8c y 66a obtuvieron valores de absorbancia más bajos, siendo estos de 0.40 y 0.08 respectivamente. Para efecto de este trabajo se tomó como criterio de selección aquellas cepas con un valor de absorbancia igual o mayor a 0.1 (Stepanovic *et al.*, 2007). Los trabajos de Kuchma *et al.*, (2005), han demostrado que durante la cuantificación de la producción de biopelículas por cepas de *P. aeruginosa*, modificadas genéticamente para producir biopelículas, los valores de DO no excedieron una absorbancia mayor a 0.3 después de 24 h. Por lo tanto, considerando lo anterior, los resultados obtenidos indican que las cepas tienen una buena capacidad para formar biopelículas.

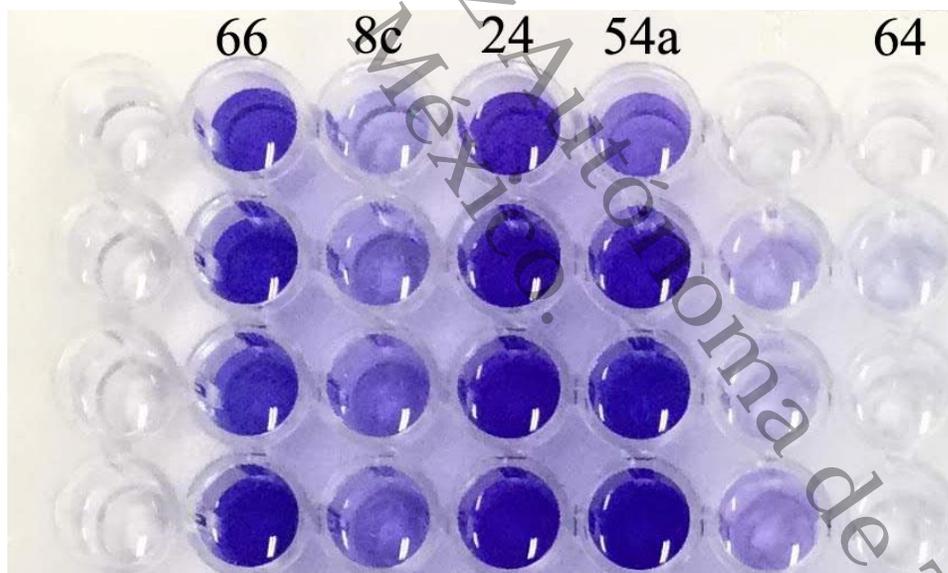


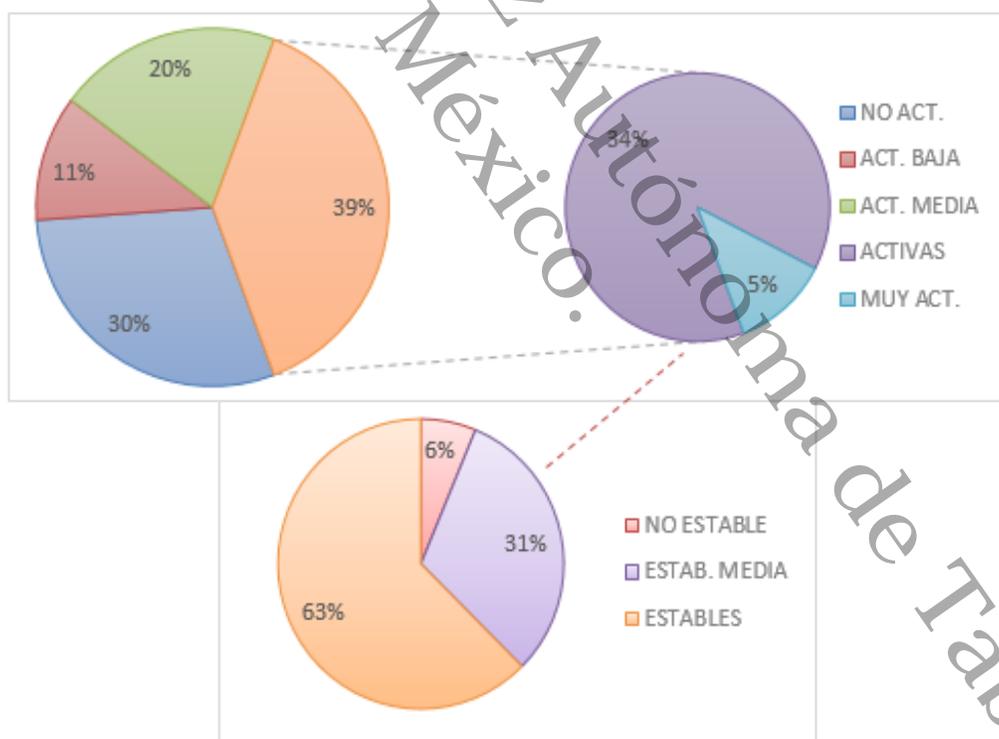
Figura 3. Cuantificación durante el ensayo de formación de biopelícula *in vitro* en placas de 96 pozos.

8.3 Actividad Emulsificante:

Una emulsión es un sistema heterogéneo que consiste en un líquido inmiscible disperso en otro líquido, en forma de gotas, las cuales en general exceden los 0.1 mm. Habitualmente, las emulsiones termodinámicamente no son estables, pero la presencia de un surfactante o BS puede incrementar notablemente la estabilidad,

previniendo la coalescencia de las gotas (Santos *et al.*, 2016). Para la formación de una emulsión es necesario aplicar una energía o trabajo que ayude a la mezcla de ambas fases y que propicie la formación de las micelas. Las micelas que se forman a partir de la asociación de las moléculas de un BS, juegan un papel esencial en la formación de microemulsiones. En consecuencia, las microemulsiones tienden a ser más estables ya que se forman micelas o gotas de menor tamaño (0.1 a 10 micras), (Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2011; Bello Gutierréz, 2014).

Los ensayos de emulsificaciones se realizaron utilizando el hexadecano como el líquido inmisible, ya que este se considera como un compuesto modelo representativo de los alcanos, y diversos trabajos reportan a este sustrato, para la elección de cepas con potencial Bioemulsificante (Shinoda & Arai, 1964; Tzintzun-Camacho, 2012; Medina-Moreno *et al.*, 2013; Zhu, 2015).



Gráfica 2. Porcentaje de cepas y su clasificación por tipo de actividad emulsificante.

En general los resultados del IE₂₄ demuestran que el 70% de las bacterias analizadas son capaces de formar emulsificaciones, aunque difieren en actividad y

estabilidad. Como puede observarse en la gráfica 2, 13 cepas (30%) presentaron emulsificaciones parciales o inestables con un IE_{24} , menor al 10% por lo que se consideraron como cepas no activas.

De esta manera, 39% de las cepas presentaron actividad emulsificantes, consideradas en este estudio como cepas activas, de las cuales 34% mantienen una actividad por arriba del 50% (activas), y tan solo el 5% de las cepas excedieron un IE_{24} mayor al 60% (Anexo 2). Por otra parte, también se consideró la estabilidad de las emulsificaciones después de 3 meses, tiempo en el cual, la mayoría de las cepas perdieron la emulsificación, ya que, de las 17 cepas más activas (39%), tan solo diez cepas (63%) fueron muy estables, manteniendo un índice de emulsificación muy similar al inicial (Anexo 2).

De las diez cepas con los mejores índices de emulsificación (S3>S7>S1>S9>S5>S2>S4>S6>S8), la cepa S3 presentó el mayor IE con 65.61%, incluso mayor a los obtenidos con el surfactante comercial SDS de naturaleza aniónico, con un IE_{24} de 62.5%. Sin embargo, la emulsificación se perdió gradualmente y por completo después de los tres meses. Por lo que, aunque fue una de las cepas con mayor IE, fue excluida para los siguientes ensayos.

Considerando la emulsificación producida por el surfactante comercial (IE_{24} de 62.5%) el cual se encuentra puro, se seleccionaron como candidatas potenciales todas aquellas cepas con un IE_{24} mayor al 40%, pero priorizándose aquellas cuyo IE_{24} fue superior al 50%. En este sentido, los resultados obtenidos muestran un gran potencial de las cepas seleccionadas, ya que los índices de emulsificación aquí obtenidos, son tan altos como los obtenidos por otros autores que utilizan emulsificantes purificados, como de Sousa *et al.* (2014), quien reporta un IE_{24} de 53.3% para el biosurfactante producido por la cepa *Bacillus subtilis* ATCC 6633, o el bioemulsificante obtenido por Gudiña *et al.* (2015), de la cepa *Paenibacillus* sp. 510, que obtuvo un IE de 59.3% ambos usando como sustrato hexadecano, el mismo reactivo usado en este trabajo. Además, es importante enfatizar que este

índice de emulsificación fue obtenido por ambos autores después de optimizar las condiciones y composición del medio de cultivo.

8.4 Actividad Biosurfactante:

A) Hemólisis

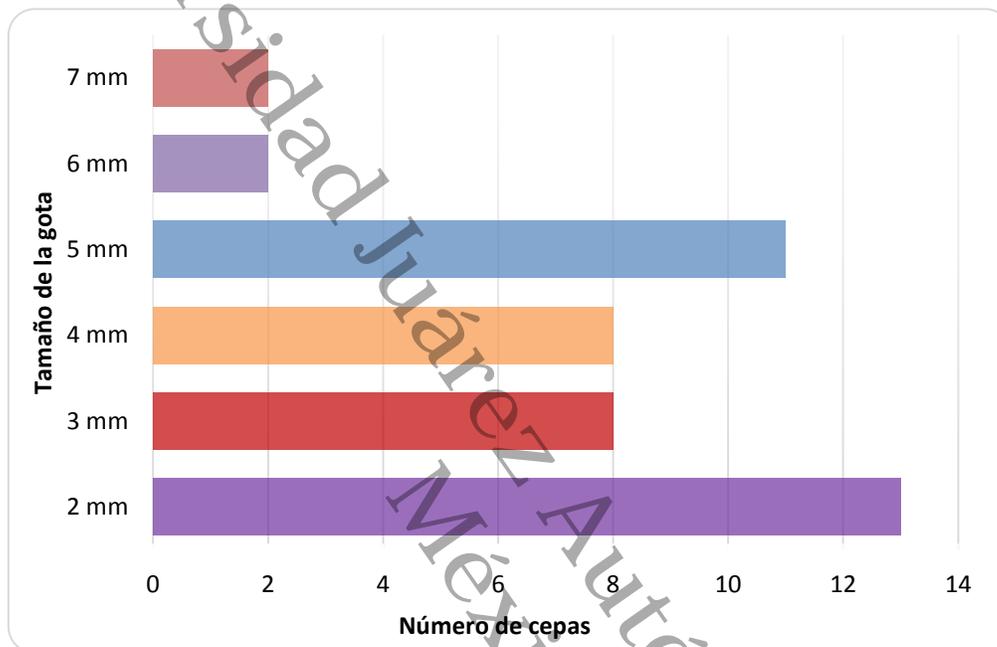
La actividad hemolítica se evaluó para todas las cepas, como un método de preselección (Anexo 2), debido a la buena correlación entre la actividad hemolítica y la tensión superficial producida por los metabolitos surfactantes (Youssef *et al.*, 2004). Sin embargo, esta técnica tiene limitaciones, ya que en algunos casos se excluyen cepas que produzcan BS que no tienen actividad hemolítica. Pero también hay compuestos con la actividad hemolítica producidos por los microorganismos, no necesariamente de tipo biosurfactante, como es el caso de la hemólisis causada por exotoxinas generalmente denominadas como hemolisinas. Cepas como la S3, 8A, 8c, 20a y 59a, presentaron una hemólisis alfa, las más activas, presentan de tipo beta, como fue el caso de las producidas por las cepas 8a, 20b, 35, 51, 66, S1, S6 y S9 entre otras (Anexo 2), mientras que aquellas sin actividad hemolítica son consideradas del tipo gamma y no presentan lisis celular.

B) Gota colapsada

La técnica de gota colapsada es una técnica rápida y sencilla para la selección de microorganismos productores de BS (Jain *et al.*, 1991).

Además, este ensayo es ampliamente utilizado, por también se puede cuantificar la actividad BS (Bodour & Miller-Maier, 1998). Para validar esta técnica se utilizó como control negativo el caldo de cultivo CST, el cual formaba una gota estable, de un promedio de 3 mm y que no colapsa. Por lo tanto, se consideraron positivos los SLC de aquellas cepas que producían o formaban tamaños de gota igual o mayor a 4 mm y que se extendieron en la superficie del pozo (colapsaron). Diversos autores encontraron que el tamaño de la gota tiene una correlación con la concentración de BS producido (Jain *et al.*, 1991; Bodour & Miller-Maier, 1998; Tugrul & Cansurar, 2005). Esta información se ha correlacionado con los de tensoactivos comerciales

como el SDS que forma micelas a partir de concentraciones de 576 mg/mL (Madsen *et al.*, 2015), y alcanza una concentración micelar crítica (CMC) a 1845 mg/L, que corresponde a un colapsamiento y tamaño de gota de 4 mm (Bodour & Miller-Maier, 1998).



