



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**INFLUENCIA DEL TIPO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN Y
ESTABILIDAD DE UN EXOPOLISACÁRIDO BIOEMULSIFICANTE POR
Glutamicibacter sp. XHA18**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

BIOL. JOSÉ LUIS HERRERA CANDELARIO

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DRA. SUSANA DEL CARMEN DE LA ROSA GARCÍA

EN CODIRECCIÓN DE:

DRA. GUADALUPE EUGENIA ZARZA FRANCO

VILLAHERMOSA, TABASCO, MÉXICO. JUNIO 2025



“La forma más cercana a la gloria es esforzarse por ser lo que se desea ser”

-Sócrates



Declaración de Autoría y Originalidad

En la Ciudad de Villahermosa Tabasco, el día 12 de junio del año 2025, el que suscribe, José Luis Herrera Candelario alumno del programa de Maestría en Ciencias Ambientales con número de matrícula 222G25004, adscrito a la División Académica de Ciencias Biológicas, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, como autor de la Tesis presentada para la obtención del grado y titulada **“INFLUENCIA DEL TIPO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN Y ESTABILIDAD DE UN EXOPOLISACÁRIDO BIOEMULSIFICANTE POR *Glutamicibacter* sp. XHA18”** dirigida por la Dra. Susana del Carmen de la Rosa García y la Dra. Guadalupe Eugenia Zarza Franco.

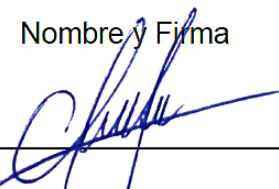
DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la LEY FEDERAL DEL DERECHO DE AUTOR (Decreto por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones de la Ley Federal del Derecho de Autor del 01 de Julio de 2020 regularizando y aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad o contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Villahermosa, Tabasco a 12 de junio de 2025.

Nombre y Firma



José Luis Herrera Candelario



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
División Académica de Ciencias Biológicas



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



2025
AÑO DE LA
Mujer
Indígena

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN

Villahermosa, Tab., a 04 de Junio de 2025

ASUNTO: Autorización de Modalidad de Titulación

C. LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON
JEFE DEL DEPTO. DE CERTIFICACIÓN Y TITULACION
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado, informo a usted, que en base al reglamento de titulación vigente en esta Universidad, ésta Dirección a mi cargo, autoriza al **C. JOSÉ LUIS HERRERA CANDELARIO** egresado de la Maestría en **CIENCIAS AMBIENTALES** de la División Académica de **CIENCIAS BIOLÓGICAS** la opción de titularse bajo la modalidad de Tesis de Maestría denominado: **"INFLUENCIA DEL TIPO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN Y ESTABILIDAD DE UN EXPOLISACÁRIDO BIOEMULSIFICANTE POR *Glutamicibacter sp XHA18*"**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para saludarle afectuosamente.

A T E N T A M E N T E

DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN ACADEMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



C.c.p. - Expediente Alumno de la División Académica
C.c.p.- Interesado



KM. 0.5 CARR. VILLAHERMOSA-CÁRDENAS ENTRONQUE A BOSQUES DE SALOYA
Tel. (993) 358-1500 Ext. 6400 y 6401. e-mail: direccion.dacbiol@ujat.mx

Usar papel reciclado economiza energía, evita contaminación y despilfarro de agua y ayuda a conservar los bosques
www.ujat.mx



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
División Académica de Ciencias Biológicas



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN



2025
AÑO DE LA
Mujer
Indígena

JUNIO 04 DE 2025

**C. JOSÉ LUIS HERRERA CANDELARIO
PAS. DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS AMBIENTALES
P R E S E N T E**

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 le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales titulado: **"INFLUENCIA DEL TIPO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN Y ESTABILIDAD DE UN EXPOLISACÁRIDO BIOEMULSIFICANTE POR *Glutamicibacter sp XHA18*"**, asesorado por la Dra. Susana del Carmen de la Rosa García, sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado integrado por el Dr. Carlos Alfonso Álvarez González, Dra. Violeta Ruiz Carrera, Dra. Susana del Carmen de la Rosa García, Dra. Guadalupe Eugenia Zarza Franco y Dra. Griselda Karina Guillen Navarro.

Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

**DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR**

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



KM. 0.5 CARR. VILLAHERMOSA-CÁRDENAS ENTRONQUE A BOSQUES DE SALOYA
Tel. (993) 358-1500 Ext. 6400 y 6401, e-mail: direccion.dacbiol@ujat.mx

Usar papel reciclado economiza energía, evita contaminación y despilfarro de agua y ayuda a conservar los bosques

www.ujat.mx



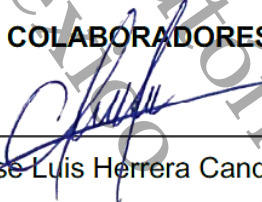
Carta de Cesión de Derechos


Villahermosa, Tabasco a 12 de junio de 2025.

Por medio de la presente manifestamos haber colaborado como AUTOR y AUTORAS en la producción, creación y/o realización de la obra denominada **"INFLUENCIA DEL TIPO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN Y ESTABILIDAD DE UN EXOPOLISACÁRIDO BIOEMULSIFICANTE POR *Glutamicibacter* sp. XHA18"**.

Con fundamento en el artículo 83 de la Ley Federal del Derecho de Autor y toda vez que, la creación y/o realización de la obra antes mencionada se realizó bajo la comisión de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; entendemos y aceptamos el alcance del artículo en mención, de que tenemos el derecho al reconocimiento como autores de la obra, y la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco mantendrá en un 100% la titularidad de los derechos patrimoniales por un período de 20 años sobre la obra en la que colaboramos, por lo anterior, cedemos el derecho patrimonial exclusivo en favor de la Universidad.

COLABORADORES



Biol. José Luis Herrera Candelario


Dra. Susana del Carmen de la Rosa García


Dra. Guadalupe Eugenia Zarza Franco

TESTIGOS


Biol. Isys Nayeli Álvarez Lázaro


Biol. Graciela Pérez Pérez



Villahermosa, Tabasco a 03 de junio de 2025

C. JOSÉ LUIS HERRERA CANDELARIO
EGRESADO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES
PRESENTE

En cumplimiento de los lineamientos de la Universidad, y por instrucciones de la Dirección de Posgrado, se implementó la revisión de los trabajos recepcionales (tesis), a través de la plataforma Turnitin iThenticate para evitar el plagio e incrementar la calidad en los procesos académicos y de investigación en esta División Académica. Esta revisión se realizó en correspondencia con el Código de Ética de la Universidad, el Reglamento General de Estudios de Posgrado, el Código Institucional de Ética para la Investigación y con los requerimientos para los posgrados registrados en el SNP de la SECIHTI.

Por este conducto, hago de su conocimiento que con el objetivo de fortalecer y enriquecer el programa de posgrado, se realizó la revisión del documento en la plataforma iThenticate, obteniendo el reporte de originalidad, el índice de similitud y se emitieron las siguientes sugerencias y recomendaciones para dar seguimiento en el documento de tesis del proyecto de investigación: ***Influencia del tipo de cultivo en la producción y estabilidad de un exopolisacárido bioemulsificante por *Glutamicibacter sp. XHA18****.