Gráfica 3. Número de cepas clasificada por tamaño de gota (mm)

De las 44 cepas evaluadas, 23 de ellas (52%) mostraron tamaños de gota iguales o superiores a 4 mm de diámetro. En la Gráfica 3, se muestra el ensayo preliminar de las 44 cepas en cuanto a la actividad de la gota colapsada. Las cepas que mostraron los valores más altos fueron las cepas 44a y S1 con gotas totalmente planas y colapsadas de 7 mm. De acuerdo con Jain *et al.*, (1991), la gota colapsada está relacionada con la tensión superficial pero no con la actividad emulsificante. Así mismo Joy *et al.*, (2017) menciona que la presencia del BS reduce la tensión superficial por lo cual la gota que colapsa se ve aplanada. Los datos del ensayo de gota colapsada muchas veces son reportados de manera cualitativa, en cuyo caso, después de esperar por un minuto, las gotas que se encuentren aplanadas y dispersando el aceite, son consideradas como positivas, ya que el control negativo (agua), permanece como una gota redonda y erguida sobre la capa de aceite.

De este modo, Maneerat & Phetrong (2007), probaron la actividad biosurfactante de ocho cepas aisladas de un ambiente marino, las cuales fueron positivas en la gota colapsada al dispersarse sobre la capa de aceite. Jimoh & Lin (2019) también consideraron la técnica de manera cualitativa, ya que al probar el BS producido por la cepa *Paenibacillus* sp. D9 después de 3 días, reportaron que el colapsamiento del BS parcialmente purificado era mayor que el del sobrenadante y el control positivo Tween 80. De la misma forma Tugrul & Cansunar (2005), reportan el colapsamiento de dos biosurfactantes producidos por las cepas *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*, siendo los responsables un ramnolípido y la surfactina respectivamente. De esta manera, se observa la dispersión total de la gota del BS una vez colocada en el pozo de la microplaca.

Aunque hay otros trabajos como el de Varadavenkatesan & Murty (2013), que reportan tamaños de gota mucho mayores a los obtenidos en este trabajo, pero es debido a la modificación de la técnica, en la cual se usa como soporte del ensayo un portaobjetos. En este estudio la bacteria *Bacillus siamensis* produjo una gota de 17 mm. Sin embargo, este resultado se debe a la libertad de la gota de aceite de esparcirse sobre una superficie mayor al tamaño de los pozos de una microplaca. Es por eso, que, en la metodología aquí utilizada, los tamaños de gota por arriba de 7-8 mm son imposibles de medir, debido al limitado espacio del pozo.

8.5 Naturaleza de las cargas iónicas de los sobrenadantes libres de células (SLC)

Para la determinación de las cargas, se realizaron las placas con agar CTAB/AM según Siegmund & Wagner (1991). Esta prueba colorimétrica fue diseñada para la selección de BS, en específico de tipo ramnolípidos, aunque también puede ser usada para otros compuestos de naturaleza aniónica. Con este método, la producción del BS (aniónico) se verifica mediante la formación de los halos azules alrededor de los pozos. Estos halos se forman debido a una interacción iónica que forma un complejo entre el BS-CTAB-AM, y posiblemente a una interacción redox con el Azul de metileno (lo que da la tonalidad azul). Sin embargo, aunque no se

conoce el mecanismo exacto del método, para los fines cualitativos, el ensayo se somete a un periodo de bajas temperaturas, lo que ocasionan que el color azul se intensifique, permitiendo que los halos formados sean más visibles (Tabuchi-Yagui, 2014).

Por otra parte, para determinar las cargas catiónicas de los compuestos, se utilizó el método de doble difusión en agar azul, donde se confrontan dos sustancias por una difusión pasiva de los compuestos, que pueden tener cargas iguales u opuestas (Saranya *et al.*, 2015). De esta manera, los resultados del ensayo en agar azul, mostraron que 30 de las cepas, presentan cargas aniónicas; por el contrario, con el ensayo de doble difusión, se pudo determinar que tan solo siete cepas, son de naturaleza catiónica.

De las 44 cepas evaluadas, seis de ellas no presentan carga iónica, ya que dieron negativo en ambas pruebas. Para una de las cepas (S7) se demostró que presentaba tanto carga aniónica, como catiónica, lo que podría significar que esta cepa es capaz de producir diferentes tipos de biosurfactantes o que el compuesto que produce sea de naturaleza zwitterionica por que presenta ambas cargas en su estructura (Zhao *et al.*, 2015).



Figura 4. Ensayo de Agar Azul, actividad de las cepas aniónicas (halos azul intenso). SDS como control positivo.

Diversos estudios reportan que la mayoría de los biosurfactantes son de naturaleza aniónica, algunos neutros, y más raramente catiónicos. Cabe destacar que cuatro cepas: 59a, 8c, 20a y 66, presentan cargas aniónicas y la cepa 51 no presenta carga (Fig. 4).

8.6 Selección de las cepas activas:

Las cepas fueron seleccionadas tomando en cuenta cuatro características: halotolerancia, capacidad para formar biopelícula, actividad biosurfactante y

bioemulsificante. Bajo estos criterios, solo siete cepas (8A, 8a, 8c, 20a, 20b, 66 y S1) cumplieron estrictamente con todas las características (Fig. 5; Anexo 2).

Sin embargo, al repetir los ensayos las cepas 8A, 20b y S1 no mostraron la misma actividad, motivo por el cual, se incluyeron a aquellas cepas que cumplieran con el mayor número de criterios de inclusión. Por lo tanto, se sumaron las cepas 28, 35a, 51, 59a, S6 y S9, (Fig. 5; Tabla 2), a fin de contar con una mayor diversidad de bacterias para conformar consorcios, y que no se repitieran consorcios ya conformados y evaluados por Valdivieso-Villegas (2018). De esta manera las diez cepas seleccionadas fueron: 8a, 8c, 20a, 35a, 51, 59a, 66, 28, S6 y S9 (Tabla 2).

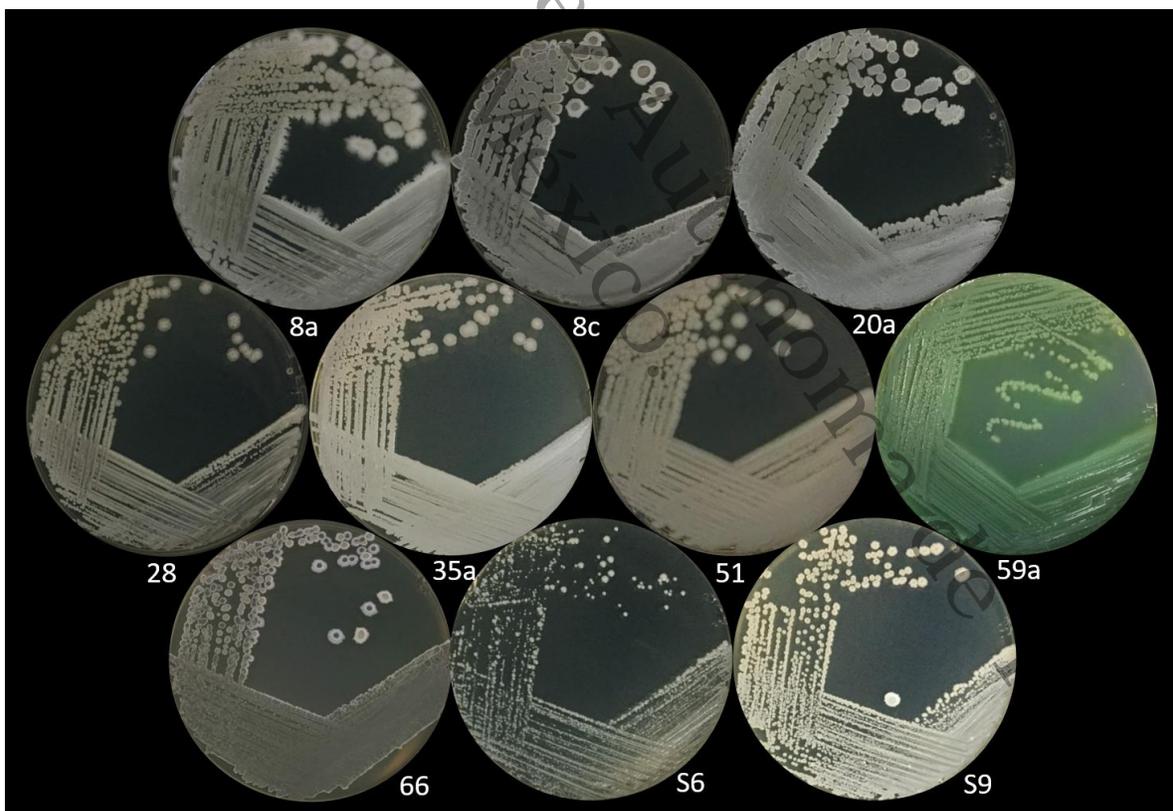


Figura 5. Cultivos en agar soja tripticaseína de las 10 cepas más activas

Tabla 2. Cepas halotolerantes formadoras de biopelículas, seleccionadas por mayor actividad biosurfactante y bioemulsificante

Clave	Caracterización				Actividad		
	Tinción de Gram	Tolerancia NaCl (%)	Carga Iónica	Hemólisis	Biopelícula (DO _{550nm})	Bioemulsificante (IE ₂₄)	Biosurfactante Gota Colapsada (mm)
8a	Bacilo +	10	Aniónica	beta	0.37	58.21	5
8c	Bacilo +	10	Aniónica	alfa	0.40	57.17	5
20a	Bacilo +	15	Aniónica	alfa	0.17	57.93	5
28	Bacilo -	15	Aniónica	beta	0.41	40.93	4
35a	Bacilo -	5	Aniónica	beta	0.20	43.95	4
51	Bacilo +	10	Aniónica	beta	0.10	59.72	4
59a	Cocobacilo -	5	Aniónica	alfa	0.20	58.31	5
66	Bacilo +	15	Aniónica	beta	1.42	53.97	6
S6	Micrococcos -	5	Catiónica	beta	0.11	50.16	2
S9	Bacilo +	5	Aniónica	beta	0.14	59.07	5

8.7 Ensayos de compatibilidad:

Los ensayos de compatibilidad/antagonismo entre las diez cepas seleccionadas se llevaron a cabo para aumentar las probabilidades de establecer interacciones sinérgicas, buscando un incremento o estabilidad en la producción de compuestos BS y BE. Los resultados de dichos ensayos se muestran a continuación (Tabla 3 y Fig. 6). En general, se observó que ninguna de las cepas se inhibió entre sí, (Fig. 6), pero la cepa 35a si mostró una fuerte actividad antagónica contra la mayoría de las bacterias, mostrando desde inhibiciones débiles hasta zonas de inhibición bien definidos.

De igual manera se observó que la cepa S9 inhibe a 20a y las cepas 20a y 51 inhibieron a la cepa 28. Por lo tanto, después de este ensayo se eliminó a la cepa 35a que inhibía a siete de las cepas y la 28 que era inhibida por tres bacterias, además de que su IE₂₄ era el más bajo (40.93%) entre las 10 cepas seleccionadas.

Tabla 3. Matriz del ensayo de compatibilidad de las 10 cepas seleccionadas.

		Inoculo superficial									
		S6	S9	8a	8c	20a	28	35a	51	59a	66
Placa vaciada Inoculo dentro del agar	S6	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
	S9	NI	NI	NI	NI	NI	NI	X	NI	NI	NI
	8a	NI	NI	NI	NI	NI	NI	XXX	NI	NI	NI
	8c	NI	NI	NI	NI	NI	NI	XXX	NI	NI	NI
	20a	NI	X	NI	NI	NI	NI	XXX	NI	NI	NI
	28	NI	NI	NI	NI	X	NI	XX	X	NI	NI
	35a	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
	51	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
	59a	NI	NI	NI	NI	NI	NI	XX	NI	NI	NI
	66	NI	NI	NI	NI	NI	NI	X	NI	NI	NI

NI = no inhibición

X = inhibición débil

XX = inhibición moderada

XXX = halo de inhibición muy marcado

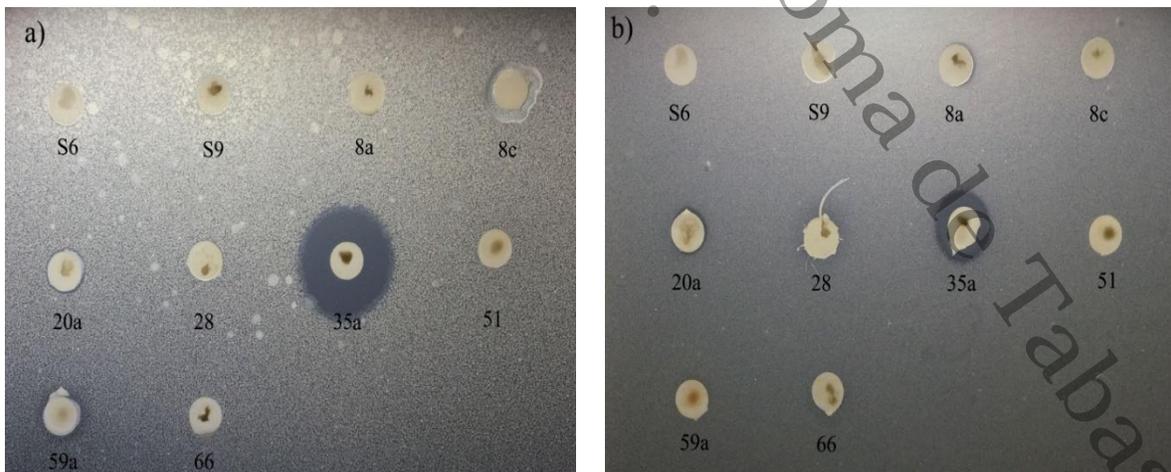


Figura 6. Ensayo de Compatibilidad en placa vaciada en AST, en la placa vaciada de las cepas; a) 8a y b), 59a, donde se observa que la cepa 35 inhibe a ambas cepas.

8.8 Cinética de crecimiento y producción de BS/BE:

Con las ocho cepas seleccionadas se realizaron cinéticas para determinar el comportamiento de las cepas en cuanto a su crecimiento y el tiempo óptimo de mayor expresión de los compuestos BS y BE en condiciones de cultivo planctónico. En este punto, las cepas S6, S9, 8a, que mostraron cinética de crecimiento en un tiempo mayor de 120h, fueron descartadas. Ya que es necesario que el proceso de obtención de estos compuestos extracelulares sea rentable para las industrias, por lo que, a mayores tiempos de producción, mayor es el costo del proceso.

De esta manera se decidió seleccionar a las cepas cuyos tiempos óptimos de producción no sobrepasaran las 120h (cinco días). En la Figura 7, se puede observar el comportamiento de las cinco cepas durante la cinética de crecimiento y el comportamiento en el pH, así como la actividad BS que fue evaluada por la técnica de gota colapsada. En ninguna de las cinéticas de crecimiento se observó una fase de adaptación (*lag*), pero la fase logarítmica, en general para todas, obtuvo su máximo crecimiento exponencial a las 72h, excepto para la 20a que fue a las 48h.

Durante la cinética, no se observó una evidente relación entre la producción del BS y las fases de crecimiento. En todas las cinéticas se observa un aumento paulatino del pH hasta alcanzar valores mayores a 8. Se ha observado que, durante la biosíntesis de diferentes biosurfactante, los valores de pH incrementan entre 7 y 8 (Al-Ajlani *et al.*, 2007; Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008). Es por eso que varios autores optimizan las condiciones, ajustando y manteniendo el pH del medio a 8, para mejorar la producción y solubilidad de los Biosurfactantes (Bednarski *et al.*, 2004; Mouafi *et al.*, 2016).

Por otro lado, se evaluó la actividad BE la cual fue determinada por el IE₂₄, así mismo se realizó el seguimiento de la estabilidad de las emulsificaciones en el tiempo. En el caso de la emulsificación se observó una clara relación con el aumento del pH, como se observa en la cinética de las cepas 59a y 51 (Fig. 8). Las cepas: 8c, 20a y 66, forman emulsificaciones desde la 24h de incubación con índices de emulsificación similares (56.6, 56.5 y 55.3%, respectivamente), estas bacterias

producen los metabolitos emulsificantes entre la fase final exponencial y el inicio de la fase estacionaria. Diversos autores también mencionan estas fases dentro de las cuales las bacterias producen una mayor cantidad de compuestos biosurfactantes (Brint & Ohman, 1995; Cha *et al.* 2008; Kim *et al.*, 2002; Sheppard & Mulligan, 1987; Martínez-García, 2011).

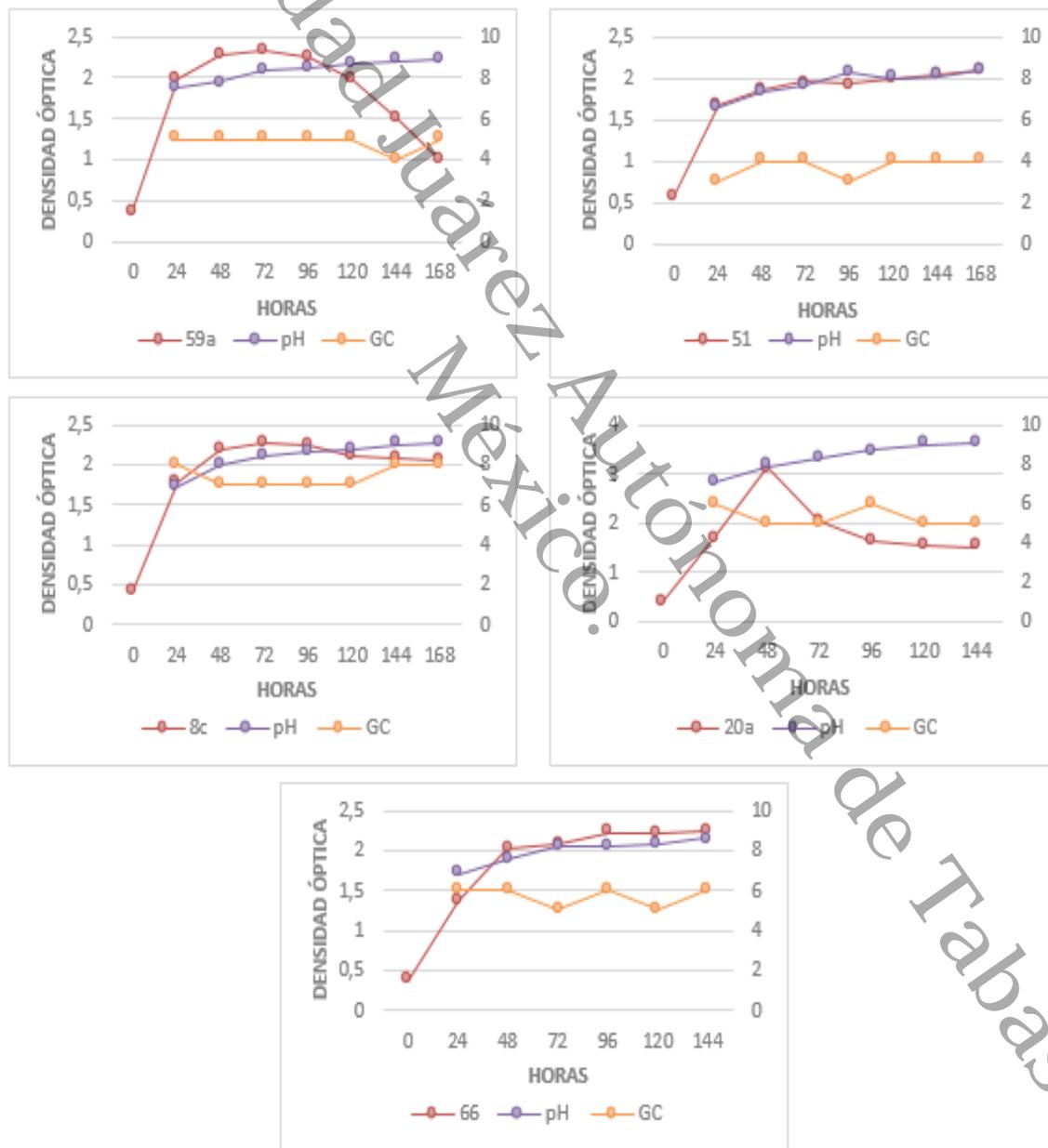
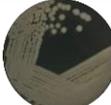
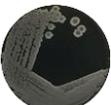
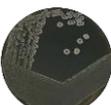


Figura 7. Cinética de crecimiento, de las cinco bacterias seleccionadas.

Tabla 4. Índices de emulsificación (con hexadecano) de las cepas individuales, obtenidos durante la cinética de crecimiento durante 120 h.

Cepa	Clave	Gota Colapsada (mm)	Índice de Emulsificación (IE 24) a diferentes tiempos de cultivo (%)				
			24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
				59a	5	12.30	35.90
	51	4	8.40	4.30	25.80	36.60	59.10
	8c	7	56.60	54.30	54.30	56.60	55.40
	20a	5	56.50	56.50	56.50	56.50	56.50
	66	6	55.30	55.40	56.50	0.00	0.00

En este sentido, el tiempo de producción es de gran importancia para la obtención de estos compuestos a una escala industrial, ya que este es uno de los problemas que se presentan para que la producción de BS/BE sea redituable a gran escala (Bach & Gutnick, 2004; Banat et al., 2010).

En contraste, las cepas 59a y 51 alcanzan su mayor producción después de las 96 y 120 h, obteniendo valores de 56.5 y 59.1 respectivamente, al final de la fase estacionaria y la fase de muerte, como se puede observar en la Tabla 4 (Fig. 7). Sin embargo, aunque las cinco cepas producen emulsificaciones similares, la estabilidad del compuesto varía con el tiempo de producción.

Este fenómeno puede observarse de manera particular para la cepa 66, la cual, durante los ensayos de cinética, perdió estabilidad en un periodo de tiempo corto (razón por la que se colocó una foto donde las emulsiones ya no se observan). Por

lo general, la mayor estabilidad de las emulsificaciones se observó entre las 48 y 120 h.

Para determinar si las emulsificaciones seguirían siendo estables después de cierto tiempo, se condujo el ensayo de estabilidad hasta un mes después de realizada la emulsificación. De esta manera se observó la estabilidad en el tiempo de las 5 cepas evaluadas, usando el SLC a los mayores tiempos de expresión, según lo determinado en la cinética de crecimiento.

Las cepas que mantuvieron una estabilidad similar a la inicial fueron la 59a y 8c, mientras que la 51 fue la cepa con menor estabilidad. Mantener las emulsiones estables por periodos largos de tiempo podrían resultar útil en diversos campos de aplicación, por lo que resulta de interés seguir estudiando estas cepas y probar la actividad de los compuestos purificados BS/BE (Fan *et al.*, 2017).

De manera tal, que esta información resulta valiosa para la conformación de los consorcios bacterianos.

Tabla 5. Estabilidad de las emulsiones producidas por las cepas solas después de un mes.

Clave	Índice de emulsificación (al tiempo de mayor expresión)	Índice de emulsificación (1 mes)
59a	56.72	53.33
51	47.53	28.51
8c	55.81	53.70
20a	57.21	35.55
66	55.40	37.40

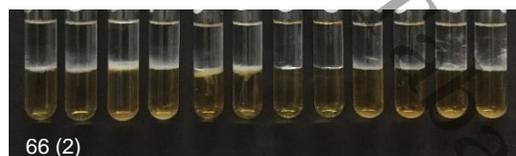
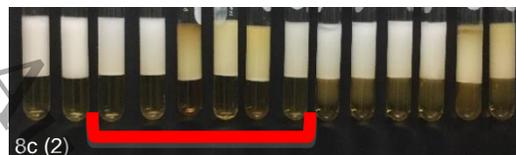
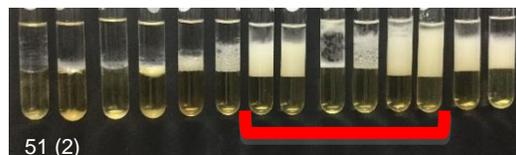
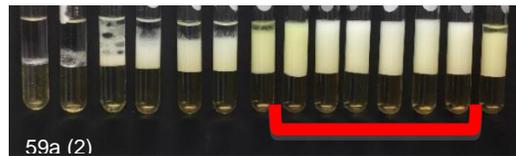
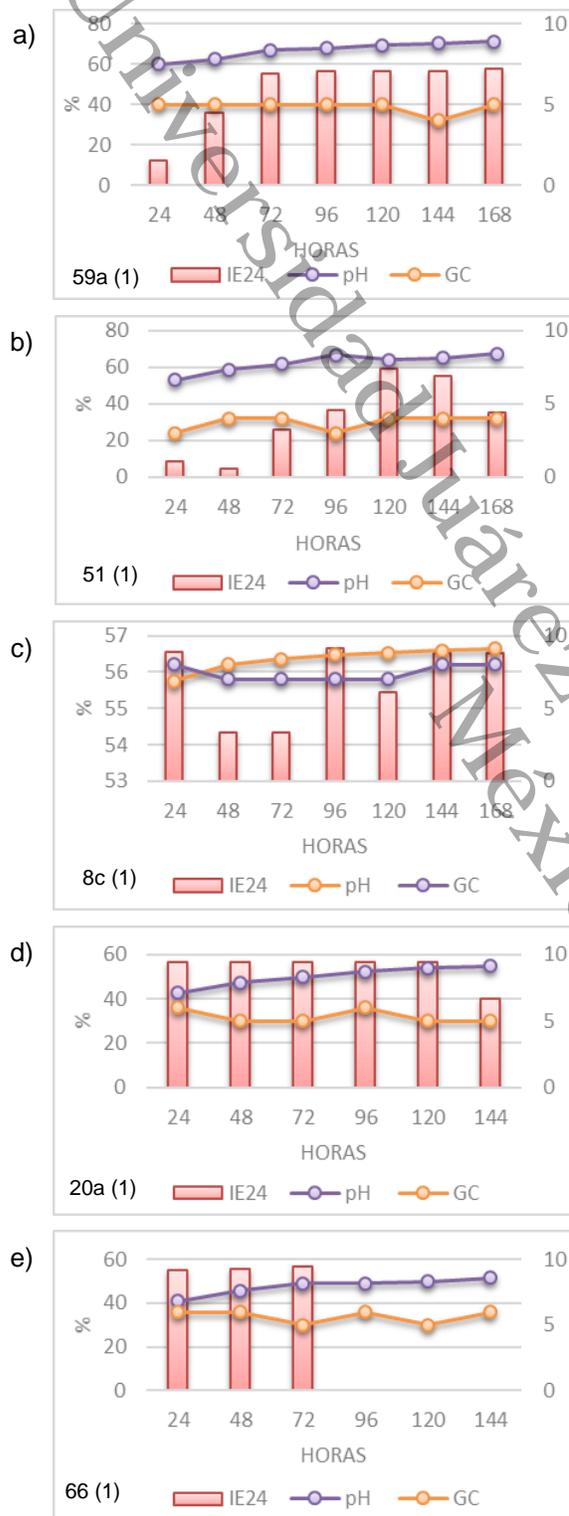


Figura 8. a) 59a, b) 51, c) 8c, d) 20a, e) 66. (1) Gráficas del índice de emulsificación, pH y gota colapsada, evaluadas durante las cinéticas de crecimiento de las cinco cepas. (2) Emulsificaciones de las cepas evaluadas durante la cinética de crecimiento y estabilidad en el tiempo.