OBSERVACIONES:

- 1. El índice de similitud obtenido fue de 04%**, el cual se ubica dentro del estándar de tolerancia de acuerdo a las Políticas y Lineamientos para el uso y manejo del Software Antiplagio de la UJAT. Se demuestra el nivel de originalidad del documento y de la investigación.
- Aun que el índice de similitud obtenido indica 56 coincidencias de 35 fuentes de consulta, éstas se refieren a frases en las secciones de Introducción y métodos, principalmente. Lo anterior no demerita el documento de tesis, pero se recomienda al sustentante y su directora de tesis revisar las oraciones identificadas con similitud y ajustarlas a una redacción propia en la medida de lo posible, e incluir las citas y referencias pertinentes conforme al formato APA vigente.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
División Académica de Ciencias Biológicas



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN

3. **Se adjunta el informe de originalidad de la tesis** obtenido a través de la herramienta Turnitin iThenticate.
4. Finalmente, se le solicita al C. JOSÉ LUIS HERRERA CANDELARIO, integrar en la versión final de tesis, este oficio y el informe de originalidad con el porcentaje de similitud de Turnitin iThenticate de acuerdo con lo señalado en los Lineamientos institucionales para la elaboración de tesis de posgrado.

Sin otro particular al cual referirme, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"

DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR

U.J.A.T.
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN

C.C.P. Dra. Susana del Carmen de la Rosa García. Directora de tesis.
Archivo



KM. 0.5 CARR. VILLAHERMOSA-CÁRDENAS ENTRONQUE A BOSQUES DE SALOYA
Tel. (993) 358-1500 Ext. 6400 y 6401, e-mail: direccion.dacbiol@ujat.mx

Usar papel reciclado economiza energía, evita contaminación y despilfarro de agua y ayuda a conservar los bosques

www.ujat.mx



Influencia del tipo de cultivo en la producción y estabilidad de un exopolisacárido bioemulsificante por *Glutamicibacter* sp. XHA18

INFORME DE ORIGINALIDAD

4%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Internet	91 palabras — < 1%
2	rehip.unr.edu.ar Internet	85 palabras — < 1%
3	www.cio.mx Internet	81 palabras — < 1%
4	www.coursehero.com Internet	62 palabras — < 1%
5	digibug.ugr.es Internet	33 palabras — < 1%
6	buleria.unileon.es Internet	26 palabras — < 1%
7	Eduardo San Martín Martínez. "Avances de investigación en Nanociencias, Micro y Nanotecnologías. Volumen II", Omnia Publisher SL, 2020 Crossref	25 palabras — < 1%
8	eprints.uanl.mx Internet	25 palabras — < 1%



DEDICATORIA

A Dios, por ser la fuente de mi fortaleza y esperanza. A Él le debo cada paso dado, cada meta alcanzada y cada día en el que, aun con incertidumbre, encontré la paz para continuar. Gracias por abrir caminos donde no los había, por sostenerme en silencio cuando todo parecía difícil y por recordarme que los sueños se alcanzan con fe, humildad y constancia.

A mi madre, ejemplo de amor, valentía y entrega. Tus sacrificios, aunque muchas veces silenciosos, me dieron la base y el empuje para seguir adelante. Gracias por enseñarme a luchar con el corazón, por tu apoyo incondicional y por ser mi refugio en cada momento de debilidad. Esta meta es tan tuya como mía.

A mi esposa, compañera de vida y de batallas. Gracias por tu paciencia, tu comprensión en los días largos y por tu amor constante en los días grises. Tu presencia fue luz en medio del cansancio y motivación en cada madrugada de trabajo. Gracias por creer en mí incluso cuando yo dudaba.

A mis hermanos, quienes han sido testigos de este proceso y han estado presentes con su apoyo, palabras de aliento y compañía en los momentos que más lo necesitaba. Cada mensaje, cada gesto y cada muestra de cariño fueron combustible para seguir avanzando.

A mi directora de tesis, por su orientación, compromiso y confianza. Gracias por acompañarme con firmeza y empatía, por impulsar mi crecimiento académico y por enseñarme que detrás del rigor científico también hay humanidad y pasión por formar a otros. Sin su guía, este logro no habría sido posible.

Y a mí, por no rendirme. Por continuar incluso cuando el cansancio pesaba más que las ganas. Por aprender de cada tropiezo y por volver a intentarlo una y otra vez. Porque este camino no fue fácil, pero hoy puedo decir con orgullo que cada esfuerzo valió la pena.