8.9 Consorcios bacterianos en condiciones de cultivo planctónico:

Con todos los resultados recopilados se procedió a la formación de los consorcios. Se decidió que el Consorcio 1, debía estar conformado por las cepas que mostraban mejor actividad BS/BE desde las 24h, el Consorcio 2, sería la suma del primero más la 59a, y el Consorcio 3, incluiría a todas, (Tabla 6).

Tabla 6. Consorcios bacterianos elaborados

Consorcio	Integrantes
C1	8c+20a+66
C2	8c+20a+66+59a
C3	8c+20a+66+59a+51

Una vez finalizado el análisis y conformación de los consorcios, se prosiguió a evaluar la cinética de crecimiento en cultivo planctónico de los tres consorcios (Fig. 9). Tomando alícuotas cada 24 horas, se pudo determinar también, el tiempo óptimo de producción de BS y BE por las técnicas de gota colapsada y el índice de emulsificación, respectivamente.

Como era de esperar el comportamiento cinético del consorcio C1 conformado con las bacterias que tiene cinética de crecimiento similares, presentó una curva típica de crecimiento (Fig. 9), mientras que la cinética de los consorcios C2 y C3 integrados por bacterias con diferentes cinéticas de crecimiento presentó un comportamiento diaúxico debido a los diferentes tiempos de replicación que tienen las bacterias que lo conforman.

Asimismo, la actividad surfactante no parece haber mejorado en ninguno de los consorcios, a pesar de que todas las cepas eran compatibles entre sí. El consorcio C1 conformado por tres de las cepas, presentó un colapsamiento de 6 mm, seguido del consorcio C2 con un colapsamiento de 5 mm y por último el consorcio C3 con un colapsamiento de 4 mm. De manera que el incremento en el número de

microorganismos formando el consorcio no propició una mayor expresión de los metabolitos surfactantes.

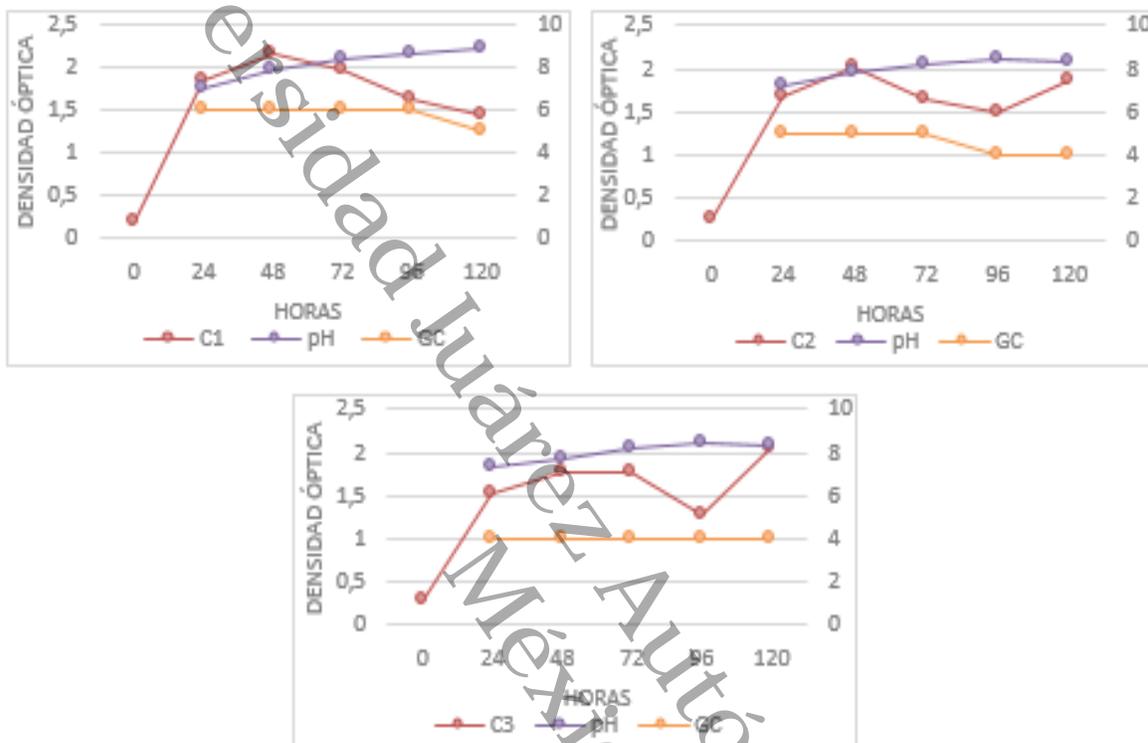


Figura 9. Cinética de crecimiento, pH y evaluación de la producción de BS por el ensayo de Gota Colapsada (GC), de los consorcios bacterianos.

Tabla 7. Cinética de emulsificación de los consorcios bacterianos bajo condiciones de cultivo planctónico

Clave	Índice de Emulsificación (% / Horas)				
	24	48	72	96	120
C1	50.9	57	57.3	55.6	56.1
C2	34.2	58.7	56.5	56.9	57.1
C3	26.7	58	57.8	55.8	57.5

En contraste, la actividad emulsificante mejoró, ya que los consorcios produjeron una actividad emulsificante estable entre las 48 y 72h, en los tres casos (Tabla 7; Fig. 10). No obstante, las emulsificaciones obtenidas por los consorcios no varían significativamente con las obtenidas por las cepas individuales, como puede

observarse en las tablas 4 y 7. Los valores del IE_{24} de los consorcios fueron: para C1, de 57% a las 48h; para C2 y C3 valores de 58.7 y 58%, a las 48h, respectivamente.

Cabe destacar, que, los consorcios mantuvieron una actividad BS igual o mayor a 4 mm desde las 24h. Para el caso de la actividad BE, la estabilidad se obtuvo entre las 48 y 72h, para los tres consorcios. De manera que el potencial de los consorcios podría ser llevado a una escala de producción mayor obteniendo buenos resultados en lapsos de tiempo cortos, optimizando así, los costos de producción.

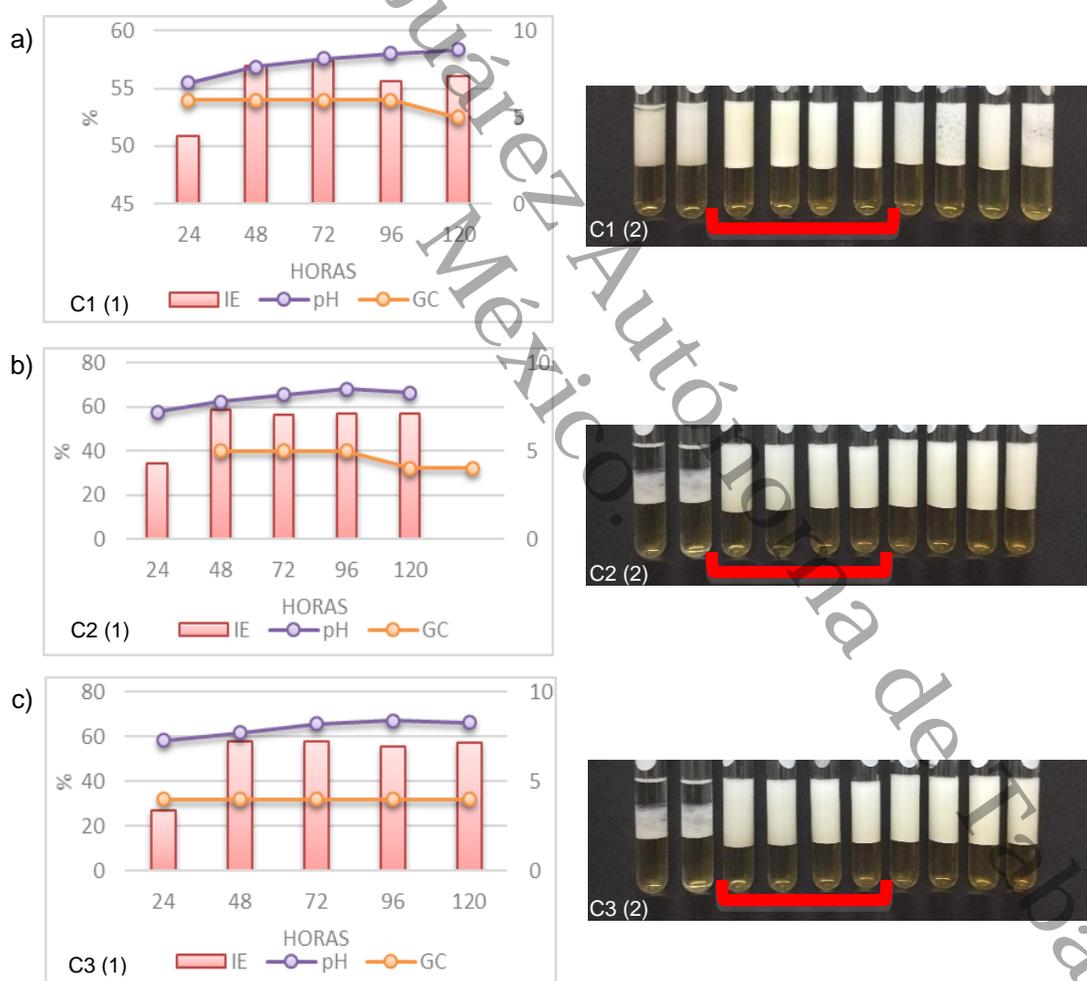


Figura 10. a) C1, b) C2, c) C3. (1) Gráficas del índice de emulsificación, pH y gota colapsada, evaluadas durante las cinéticas de crecimiento de los consorcios. (2) Emulsificaciones de los consorcios evaluadas durante la cinética de crecimiento y estabilidad en el tiempo.

8.10 Evaluación de la actividad emulsificante en diversos sustratos hidrofóbicos:

El sobrenadante (SLC) obtenido de las cepas individuales y consorcios, fue evaluado para determinar la capacidad de formar emulsiones estables con diferentes sustratos hidrofóbicos, se usó el hexadecano como representante del grupo de los compuestos alifáticos y de los aromáticos al xileno, ambos sustratos fueron fácilmente emulsificados. No obstante, el más difícil de emulsificar fue el petróleo crudo, ya que ninguna de las cepas obtuvo un IE₂₄ mayor al 5%, como se muestran en la Tabla 8.

Los índices de emulsificación fueron medidos a las 24 h tras realizarse el ensayo y se mantuvo un registro de la estabilidad de las emulsificaciones después de dos semanas, siendo este, el mismo resultado que el inicial, lo que muestra la estabilidad de los bioemulsificantes producido por las bacterias.

Por otro parte, en el estudio realizado por Peter *et al.*, (2014), probaron los BS producidos por *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y un consorcio formado entre las tres cepas, las cuales tienen un potencial para emulsificar diferentes sustratos, como el petróleo y aceite de motor.

Los resultados indican que el consorcio y *B. subtilis* fueron los mejores emulsificando y manteniendo la estabilidad de la emulsión después de 96h en el petróleo y el aceite de motor, aun cuando esta disminuye conforme pasa el tiempo, comparado con el dato registrado a las 24h. *Pseudomonas aeruginosa* logro emulsificar una pequeña parte del petróleo (5.55%), y por arriba del 65% en el aceite motor, mientras que *Serratia marcescens* no fue capaz de emulsificar el petróleo. En comparación, las cepas solas usadas en este trabajo y el consorcio C2, mantienen emulsiones por arriba del 40% en el caso del aceite de motor. Con el aceite de motor quemado, las cepas 59a y 51 y los consorcios C2 y C3 obtuvieron resultados por arriba del 50%, lo cual demuestra la dificultad que representa cada sustrato para ser tratados.