Esta tesis representa no solo un proyecto académico, sino una parte importante de mi historia, escrita con perseverancia, amor y fe.



AGRADECIMIENTO

Expreso mi más profundo agradecimiento al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT)** y al **Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Tabasco (CCYTET)** por el apoyo económico brindado a través de la beca otorgada durante mis estudios de posgrado y la estancia de investigación, sin la cual este trabajo no habría sido posible.

A la **División Académica de Ciencias Biológicas (DACBioI)**, por ser la institución que me acogió durante mis estudios de maestría y por proporcionarme los recursos, la orientación académica y el entorno científico que hicieron posible este trabajo.

A la **División Académica de Ingeniería y Arquitectura (DAIA)**, por las facilidades otorgadas para realizar parte de los análisis experimentales relacionados con mi compuesto de estudio. Su colaboración fue valiosa para ampliar el alcance metodológico de esta investigación.

Extiendo también mi agradecimiento al **Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Unidad Tapachula, Chiapas**, por su hospitalidad y el acompañamiento brindado durante mi estancia de investigación.

A mi **directora de tesis**, la Dra. Susana del Carmen de la Rosa García, por ser guía, mentora y ejemplo. Gracias por su compromiso inquebrantable, por retarme a superarme en cada etapa del proceso, por su mirada crítica que exigía rigor, y por su acompañamiento humano que nunca dejó de alentarme. Este trabajo lleva su huella en cada página.

A mi **codirectora de tesis**, la Dra. Guadalupe Eugenia Zarza Franco, por su orientación, su disposición y sus aportes certeros que enriquecieron esta investigación.

A los miembros de mi **comité revisor**, por su valioso tiempo, por sus observaciones constructivas y por acompañar este proyecto con profesionalismo y respeto. Sus sugerencias ayudaron a perfeccionar cada detalle del trabajo.

Finalmente, a mis **amigos** y **compañeros de laboratorio**, por su camaradería, su ayuda desinteresada y su compañía en los días largos de trabajo. Gracias por compartir conocimientos, espacios y también sonrisas. Este logro también lleva un poco de cada uno de ustedes.



ÍNDICE

DEDICATORIA	ix
AGRADECIMIENTO	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1 CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	3
2 CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	6
2.1 Tensoactivos.....	6
2.1.1 Biosurfactantes.....	6
2.1.2 Bioemulsificantes.....	7
2.2 Producción de biosurfactantes y bioemulsificantes.....	8
2.3 Factores que afectan la producción de biosurfactantes y bioemulsificantes.....	9
2.3.1 Temperatura.....	9
2.3.2 pH.....	10
2.3.3 Salinidad.....	10
2.3.4 Disponibilidad de nutrientes.....	11
2.4 Detección de la actividad biosurfactante y bioemulsificante.....	12
2.5 Cultivos sésiles y planctónicos.....	13
2.6 Impacto ecológico de los tensoactivos.....	14
2.6.1 Tensoactivos sintéticos.....	14
2.6.2 Tensoactivos biológicos.....	14
2.6.3 Uso potencial de tensoactivos biológicos en la industria.....	15
2.7 Demanda global de los tensoactivos.....	16
2.8 Genoma bacteriano.....	16
2.8.1 Rutas metabólicas de los exopolisacáridos.....	17
2.9 Clasificación taxonómica y características generales del género <i>Glutamicibacter</i> 18	
2.10 Producción y regulación de exopolisacáridos en <i>Glutamicibacter</i>	19
2.11 Aplicaciones biotecnológicas y potencial en biorremediación.....	19



2.12	Toxicidad de los tensoactivos sintéticos	20
2.13	Estimulación de germinación en semillas	21
JUSTIFICACIÓN		23
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN		25
HIPÓTESIS		25
OBJETIVOS		26
	Objetivo general	26
	Objetivos específicos	26
3	CAPITULO III: METODOLOGÍA	27
3.1	Selección de cepa	27
3.2	Caracterización morfológica y bioquímica de XHA18	27
3.3	Análisis genómico	28
3.3.1	Extracción de ADN bacteriano	28
3.3.2	Anotación del genoma	29
3.3.3	Análisis filogenético	29
3.4	Cinética de producción de compuestos tensoactivos	31
3.5	Actividad emulsificante	32
3.6	Gota colapsada	32
3.7	Evaluación del efecto de los sustratos en el medio y las condiciones ambientales de cultivo	33
3.8	Capacidad tensoactiva con diferentes sustratos	33
3.9	Estabilidad de la actividad tensoactiva en condiciones de salinidad	34
3.10	Purificación de los compuestos con actividad tensoactiva	34
3.10.1	Compuestos de alto peso molecular	34
3.10.2	Compuestos de bajo peso molecular	35
3.11	Caracterización de compuestos tensoactivos de bajo peso molecular	35
3.11.1	Cromatografía de capa fina	35
3.12	Caracterización de compuestos tensoactivos de alto peso molecular	36
3.12.1	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier	36
3.12.2	Espectroscopía ultravioleta-visible y reflectancia difusa	36
3.12.3	Difracción de rayos X	37
3.12.4	Microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de energía dispersiva	37



3.12.5	Potencial Z	38
3.13	Pruebas toxicológicas en <i>Artemia salina</i>	38
3.14	Ensayo de toxicidad y estimulación en semillas de <i>Cucumis sativus</i>	39
3.15	Análisis estadístico	41
4	CAPITULO IV: RESULTADOS	42
4.1	Caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de XHA18	42
4.2	Ensamblaje y análisis genómico de cepa XHA18	43
4.3	Cinética de la actividad emulsificante	45
4.4	Efecto de los sustratos en la producción y estabilidad de compuestos emulsificantes	46
4.4.1	Dextrosa	47
4.4.2	Peptona	48
4.4.3	Extracto de levadura	49
4.5	Efecto de las condiciones ambientales en la producción y estabilidad de compuestos emulsificantes	51
4.5.1	Velocidad de agitación	51
4.5.2	pH	52
4.5.3	Salinidad	53
4.6	Actividad emulsificante contra diversos sustratos y estabilidad en condiciones de salinidad	54
4.6.1	Actividad y estabilidad emulsificante en cultivo planctónico	54
4.6.2	Actividad y estabilidad emulsificante en cultivo sésil	55
4.7	Emulsificante purificado	56
4.8	Caracterización molecular del compuesto emulsificante purificado	57
4.8.1	Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier	57
4.8.2	Espectroscopía ultravioleta-visible y refractancia difusa	59
4.8.3	Espectroscopía de dispersión de energía por rayos X y microscopía electrónica de barrido	60
4.8.4	Potencial zeta	61
4.9	Ensayos de Citotoxicidad del EPS	62
4.9.1	<i>Artemia salina</i>	62
4.9.2	Germinación de semillas de <i>Cucumis sativus</i>	64
5	CAPITULO V: DISCUSIÓN	67
6	CAPITULO VI: CONCLUSIONES	75