De esta forma, otros autores como Gudiña *et al.*, (2015) y Fan *et al.*, (2017), reportan la actividad emulsificante de dos cepas capaces de emulsificar diferentes sustratos. En el primer caso, el SLC de un cultivo de *Paenibacillus* sp. emulsificó el petróleo crudo por arriba de 75% y el Xileno por arriba de 59%. Comparando la actividad contra el Xileno, se observa que cepas como la 59a, 8c y 66 presentan valores similares estando por arriba del 55%.

Para el caso del petróleo, ninguna cepa pudo emulsificar por arriba del 5%, y en algunos casos no se presentó actividad en este sustrato. Sin embargo, cabe destacar que la cepa 51 y el consorcio (C3), lograron emulsionar una pequeña parte del petróleo. Para el segundo caso, se evaluó un compuesto purificado obtenido de *Pseudomonas stutzeri* (NJtech 11-1), el cual emulsificó el Xileno por arriba del 80%, y contra n-hexadecano por arriba del 60%.

Tabla 8. Ensayo de emulsificación con diferentes sustratos

Clave	Índice de Emulsificación (IE ₂₄) con diferentes sustratos			
	Petróleo crudo	Aceite de motor	Aceite de motor quemado	Xileno
Tritón x100	64.13	59.09	38.04	62.37
SDS	53.33	53.68	51.06	61.96
59a	0	42.39	53.77	57.61
51	4.34	56.06	84.39	38.13
8c	0	47.29	2.15	59.78
20a	0	45.65	4.17	56.52
66	0	49.49	2.06	55.43
C1	2.17	30.41	17.26	26.18
C2	2.17	49.72	55.09	47.69
C3	4.34	33.65	55.48	40.91

8.11 Cinéticas de los consorcios bacterianos en condiciones de cultivo séstil:

Las cepas 8c, 20a y 66 que bajo condiciones planctónicas mostraron actividad BS/BE en tiempo cortos (24-72h), así como el consorcio C1, se evaluaron en condiciones de cultivo séstil. De manera tal que, los ensayos se realizaron a un

tiempo óptimo, seleccionado de los ensayos en cultivo planctónico, el cual fue establecido a las 48h.

Contrariamente a lo esperado, los resultados obtenidos para las cepas que fueron inoculadas y puestas a crecer bajo condiciones de cultivo sésil, no presentaron un aumento en la actividad BS/BE, inclusive, la actividad BS disminuyó para las cepas individuales, con respecto de las mismas bajo condiciones planctónicas, encontrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Esto es, que las cepas 8c, 20a y 66 pasaron de valores de 7, 5 y 6 mm en condiciones planctónicas, a valores de 5, 4 y 5 mm respectivamente, en condiciones sésiles (Tablas 4 y 9). El mismo comportamiento fue observado para el consorcio C1, disminuyendo 1 mm en la actividad BS bajo condiciones sésiles.

Después de analizar todos los tratamientos bajo diferentes condiciones y cepas, el análisis post hoc con la prueba de Tukey demuestra que las cepas individuales son mejores que los consorcios en romper la tensión superficial, y que las condiciones de cultivo con mayor actividad BS ocurre bajo estado planctónico, encontrando que la muestra 8c P tiene diferencias estadísticamente significativas ($df=11$; $F=6.951$; $P < 0.05$) sobre las muestras 8c S, 20a S, C2 P C3 P y 51 P (Anexo 4).

Por otra parte, para la actividad emulsificante los valores de IE_{24} con cultivos bacterianos de 48 horas no parecen ser variables, es decir no exceden el $\pm 5\%$ como se observa en las Tablas 7 y 9, por lo tanto, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos bajo condiciones planctónicas y sésiles ($df=11$; $F=1.25$; $P > 0.05$), así como individuales y en consorcios (Anexo 4).

La consistencia en los valores de las emulsificaciones sugiere que la concentración del compuesto responsable de la actividad emulsificante, alcanza su límite después de lograr una dispersión completa del hexadecano, por lo que IE_{24} no supera el 60%, a pesar que se observa que el hexadecano pasa a formar parte de la emulsificación por completo, además, la estabilidad no depende de la naturaleza del compuesto, pero si del tipo de biosurfactante que produce la cepa.

Tabla 9. Actividad BS/BE de las cepas seleccionadas cultivadas bajo condiciones sésiles después de 48h de incubación.

Clave	Actividad	
	Biosurfactante	Bioemulsificante
	Gota Colapsada (mm)	IE24 (%)
8c	5	56.6
20a	4	57.2
66	5	53.3
C1	5	57.2

Tabla 10. Índices de emulsificación del consorcio C1, obtenidos durante la cinética de crecimiento en cultivo sésil, a diferentes horas.

Clave	Índice de Emulsificación (% / Horas)				
	24	48	72	96	120
C1	56,52	57,6	57,14	57,77	57,77

8.12 Caracterización:

A) Hemolítica biosurfactante

En este caso para las mejores cepas, los resultados de la actividad hemolítica muestran que, todas presentan actividad de tipo beta-hemolítico, con diferentes halos de hemólisis que dependen de la cantidad del BS que puede difundirse en el agar para lisis la sangre (Tabla 11; Fig. 11), es por eso, que los halos de lisis son de diferentes tamaños.

La actividad hemolítica se determinó usando el SLC del cultivo de 48h de las cepas individuales y consorcios.

Tabla 11. Actividad beta hemolítica de las cepas individuales y de los consorcios.

Clave	Actividad Hemolítica (mm)
59a	10
51	9
8c	16
20a	14
66	15
C1	16
C2	12
C3	12

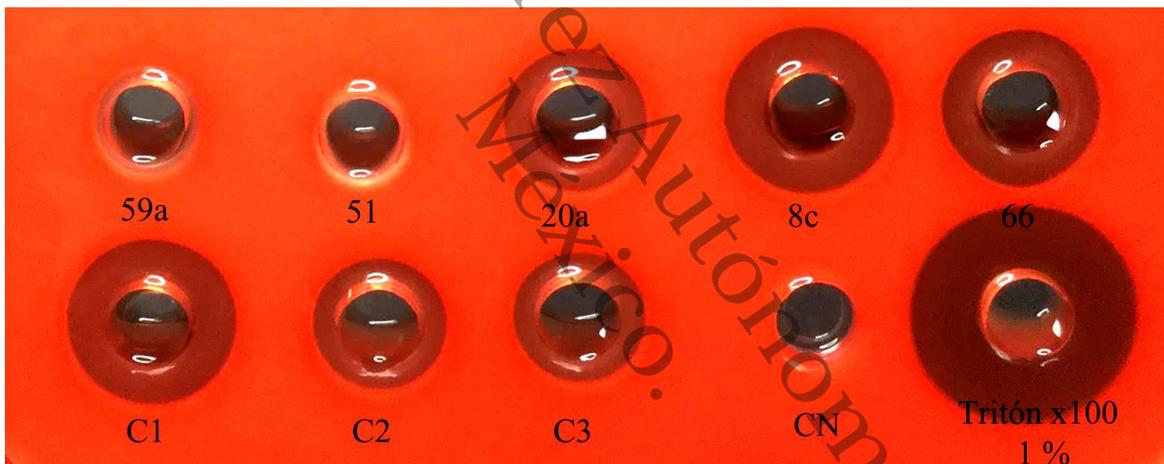


Figura 11. Actividad Hemolítica en placa de Agar Sangre, de las cinco cepas seleccionadas y los tres consorcios.

CN = Control Negativo; como control positivo se usó el Tritón x100 1%.

8.13 Dendrograma de similitud:

Para determinar la similitud entre los resultados de la actividad BS y BE de los diferentes tratamientos (cepas individuales o los consorcios bacterianos), así como también, de las condiciones de cultivo (planctónica y sésil), se realizó un análisis multivariado (Dendrograma de similitud), utilizando el software PAST versión 3.23 (Hammer *et al.*, 2001).

En la actividad biosurfactantes, los resultados de los consorcios son similares con los tratamientos individuales. Solo el grupo 1 se separa del resto de los tratamientos de acuerdo al dendrograma de similitud (Fig. 12), en este grupo se agrupan los tratamientos de las cepas 8c P, 20a P y 66 P, todos planctónicos, que coincide con el mayor diámetro de sus gotas colapsadas (Anexo 4).

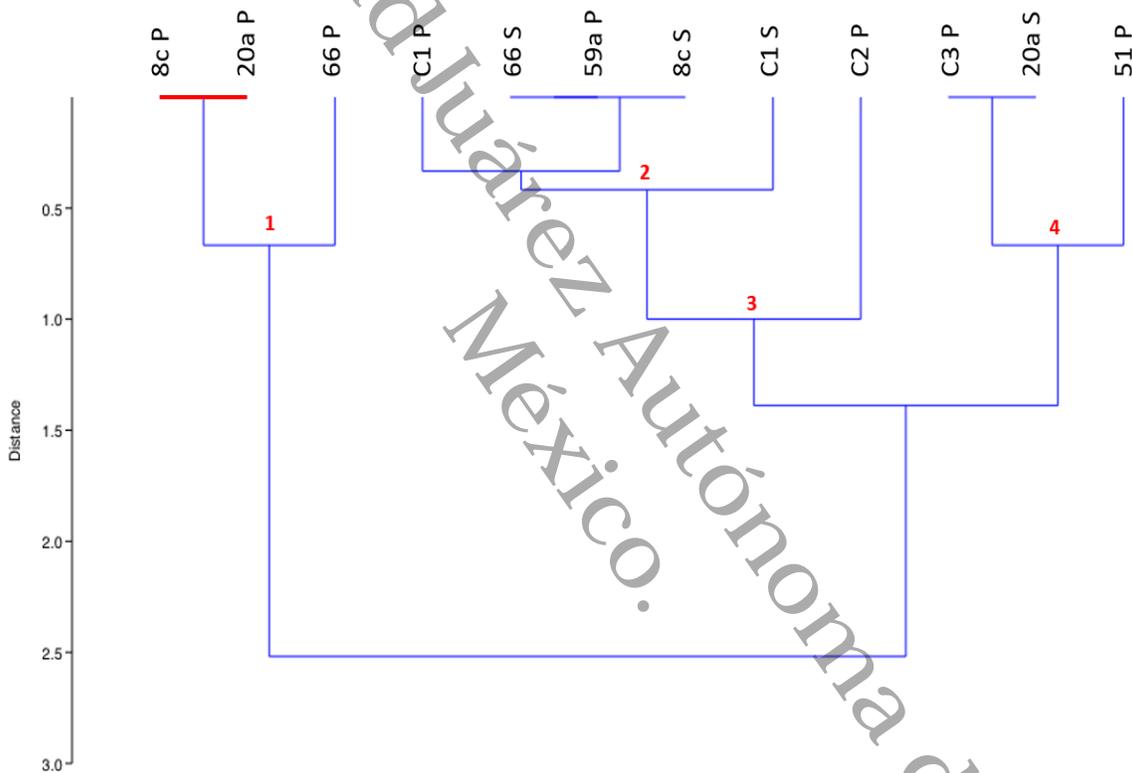


Figura 12. Dendrograma del ensayo de Gota Colapsada. (P = Planctónico; S = Sésil).

Con respecto a la emulsificación de 24h, la cepa 51 en condiciones planctónicas mostró la menor actividad emulsificante (Anexo 4), separándose del resto de tratamientos. Mientras que el grupo 1 del dendrograma de similitud agrupa a los consorcios 2 y 3 bajo condiciones planctónicas (Fig. 13), que coincide con aquellos tratamientos que presentaron los valores IE_{24} mas altos (Anexo 4).

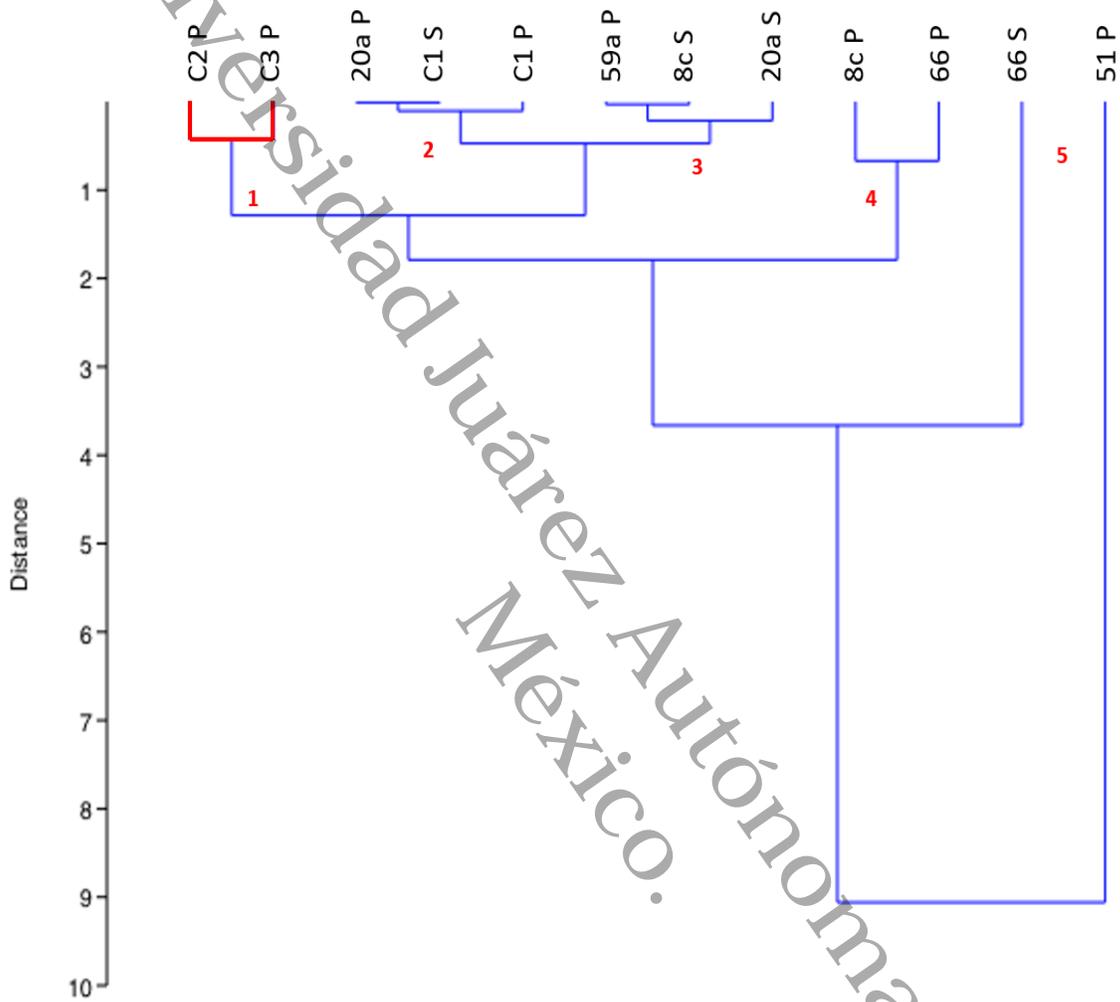


Figura 13. Dendrograma del ensayo de emulsificación. (P = Planctónico; S = Sésil).

9. CONCLUSIONES

Todas las bacterias evaluadas en este trabajo son consideradas como bacterias halotolerantes, debido a su facilidad para crecer en concentraciones de NaCl mayores a 5%. El 61% de las 27 bacterias fueron capaces de crecer por arriba del 10% de NaCl, de las cuales destacan seis, creciendo a una concentración de 17.5% de NaCl, ubicándolas como altamente halotolerantes.

La actividad hemolítica demostró que el 57% de las cepas tienen la capacidad de causar una hemólisis beta, por lo que se consideran como las principales candidatas productoras de BS.

El ensayo de gota colapsada reveló que el 50% de las cepas cumplían con las condiciones de selección produciendo gotas ≥ 4 mm, cepas consideradas como buenas productoras de BS, cuya característica les permite romper la tensión superficial aumentando la superficie de la gota, de entre las cuales destacan dos cepas 44a y S1, con gotas colapsadas de 7 mm de diámetro. Estos datos permiten excluir al 20% de cepas que producen hemólisis debido a metabolitos diferentes a los de naturaleza biosurfactante.

La actividad BE fue determinada por el Índice de Emulsificación a las 24h (IE₂₄), el cual determinó que, de las 44 cepas, 13 (30%) no son buenas para formar emulsiones, cinco (11%) forman emulsiones menores al 30% del IE, nueve cepas (20%) forman emulsificaciones igual o mayor al 40% del IE (actividad media), mientras que 17 cepas (39%) forman emulsiones por arriba del 50% del IE, dentro de las que destacan dos cepas, la S3 y S7 con emulsificaciones mayores al 60% del IE.

Se demostró que las BS presentan, mayormente, cargas negativas (aniónicas), siendo estas un total de 30 cepas. Por el contrario, tan solo siete cepas presentan cargas positivas (catiónicas), y seis de ellas no presentan carga iónica. También se demostró, que una de las cepas parece estar cargada tanto positiva como negativamente, por lo que se piensa que el BS sea de naturaleza zwitterionica o que produzca más de un compuesto con cargas diferentes.

Las diez cepas que pasaron a la siguiente parte del trabajo corresponden a la 8a, 8c, 20a, 28, 35a, 51, 59a, 66, S6 y S9.

Se conformaron tres consorcios, uno triple, uno cuádruple y uno quíntuple, tomando en cuenta el tiempo de producción óptimo de los compuestos BS y BE de las cepas 8c, 20a, 66, 51 y 59a.

El resultado en cultivo planctónico determinó que las cepas individuales son mejores que los consorcios, ya que, las cepas poseen una mejor actividad BS cuando se encuentran individualmente. Por el contrario, la actividad BE fue difícil de definir, debido a que los rangos en los que varían los resultados son muy cercanos.

En el cultivo séstil, se determinó que la eficiencia de producción de compuestos BS y BE no se ve afectada por las condiciones de cultivo, y que, en algunos casos, la actividad disminuye un poco en ambos casos.

Las cepas finales demostraron ser compatibles y tener buena viabilidad para mantenerse en consorcios con bacterias con características diferentes. A pesar de que las combinaciones resultaron no ser las mejores, ya que estas no favorecieron la expresión de una mayor cantidad de los compuestos y el aumento de la actividad BS y BE, tampoco disminuyeron en gran medida la dualidad que presentaban las cepas de manera individual.

El análisis estadístico reveló que, para la prueba de gota colapsada, las cepas individuales y en condiciones planctónicas fueron mejores que las otras muestras, destacando las cepas 8c, 20a y 66 (P). Caso contrario en el ensayo de emulsificación, donde no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Aun así, se destacan los consorcios C2 y C3 en condiciones planctónicas, como los más eficientes o con mayor índice. De esta forma, también se pudo conocer que la cepa 51, obtuvo los resultados más bajos en ambos ensayos.

Las emulsificaciones de todas las muestras (cepas, consorcios y en ambas condiciones de cultivo), son estables en el tiempo.

10. PERSPECTIVAS

Esta investigación revela a través de los resultados obtenidos de actividad BS y BE, que las cepas evaluadas son prometedoras, y se eleva la expectativa de lo que podrán lograr en el futuro al optimizarse los medios y las condiciones de cultivo o al purificar los compuestos que producen. Por lo que es necesario la identificación tanto de las cepas como de los compuestos químicos, esperando que también en el futuro, nuevas fuentes de carbono renovables, se usen para producir estos compuestos a escala industrial, y el costo de producción disminuya, así como la generación de residuos industriales que son desechados.

Siendo este uno de los primeros trabajos realizados con cepas aisladas de cenotes (casi en su totalidad), y habiéndose obtenido resultados prometedores, se abre una nueva línea de investigación para dar pie a trabajos más especializados y promover la bioprospección en sitios que no han sido explorados.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M., & Hassouna, N. A. H. (2008). Characterization of surfactin produced by bacillus subtilis isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150(3), 289–303. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8153-z>
- Acmite Market Intelligence. (2013). Global Surfactant Market. *Market Report*, (1), 610. [https://doi.org/10.1016/S1351-4210\(13\)70306-8](https://doi.org/10.1016/S1351-4210(13)70306-8)
- Agwu, O., & Oluwagunke, T. (2014). Halotolerance of Heterotrophic Bacteria Isolated from Tropical Coastal Waters. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR)*, 16(2), 224–231. Recuperado de [http://gssrr.org/index.php?journal=JournalOfBasicAndApplied&page=article&op=view&path\[\]=2430](http://gssrr.org/index.php?journal=JournalOfBasicAndApplied&page=article&op=view&path[]=2430)
- Al-Ajlani, M. M., Sheikh, M. A., Ahmad, Z., & Hasnain, S. (2007). Production of surfactin from Bacillus subtilis MZ-7 grown on pharmedia commercial medium. *Microbial Cell Factories*, 6, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-17>
- Aparna, A., Srinikethan, G., & Smitha, H. (2012). Production and characterization of biosurfactant produced by a novel Pseudomonas sp. 2B. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.01.043>
- Bach, H., & Gutnick, D. L. (2004). Chapter 9 Potential applications of bioemulsifiers in the oil industry. En *Studies in Surface Science and Catalysis* (Vol. 151, pp. 233–281). [https://doi.org/10.1016/S0167-2991\(04\)80150-2](https://doi.org/10.1016/S0167-2991(04)80150-2)
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2016), 71–79. Recuperado de <http://www.airitilibrary.com/Publication/Index/ywfxb-e201602001>
- Banat, I. M., De Rienzo, M. A. D., & Quinn, G. A. (2014). Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(24), 9915–9929. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6169-6>
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., ... Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 427–444. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0>
- Banat, I. M., Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 495–508. <https://doi.org/10.1007/s002530051648>
- Barros, F. F. C., Simiqueli, A. P. R., de Andrade, C. J., & Pastore, G. M. (2013). Production of Enzymes from Agroindustrial Wastes by Biosurfactant-Producing Strains of Bacillus subtilis. *Biotechnology research international*, 2013, 103960. <https://doi.org/10.1155/2013/103960>
- Bednarski, W., Adamczak, M., Tomasik, J., & Płaszczyk, M. (2004). Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. *Bioresource Technology*, 95(1), 15–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.01.009>
- Bello Gutierrez, J. (2014). *Ciencia Bromatológica*. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos.

- Bodour, A. A., & Miller-Maier, R. M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 32, 273–280.
- Bognolo, G. (1999). Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152(1–2), 41–52. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00684-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00684-0)
- Boulakradeche, M. O., Akretche, D. E., Cameselle, C., & Hamidi, N. (2015). Enhanced Electrokinetic Remediation of Hydrophobic Organics contaminated Soils by the Combinations of Non-Ionic and Ionic Surfactants. *Electrochimica Acta*, 174, 1057–1066. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.06.091>
- Branda, S. S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R., Vik, Å., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13(1), 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>
- Brint, J. M., & Ohman, D. E. (1995). Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *Journal of Bacteriology*, 177(24), 7155–7163. <https://doi.org/10.1128/jb.177.24.7155-7163.1995>
- Burgos-Díaz, C. (2012). *Biotensioactivos producidos por Sphingobacterium detergens sp. nov. : Producción, caracterización y propiedades Sphingobacterium detergens sp. nov. : Tesis.*
- Cameotra, S. S., & Singh, P. (2008). Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 62(3), 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.11.009>
- Campos, J. M., Montenegro Stamford, T. L., Sarubbo, L. A., de Luna, J. M., Rufino, R. D., & Banat, I. M. (2013). Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology Progress*, 29(5), 1097–1108. <https://doi.org/10.1002/btpr.1796>
- Carrillo, P. G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S. I., & Giulietti, A. M. (1996). Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(1), 82–84. <https://doi.org/10.1007/BF00327807>
- Caton, T. M., Witte, L. R., Ngyuen, H. D., Buchheim, J. A., Buchheim, M. A., & Schneegurt, M. A. (2004). Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma. *Microbial Ecology*, 48(4), 449–462. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0211-7>
- Cha, M., Lee, N., Kim, M., Kim, M., & Lee, S. (2008). Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. *Bioresource Technology*, 99(7), 2192–2199. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.035>
- Cooper, D. G., & Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), 224–229. <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., & Cheng, K. J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), 86–95. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0178-86>
- Das, K., & Mukherjee, A. K. (2007). Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap

- carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochemistry*, 42(8), 1191–1199. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.05.011>
- Dastgheib, S. M. M., Amoozegar, M. A., Elahi, E., Asad, S., & Banat, I. M. (2008). Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. *Biotechnology Letters*, 30(2), 263–270. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9530-3>
- de Pascale, D., De Santi, C., Fu, J., & Landfald, B. (2012). The microbial diversity of Polar environments is a fertile ground for bioprospecting. *Marine Genomics*, 8, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2012.04.004>
- de Sousa, M., Dantas, I. T., Felix, A. K. N., de Sant'ana, H. B., Melo, V. M. M., & Gonçalves, L. R. B. (2014). Crude glycerol from biodiesel industry as substrate for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(2), 295–301. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014000200019>
- Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 61(1), 47–64. [https://doi.org/10.1016/S0140-6701\(97\)84559-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6701(97)84559-6)
- Dhiman, R., Meena, K. R., Sharma, A., & Kanwar, S. S. (2016). Biosurfactants and their Screening Methods. *Research Journal of Recent Sciences*, 5(10), 39–43.
- Díaz, M. P., Grigson, S. J. W., & Burgess, J. G. (2002). Uso de un consorcio bacteriano extremo-halotolerante para la biodegradación de crudo en ambientes salinos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 4(1), 36–42.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15(2), 167–19. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167>
- Fan, Y., Tao, W., Huang, H., & Li, S. (2017). Characterization of a novel bioemulsifier from *Pseudomonas stutzeri*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(8), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2326-2>
- Fenical, W. (1993). Chemical Studies of Marine Bacteria: Developing a New Resource. *Chemical Reviews*, 93(5), 1673–1683. <https://doi.org/10.1021/cr00021a001>
- Gautam, K. K., & Tyagi, V. K. (2006). Microbial Surfactants: A Review. *Journal of Oleo Science*, 55(4), 155–166. <https://doi.org/10.5650/jos.55.155>
- González-Hernández, J. C., & Peña, A. (2002). Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (levadura halófila). *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 44(3–4), 137–156.
- Gordon, A. S., & Millero, F. J. (1984). Electrolyte Effects on Attachment of an Estuarine Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(3), 495–499. Recuperado de <http://aem.asm.org/content/47/3/495.abstract%5Cnhttp://aem.asm.org/content/47/3/495.full.pdf>
- Gottfried, A., Singhal, N., Elliot, R., & Swift, S. (2010). The role of salicylate and biosurfactant in inducing phenanthrene degradation in batch soil slurries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(5), 1563–1571. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2453-2>