7	CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES.....	77
	BIBLIOGRAFÍA.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.	Estructura molecular de lipopéptidos.....	7
Figura 2.2	Estructura molecular de algunos Bioemulsificantes.....	8
Figura 4.1.	Representación del pleomorfismo observado en la cepa XHA18.	42
Figura 4.2	Árbol filogenético generado a partir de secuencias del gen 16S rRNA.....	43
Figura 4.3.	Árbol filogenético generado a partir de secuencias del genoma.	44
Figura 4.4.	Cinética de emulsificación en cultivos sésiles y planctónicos de Glutamicibacter sp. XHA18.	46
Figura 4.5.	Efecto de la dextrosa en la actividad emulsificante de Glutamicibacter sp. XHA18 en cultivos sésiles y planctónicos.	48
Figura 4.6.	Efecto de la peptona en la actividad emulsificante de Glutamicibacter sp. XHA18 en cultivos sésiles y planctónicos.	49
Figura 4.7.	Efecto del extracto de levadura en la actividad emulsificante de Glutamicibacter sp. XHA18 en cultivos sésiles y planctónicos.	50
Figura 4.8.	Efecto de la agitación en la actividad emulsificante de Glutamicibacter sp. XHA18 en cultivos sésiles y planctónicos.	52
Figura 4.9.	Efecto del pH en la actividad emulsificante de Glutamicibacter sp. XHA18 en cultivos sésiles y planctónicos.	53
Figura 4.10.	Actividad emulsificante del EPS sintetizado por Glutamicibacter sp. XHA18 en cultivo planctónico, evaluada en distintos sustratos hidrofóbicos.	55
Figura 4.11.	Actividad emulsificante del EPS sintetizado por Glutamicibacter sp. XHA18 en cultivo sésil, evaluada en distintos sustratos hidrofóbicos.	56
Figura 4.12.	Espectro FTIR de transmitancia del EPS producido por XHA18.....	59
Figura 4.13.	Espectro de absorción UV-Vis del EPS sintetizado por <i>Glutamicibacter</i> sp. XHA18.	60
Figura 4.14.	Análisis de Energía Dispersiva de Rayos y Microscopía Electrónica de Barrido del EPS sintetizado por Glutamicibacter sp. XHA18.....	61
Figura 4.15.	Evaluación toxicológica de <i>Artemia salina</i> expuesta a diferentes concentraciones de EPS.	63
Figura 4.16.	Efecto del SLC de Glutamicibacter sp. XHA18 en la germinación y crecimiento de semillas de pepino <i>Cucumis sativus</i>	64
Figura 4.17.	Índice de Efecto Relativo (IER) en el crecimiento del tallo y la raíz de <i>Cucumis sativus</i> tratado con SLC.	65



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1. Biosurfactantes y bioemulsificantes producidos por diferentes microorganismos.	9
Tabla 2-2. Métodos más utilizados para la detección rápida de biosurfactantes y bioemulsificantes	12
Tabla 2-3. Aplicaciones de los biosurfactantes y bioemulsificantes en la industria.....	15



LISTA DE ABREVIATURAS

EPS – Exopolisacárido

BE – Bioemulsificante

BS – Biosurfactante

NRPM – Número de Rotaciones por Minuto

RPM – Revoluciones por Minuto

SLC – Sobrenadante Libre de Células

IE₂₄ – Índice de Emulsificación a las 24 horas.

FT-IR –Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (por sus siglas en inglés, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

UV-Vis – Espectroscopía Ultravioleta-Visible (por sus siglas en inglés, *Ultraviolet-Visible Spectroscopy*)

XRD –Difracción de Rayos-X (por sus siglas en inglés, *X-ray Diffraction*).

SEM –Microscopía Electrónica de Barrido (por sus siglas en inglés: *Scanning Electron Microscopy*)

EDS –Espectroscopía de Energía Dispersiva

SDS – Dodecil Sulfato de Sodio (por sus siglas en inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate*).

CTAB – Bromuro de Cetiltrimetilamonio (por sus siglas en inglés, *Cetyltrimethylammonium Bromide*).

OECD –Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (por sus siglas en inglés, *Organisation for Economic Co-operation and Development*).

EPA –Agencia de Protección Ambiental (por sus siglas en inglés, *Environmental Protection Agency*).

FDA – Administración de Alimentos y Medicamentos (por sus siglas en inglés, *Food and Drug Administration*).

GRS – Germinación Relativa de Semillas.

CRR – Crecimiento Relativo de la Radícula.

IG – Índice de Germinación.



ADN – Ácido Desoxirribonucleico.

rADN – Ácido Desoxirribonucleico Recombinante.

PacBio – Biociencias del Pacífico de California (por sus siglas en inglés, *Pacific Biosciences*).

SMRT – Secuenciación en Tiempo Real de una sola Molécula (por sus siglas en inglés, *Single Molecule Real-Time Sequencing*).

TYGS - Servidor de Genomas de Cepas Tipo (por sus siglas en inglés, *Type Strain Genome Serve*).

RAST – Anotaciones Rápidas mediante Tecnología de Subsistemas (por sus siglas en inglés, *Rapid Annotation using Subsystem Technology*).

PROKKA –Anotación rápida del genoma procariota (por sus siglas en inglés, *Prokaryotic Genome Annotation*).

LPSN – Lista de Nombres Procariotas con Posición en la Nomenclatura (por sus siglas en inglés, *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*).

dbCAN – Base de Datos para la Anotación Automatizada de Enzimas Activas en Carbohidratos (por sus siglas en inglés, *Database for automated Carbohydrate-active enzyme ANnotation*).

ANDEVA –Análisis de la Varianza

DE – Desviación Estándar



RESUMEN

Los ambientes prístinos albergan una gran diversidad de microorganismos con propiedades únicas y aún poco exploradas, entre ellas, la capacidad de producir exopolisacáridos (EPS) con propiedades bioemulsificantes, lo cual representa un área de creciente interés biotecnológico en la industria alimentaria, farmacéutica y ambiental. En este estudio, se evaluó el efecto de dos condiciones contrastantes de cultivo (sésil y planctónico), sobre la producción y estabilidad de un compuesto emulsificante. Dicho compuesto fue producido por la cepa halotolerante *Glutamicibacter* sp. XHA18, aislada de un cenote prístino de la península de Yucatán. La producción y estabilidad de este compuesto fue evaluada mediante el índice de emulsificación a 24 h (IE_{24}). Para ello, se ajustaron las condiciones fisicoquímicas en ambos tipos de cultivo, las cuales incluyeron la fuente de carbono y nitrógeno, así como el pH, agitación y salinidad. Posteriormente se aplicaron metodologías específicas para la extracción de compuestos de alto y bajo peso molecular, logrando la purificación de un EPS que fue caracterizado mediante FTIR, UV-Vis, SEM-EDS, XRD y análisis de carga iónica. Los resultados mostraron que el cultivo sésil promovió una mayor actividad emulsificante (IE_{24} 62.09%) en un tiempo menor (24 h) y estable por más de un año. En contraste, el cultivo planctónico (IE_{24} 60.09%) a 96 h, demostró la pérdida progresiva de la emulsificación en el tiempo. En ambas condiciones, la dextrosa y un pH alcalino favorecieron significativamente la producción, mientras que la salinidad afectó negativamente la producción del bioemulsificante. El rendimiento de EPS fue superior en cultivo sésil (2.8 g/L) respecto al planctónico (1.8 g/L), y la caracterización FTIR y el potencial Z confirmaron su naturaleza polisacáridica con una carga negativa, asociada a su capacidad de formar emulsiones estables con diversos sustratos hidrofóbicos incluso en condiciones de salinidad al 5 y 10%. Seguidamente, los ensayos toxicológicos realizados con *Artemia salina* y *Cucumis sativus* confirmaron la baja toxicidad del EPS, con solo efectos mínimos en plántulas a concentraciones elevadas. El análisis genómico reveló que la cepa XHA18 pertenece al género *Glutamicibacter*, pero con diferencias en el contenido de G+C y perfil metabólico respecto a otras cepas disponibles en GenBank, lo que sugiere que podría tratarse de una nueva especie. En conjunto, los hallazgos de este estudio aportan información novedosa sobre la biosíntesis y estabilidad del EPS bioemulsificante en condiciones sésiles, con alto rendimiento y estabilidad, proponiendo a *Glutamicibacter* sp. XHA18 como un recurso biotecnológico promisorio para aplicaciones industriales y ambientales.