- Griffin, W. C. (1949). Classification of surface-active agents by "HLB". *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 1(5), 311–326. Recuperado de <http://journal.sconline.org/pdf/cc1949/cc001n05/p00311-p00326.pdf>
- Gudiña, E. J., Pereira, J., Costa, R., Evtuguin, D. V., Coutinho, J., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2015). Novel bioemulsifier produced by a *Paenibacillus* strain isolated from crude oil. *Microbial Cell Factories*, 14(14), 11. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0197-5>
- Hacène, H., Rafa, F., Chebhouni, N., Boutaiba, S., Bhatnagar, T., Baratti, J. C., & Ollivier, B. (2004). Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea Salt lake, Algerian Sahara. *Journal of Arid Environments*, 58(3), 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2003.08.006>
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: PALEONTOLOGICAL STATISTICS SOFTWARE PACKAGE FOR EDUCATION AND DATA ANALYSIS. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 9. Recuperado de http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- Heatley, N. G. (1944). A method for the assay of penicillin. *Biochemical Journal*, 38(1), 61–65. <https://doi.org/10.1042/bj0380061>
- Hezayen, F., Younis, M., Hagaggi, N., & Shabeb, M. (2010). *Oceanobacillus aswanensis* strain FS10 sp. nov., an extremely halotolerant bacterium isolated from salted fish sauce in Aswan City, Egypt. *Global J Mol Sci*, 5(1), 01–06. Recuperado de [http://www.idosi.org/gjms/gjms5\(1\)/1.pdf](http://www.idosi.org/gjms/gjms5(1)/1.pdf)
- Hrenovic, J., & Ivankovic, T. (2009). Survival of *Escherichia coli* and *Acinetobacter junii* at various concentrations of sodium chloride. *EurAsian Journal of Biosciences*, (3), 144–151. <https://doi.org/10.5053/ejobios.2009.3.0.18>
- Ishiguro, M., & Koopal, L. K. (2016). Surfactant adsorption to soil components and soils. *Advances in Colloid and Interface Science*, 231, 59–102. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.01.006>
- Islas, D. J., Medina, S. A., Noel, J., Rodríguez, G., Biotecnología, D. De, P, U. P. D. P. C., ... Sahagún, C. (2010). PROPIEDADES, APLICACIONES Y PRODUCCIÓN DE BIOTENSOACTIVOS, 26(1), 65–84.
- Ivanković, T., & Hrenović, J. (2010). Surfactants in the environment. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 61(1), 95–110. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-61-2010-1943>
- Jain, D. K., Collins-Thompson, D. L., Lee, H., & Trevors, J. T. (1991). A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 13(4), 271–279. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90064-W](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90064-W)
- Jha, S. S., Joshi, S. J., & Geetha, S. J. (2016). Lipopeptide production by *Bacillus subtilis* R1 and its possible applications. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4), 955–964. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.006>
- Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L. R., & Fields, M. W. (2006). Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athallassohaline lake in northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3832–3845. <https://doi.org/10.1128/AEM.02869-05>
- Jimoh, A. A., & Lin, J. (2019). Production and characterization of lipopeptide biosurfactant producing *Paenibacillus* sp. D9 and its biodegradation of diesel fuel. *International Journal of Environmental Science and Technology*, (0123456789). <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02341-3>

- Joy, S., Rahman, P. K. S. M., & Sharma, S. (2017). Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Chemical Engineering Journal*, 317, 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.054>
- Karlapudi, A. P., Venkateswarulu, T. C., Tammineedi, J., Kanumuri, L., Ravuru, B. K., Dirisala, V. ramu, & Kodali, V. P. (2018). Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007>
- Kim, H. S., Jeon, J. W., Lee, H. W., Park, Y. Il, Seo, W. T., Oh, H. M., ... Yoon, B. D. (2002). Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. *Biotechnology Letters*, 24(3), 225–229. <https://doi.org/10.1023/A:1014100422857>
- Kuchma, S. L., Kuchma, S. L., Connolly, J. P., & Connolly, J. P. (2005). A Three-Component Regulatory System Regulates Biofilm Maturation and Type III Secretion in. *Journal of Bacteriology*, 187(4), 1441–1454. <https://doi.org/10.1128/JB.187.4.1441>
- Lasa, I., Pozo, J. L. del, Penadés, J. R., & Leiva, J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 163–176. <https://doi.org/10.4321/S1137-66272005000300002>
- Li, Q., Kang, C., Wang, H., Liu, C., & Zhang, C. (2002). Application of microbial enhanced oil recovery technique to Daqing Oilfield. *Biochemical Engineering Journal*, 11(2–3), 197–199. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00025-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00025-6)
- Liu, J. F., Mbadinga, S. M., Yang, S. Z., Gu, J. D., & Mu, B. Z. (2015). Chemical structure, property and potential applications of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* in petroleum recovery and spill mitigation. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 4814–4837. <https://doi.org/10.3390/ijms16034814>
- López-Ramírez, S., Estrada-Monje, A., & Herrera-Reséndiz, J. R. (2016). Emulsion Copolymerization of Butyl Acrylate and Styrene. *Conciencia Tecnológica*, (January), 32–37. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1391.7204>
- Macleod, R. a. (1965). the Question of the Existence of Specific Marine Bacteria. *Bacteriological reviews*, 29(1), 9–24.
- Madsen, J. K., Pihl, R., Møller, A. H., Madsen, A. T., Otzen, D. E., & Andersen, K. K. (2015). The anionic biosurfactant rhamnolipid does not denature industrial enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00292>
- Maier, R. M., & Soberón-Chávez, G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(5), 625–633. <https://doi.org/10.1007/s002530000443>
- Maneerat, S., & Phetrong, K. (2007). Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 29(3), 781–791.
- Mao, X., Jiang, R., Xiao, W., & Yu, J. (2015). Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 285, 419–435. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.009>

- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5(2), 73–83. <https://doi.org/10.1007/s007920100184>
- Material, R., & Trends, C. (2012). Global Biosurfactants Market Analyzed by Transparency Market Research, *c*, 1–2.
- McArthur, J. V. (2006). *Microbial Ecology: An Evolutionary Approach*. Elsevier/Academic Press.
- Medina-Moreno, S. A., Jiménez-González, A., Gutiérrez-Rojas, M., & Lizardi-Jiménez, M. A. (2013). Hexadecane aqueous emulsion characterization and uptake by an oil-degrading microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 84(October 2013), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.05.018>
- Meseguer, I. (2004). Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología. *Ciencia e Investigación*, VII(2), 13–17.
- Mouafi, F. E., Abo Eloud, M. M., & Moharam, M. E. (2016). Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. *Biotechnology Reports*, 9, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.12.003>
- Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*, 24(11), 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.09.005>
- Mukred, A. M., Hamid, A. A., Hamzah, A., & Yusoff, W. M. W. (2008). Development of Three Bacteria Consortium for the Bioremediation of Crude Petroleum-oil in Contaminated Water. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 8(4), 73–79. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2008.73.79>
- Mulligan, C. N., Yong, R. N., & Gibbs, B. F. (2001). Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: A review. *Engineering Geology*, 60(1–4), 371–380. [https://doi.org/10.1016/S0013-7952\(00\)00117-4](https://doi.org/10.1016/S0013-7952(00)00117-4)
- Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T. K., & Sivachidambaram, P. (2008). Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Curr Sci*, 94(6), 736–774. <https://doi.org/0011-3891>
- Nanjani, S. G., & Soni, H. (2012). Diversity and EPS Production Potential of Halotolerant Bacteria from Veraval and Dwarka. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 2(2), 20–25. <https://doi.org/10.9790/3008-0222025>
- Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (1995). Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Applied and environmental microbiology*, 61(9), 3240–3244. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7574633>
- Nieto, J. J., Fernández-Castillo, R., Márquez, M. C., Ventosa, A., Quesada, E., & Ruiz-Berraquero, F. (1989). Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(9), 2385–2390.
- Nikolaev, Y. A., & Plakunov, V. K. (2007). Biofilm—“City of microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology*, 76(2), 125–138. <https://doi.org/10.1134/S0026261707020014>
- O’Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments*, (47), 10–11. <https://doi.org/10.3791/2437>

- Obelenwa, U. C., Maduako, O. C., & Okoro, chuma C. (2017). Isolation And Characterization of Biosurfactant Producing Bacteria From Nigerian Oil Fields. *Journal of Science and Technology*, 3(2), 56–66.
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 633–654. <https://doi.org/10.3390/ijms12010633>
- Paustenbach, D. J., Panko, J. M., Scott, P. K., & Unice, K. M. (2007). A methodology for estimating human exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA): A retrospective exposure assessment of a community (1951-2003). *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 70(1), 28–57. <https://doi.org/10.1080/15287390600748815>
- Perfumo, A., Smyth, T. J. P., Marchant, R., & Banat, I. M. (2010). Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates. En K. N. Timmis (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (Vol. 78, pp. 1501–1512). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_103
- Peter, J. K., Rao, A. K., & Kumari, R. (2014). Analysis of Individual and Bacterial Consortium of Broth Culture of Pseudomonas Aeruginosa , Serratia Marscecens and Bacillus Subtilis to Emulsify Oils and Hydrocarbons. *International Journal of Research*, 1(7).
- Rahman, K. S. M., Banat, I. M., Thahira, J., Thayumanavan, T., & Lakshmanaperumalsamy, P. (2002). Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresource Technology*, 81(1), 25–32. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00105-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00105-5)
- Reis, R. S., Pacheco, G. J., Pereira, A. G., & Freire, D. M. G. (2013). Biosurfactants: Production and Applications. En R. Chamy (Ed.), *Biodegradation=Life of Science*. <https://doi.org/10.5772/56144>
- Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 1–31. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>
- Saranya, P., Bhavani, P., Swarnalatha, S., & Sekaran, G. (2015). Biosequestration of chromium(III) in an aqueous solution using cationic and anionic biosurfactants produced from two different Bacillus sp.-a comparative study. *RSC Advances*, 5(98), 80596–80611. <https://doi.org/10.1039/c5ra07999c>
- Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., & Chopade, B. A. (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(2), 127–144. <https://doi.org/10.3109/07388550903427280>
- Shah, N., Nikam, R., Gaikwad, S., Sapre, V., & Kaur, J. (2016). Biosurfactant: Types, Detection Methods, Importance and Applications. *Indian Journal of Microbiology Research*, 3(1), 5. <https://doi.org/10.5958/2394-5478.2016.00002.9>
- Sheppard, J. D., & Mulligan, C. N. (1987). The production of surfactin by Bacillus subtilis grown on peat hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27(2), 110–116. <https://doi.org/10.1007/BF00251931>

- Shinoda, K., & Arai, H. (1964). The Correlation between phase inversion temperature in emulsion and cloud point. *The Journal of Physical Chemistry*, 18(1), 3485.
- Shivanand, P., & Mugeraya, G. (2011). Halophilic bacteria and their compatible solutes - osmoregulation and potential applications. *Current Science*. [https://doi.org/10.1016/S0924-9338\(13\)75937-6](https://doi.org/10.1016/S0924-9338(13)75937-6)
- Siegmund, I., & Wagner, F. (1991). New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Techniques*, 5(4), 265–268. <https://doi.org/10.1007/BF02438660>
- Solomon, F. E., & Viswalingam, K. (2013). Isolation, Characterization of Halotolerant bacteria and its biotechnological potentials, 4, 1–7.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Bonaventura, G. D. I., Djukic, S., & Ruzicka, F. (2007). Stepanović2007 biofilm in staph.pdf. *APMIS*, 115(8), 891–899. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Sturman, P. J., Jones, W. L., & Characklis, W. G. (1994). Interspecies competition in colonized porous pellets. *Water Research*, 28(4), 831–839. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)90089-2](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90089-2)
- Suthar, H., Hingurao, K., Desai, A., & Nerurkar, A. (2008). Evaluation of bioemulsifier mediated Microbial Enhanced Oil Recovery using sand pack column. *Journal of Microbiological Methods*, 75(2), 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.06.007>
- Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1), 3–9. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-1-3>
- Tabuchi Yagui, T. R. (2014). *Optimización del uso de agar con cetiltrimetilamonio bromuro y azul de metileno para la selección de cepas de pseudomonas spp. productoras de ramnolípidos*. Universidad Nacional Mayor De San Marcos (Universidad del Perú, Decana de América).
- Tugrul, T., & Cansunar, E. (2005). Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(6–7), 851–853. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-5958-y>
- Tzintzun Camacho, O. (2012). *Estudio de los mecanismos de remoción de hexadecano por los cultivos puros y mixtos derivados de un consorcio bacteriano*. Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
- Uzoigwe, C., Burgess, J. G., Ennis, C. J., & Rahman, P. K. S. M. (2015). Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00245>
- Vaidya, S., Dev, K., & Sourirajan, A. (2018). Distinct Osmoadaptation Strategies in the Strict Halophilic and Halotolerant Bacteria Isolated from Lunsu Salt Water Body of North West Himalayas. *Current Microbiology*, 75(7), 888–895. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1462-8>
- Valdivieso Villegas, A. L. (2018). *Actividad biosurfactante y bioemulsificante por consorcios bacterianos halotolerantes bajo condiciones de cultivos planctónicos*. Universidad de la Sierra Juárez.

- Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2006). Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.08.001>
- Varadavenkatesan, T., & Murty, V. R. (2013). Production of a Lipopeptide Biosurfactant by a Novel *Bacillus* sp. and Its Applicability to Enhanced Oil Recovery. *ISRN Microbiology*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/621519>
- Webb, J. S., Thompson, L. S., James, S., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M., ... Charlton, T. (2003). Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Journal of bacteriology*, 185(15), 4585. <https://doi.org/10.1128/JB.185.15.4585>
- Welsh, D. T. (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(3), 263–290. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00542.x>
- Xochitl Martínez García. (2011). PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES POR MICROORGANISMOS AISLADOS DE SITIOS EXTREMOS Y CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS, 128. Recuperado de https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/23687/MARTÍNEZ_GARCÍA_XOCHITL.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Yan, L., Boyd, K. G., Adams, D. R., & Burgess, J. G. (2003). Biofilm-specific cross-species induction of antimicrobial compounds in bacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 3719–3727. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3719-3727.2003>
- Ying, G. G. (2006). Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International*, 32(3), 417–431. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.07.004>
- Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.001>
- Zhao, J., Dai, C., Ding, Q., Du, M., Feng, H., Wei, Z., ... Zhao, M. (2015). The structure effect on the surface and interfacial properties of zwitterionic sulfobetaine surfactants for enhanced oil recovery. *RSC Advances*, 5(18), 13993–14001. <https://doi.org/10.1039/c4ra16235h>
- Zhu, Y. (2015). n-Hexadecane, Petroleum Diesel and Biodiesel Fuels for a Direct Hydrocarbon Phosphoric Acid Fuel Cell, 1–106. Recuperado de https://ruor.uottawa.ca/bitstream/10393/32460/1/Zhu_Yuanchen_2015_thesis.pdf

12. ANEXOS

Anexo 1. Descripción morfológica de las 44 cepas.

CLAVE	TINCIÓN DE GRAM	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	TEXTURA / ASPECTO	PROPIEDAD ÓPTICA	COLOR
7A	B(-)	Irregular	Ondulado	Plana	Cerosa	Opaca	Blanco/ beige
7a	B(-)	Irregular	Ondulado	Plana	Cerosa	Opaca	Blanco/ beige
8A	B(-)	Irregular	Lobulado	Crateriforme	Rugosa	Opaca	Blanco
8a	B(+)	Irregular	Filamentoso	Crateriforme	Rugosa	Opaca	Blanco
8c	B(+)	Irregular	Lobulado	Crateriforme	Rugosa	Opaca	Blanco
20a	B(+)	Irregular	Ondulado	Crateriforme	Cremosa/ cerosa	Opaca	Blanco
20b	B(+)	Irregular	Lobulado	Crateriforme	Rugosa	Opaca	Blanco
21	B(-)	Irregular	Filamentosa	Pulvinada	Rugosa	Opaca	Blanco
22a	B(-)	Irregular	Filamentoso	Pulvinada	Mucoide	Translucida	Blanco
24	B(-)	Rizoide	Filamentoso	Elevado	Suave	Translucida	Blanco
25a	B(-)	Puntiforme	Liso	Plana	Suave	Opaco	Beige
25b	B(-)	Irregular	Lobulado	Crateriforme	Suave	Opaca	Blanco mate
28	B(-)	Rizoide	Filamentosa	Elevada	Suave	Translucida	Blanco
34a	B(-)	Filamentosa	Ondulada	Umbonado	Suave	Translucida	Blanco hueso
34b	B(+)	Irregular	Ondulado	Plana	Suave/ cremosa	Opaca	Blanco
35	B(-)	Circular	Liso	Plana	Cremosa	Opaca	Blanco brillante
35a	B(-)	Circular	Rizado	Plana	Rugosa	Opaca	Beige
39a	B(-)	Irregular	Ondulado	Convexa	Cremosa	Opaca	Rosa
39b	B(-)	Irregular	Ondulado	Convexa	Cremosa	Opaca	Blanco/rosa
40	C(+)	Puntiforme	Liso	Plana	Cremosa	Opaca	Blanco
43	B(-)	Filamentosa	Ondulado	Umbonado	Mucoide	Translucida	Blanco
44a	B(+)	Irregular	Ondulado	Convexa	Cremosa/cerosa	Opaca	Amarillo/ naranja suave
46	B(-)	Circular	Liso	Convexa	Suave	Transparente	Blanco
51	B(+)	Irregular	Filamentosa	Convexa	Cremosa	Opaca	Blanco/beige

CLAVE	TINCIÓN DE GRAM	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	TEXTURA / ASPECTO	PROPIEDAD ÓPTICA	COLOR
51a	C(+)	Puntiforme	Liso	Plana	Suave	Opaca	Blanco
52	C(+)	Puntiforme	Liso	Convexa	Mucoide	Translucida	Blanco
52b	C(+)	Puntiforme	Liso	Convexa	Creмоса	Opaca	Blanco
54a	C(-)	Circular	Entero	Convexa	Mucoide	Opaca	Blanco/ amarillo suave
59a	CB(-)	Irregular	Ondulado	Convexa	Mucoide	Translucida	Verde (pigmento difusible)
64	B(-)	Irregular	Lobulado	Elevado	Áspera	Opaca	Blanco
66	B(+)	Irregular	Lobulado	Crateriforme	Rugosa	Opaca	Blanco
66a	B(+)	Irregular	Dentada	Crateriforme	Cerosa/mucoide	Opaca	Blanco
72	B(-)	Irregular	Filamentosa	Plana	Mucosa	Translucida	Verde (pigmento difusible)
S1	B(+)	Irregular/Puntiforme	Ondulado	Crateriforme	Áspera	Opaca	Blanca
S2	B(-)	Puntiforme	Liso	Convexa	Creмоса	Opaca	Amarillo
S3	B(-)	Puntiforme	Liso	Plana	Mucosa	Translucida	Naranja
S4	B(+)	Irregular	Ondulado	Plana	Mucoide	Opaca	Beige
S5	B(+)	Rizoide	Ondulado	Convexa	Suave	Translucida	Beige
S6	MC (-)	Puntiforme	Liso	Convexa	Creмоса	Opaca	Blanco
S7	B(-)	Irregular	Lobulado	Convexa	Creмоса	Opaca	Naranja/roja
S8	B(-)	Irregular	Liso	Plana	Creмоса	Translucida	Naranja/roja
S9	B(+)	Irregular/Puntiforme	Ondulado	Crateriforme	Creмоса/cerosa	Opaca	Blanco/beige
S10	B(-)	Irregular	Ondulado	Convexa	Creмоса	Opaca	Naranja
S11	B(-)	Puntiforme	Liso	Convexa	Creмоса	Opaca	Beige

B = bacilo, C = coco, CB = cocobacilo, MC = Micrococo, (+) = Gram positivo, (-) = Gram negativo

Anexo 2. Características de las 44 cepas para la selección de las cepas potenciales.

Clave	Caracterización			Actividad				
	Tolerancia al NaCl %		Carga iónica	Hemólisis	Biopelícula (Absorbancia)	Bioemulsificante (% IE ₂₄)	Estabilidad de las emulsificaciones (%IE)**	Biosurfactante Gota colapsada (mm)
	CST*	AST*						
7A	10	10	C	-	0.16	4.69	0	3
7a	10	10	A	-	0.17	3.56	0	4
8A	15 ^d	10	A	+	0.18	55.83	40	5
8a	10	10	A	++	0.37	58.21	39	5
8c	10	10	A	+	0.40	57.17	57.1	5
20a	15 ^d	10	A	+	0.17	57.93	43.5	5
20b	10	10	A	++	0.10	59.11	59	5
21	15	15	C	++	0.07	37.60	37.5	4
22a	15	15 ^d	A	-	0.30	3.88	0	6
24	10	15 ^d	C	++	1.66	12.45	0	2
25a	10	10	A	-	0.12	3.10	0	2
25b	15	20 ^d	A	++	0.33	2.70	0	4
28	15	20 ^d	A	++	0.41	40.93	0	4
34a	10	15	A	++	0.60	1.86	0	2
34b	10	15	C	-	0.33	2.80	0	5
35	5	10 ^d	C	++	0.22	6.70	0	5
35a	5	15 ^d	A	++	0.2	43.95	0	4
39a	5	5	A	++	0.32	42.28	40	2
39b	5	5	A	++	0.00	36.08	0	2
40	15	20 ^d	A	++	0.46	11.04	0	3
43	17.5	15 ^d	A	++	2.14	4.32	0	3
44a	15 ^d	15-20 ^d	A	++	0.13	3.20	0	7
46	17.5	15-20 ^d	A	-	0.60	8.42	0	3
51	10 ^d	10 ^d	*	++	0.10	59.72	49	3
51a	17.5	20	*	-	0.56	20.02	0	2

Clave	Caracterización			Actividad				
	Tolerancia al NaCl %		Carga iónica	Hemólisis	Biopelícula (Absorbancia)	Bioemulsificante (% IE ₂₄)	Estabilidad de las emulsificaciones (%IE)**	Biosurfactante Gota colapsada (mm)
	CST*	AST*						
S2	17.5 _d	15 ^d	*	++	0.07	47.06	47	4
S2b	17.5 _d	15 ^d	A	+	0.07	57.10	57	5
S9a	5	10 ^d	A	+	0.20	58.31	43	5
S64	5	10 ^d	A	++	0.08	14.80	0	2
S66	15 ^d	10	A	++	1.42	53.97	53.9	6
S66a	15 ^d	10	A	+	0.08	56.91	56.9	5
S72	5	5	A	+	0.20	57.56	57.5	4
S1	15 ^d	15 ^d	A	++	0.20	58.93	58.9	7
S2	17.5 _d	20 ^d	A	++	0.07	55.93	55.9	3
S3	10 ^d	10 ^d	A	+	0.07	65.61	0	2
S4	5	5	A	-	0.20	12.65	0	2
S5	5	5	C	-	0.14	9.03	0	2
S6	5	5	C	++	0.11	50.16	35	2
S7	5	5	A/C	++	0.09	63.72	56.51	3
S8	10	10	*	-	0.07	49.72	0	2
S9	5	10	A	++	0.14	59.07	59	5
S10	5	10 ^d	A	++	0.07	35.26	0	2
S11	5	10	*	-	0.86	7.93	0	4

*CST= Caldo Soya Trypticaseína, *AST = Agar Soya Trypticaseína, d = crecimiento débil, A = aniónico, C = catiónico, (*) = no iónico, A/C = anfotérico, (++) = hemólisis beta, (+) = hemólisis alfa, (-) = hemólisis gamma. **Índice de emulsificación a los 3 meses.

Anexo 3. Estabilidad de las emulsificaciones.

Clave	Índice de emulsificación	Índice de emulsificación
	(24h)	(1 mes)
59a P	56,72	53,33
51 P	47,53	28,51
8c P	55,81	53,70
8c S	56,62	50,14
20a P	57,21	35,55
20a S	56,61	28,14
66 P	55,40	37,40
66 S	53,26	51,85
C1 P	56,98	55,89
C1 S	57,18	36,30
C2 P	58,70	56,66
C3 P	58,02	56,81

(P = Planetónico; S = Sésil)

Anexo 4. Datos usados para el análisis estadístico de los ensayos de Gota Colapsada e Índice de Emulsificación.

Clave	Gota Colapsada (mm)	Índice de emulsificación (24h)
59a P	5 ± 1.00 ^e	56.72 ± 0.24 ^a
51 P	3.3 ± 0.58 ^{abcd}	47.53 ± 15.35 ^b
8c P	7.6 ± 0.58 ^{efghi}	55.81 ± 1.27 ^c
8c S	5 ± 0.00 ^f	56.62 ± 0.17 ^d
20a P	7 ± 1.00 ^{bjk}	57.21 ± 1.28 ^e
20a S	4 ± 0.00 ^{gij}	56.61 ± 1.11 ^f
66 P	7 ± 1.00 ^{clm}	55.39 ± 1.09 ^g
66 S	5.3 ± 0.58	53.26 ± 1.86 ^h
C1 P	6 ± 1.73 ^d	56.98 ± 2.00 ⁱ
C1 S	5 ± 0.00	57.18 ± 0.87 ^j
C2 P	4.6 ± 0.58 ^h	58.69 ± 1.09 ^k
C3 P	4 ± 0.21 ^{ikm}	58.02 ± 0.23 ^l

P = Planctónico; S = Sésil. Promedio (± DE, n = 3) seguido de letras iguales indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Tukey post hoc (P<0.05).