Palabras Claves: Metabolitos secundarios, Toxicidad, Bioestimulación, Tolerancia a salinidad, Emulsificaciones.



ABSTRACT

Pristine environments harbor a wide diversity of microorganisms with unique and largely unexplored properties, including the ability to produce exopolysaccharides (EPS) with bioemulsifying activity—an area of growing biotechnological interest in the food, pharmaceutical, and environmental industries. In this study, the effect of two contrasting culture conditions (sessile and planktonic) on the production and stability of an emulsifying compound was evaluated. This compound was produced by the halotolerant strain *Glutamicibacter* sp. XHA18, isolated from a pristine cenote in the Yucatán Peninsula. EPS production and stability were assessed through the 24 h emulsification index (IE₂₄). Physicochemical conditions were optimized in both culture systems, including carbon and nitrogen sources, pH, agitation, and salinity. Specific methodologies were then applied for the extraction of high and low molecular weight compounds, achieving the purification of an EPS that was characterized by FTIR, UV-Vis, SEM-EDS, XRD, and zeta potential analysis. The results showed that the sessile culture promoted higher emulsifying activity (IE₂₄ of 62.09%) in a shorter time (24 h), with stability maintained for over a year. In contrast, the planktonic culture (IE₂₄ of 60.09% at 96 h) showed a progressive loss of emulsification over time. In both conditions, dextrose and alkaline pH significantly favored EPS production, while salinity had a negative effect. The EPS yield was higher in sessile culture (2.8 g/L) compared to planktonic (1.8 g/L). FTIR and zeta potential analysis confirmed the polysaccharide nature of the EPS, with a negative charge associated with its ability to form stable emulsions with various hydrophobic substrates, even under 5–10% salinity. Toxicity assays using *Artemia salina* and *Cucumis sativus* confirmed the low toxicity of the EPS, with only minor effects on seedlings at high concentrations. Genomic analysis revealed that strain XHA18 belongs to the genus *Glutamicibacter* but exhibits differences in G+C content and metabolic profile compared to other strains available in GenBank, suggesting it may represent a novel species. Altogether, the findings of this study provide novel insights into the biosynthesis and stability of bioemulsifying EPS under sessile conditions, with high yield and long-term stability, positioning *Glutamicibacter* sp. XHA18 as a promising biotechnological resource for industrial and environmental applications.

Keyword: Secondary metabolites, Toxicity, Biostimulation, Salt tolerance, Emulsion stability



CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Los exopolisacáridos (EPS) son polímeros de alto peso molecular secretados por una variedad de microorganismos, incluidas las bacterias, que sintetizan moléculas activas (Ates, 2015). Además de carbohidratos, los EPS pueden incluir proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, formando estructuras heterogéneas conocidas como biopelículas (Trilokesh et al., 2024).

Las biopelículas o cultivos sésiles, donde normalmente crece la mayoría de las bacterias, confieren características específicas a los microorganismos que se desarrollan bajo esta condición. Por ejemplo, soportar altas presiones osmóticas, temperaturas extremas y variaciones de pH, además, facilitan las interacciones intercelulares, la transferencia horizontal de genes, la captura de nutrientes, evitan la desecación, entre otras funciones (Funari y Shen, 2022). En comparación con su contraparte, los microorganismos planctónicos, que pueden morir fácilmente al enfrentarse a condiciones de estrés (Samrot et al., 2021). Por tal motivo, la condición de biopelícula juega un papel esencial para obtener ventajas protectoras físicas, fisiológicas y genéticas, así como la producción de diversas moléculas de interés (Yin et al., 2019).

Sin embargo, las propiedades y características de los EPS pueden variar considerablemente dependiendo del tipo de microorganismo y del ambiente en el que se desarrollan (Rana y Upadhyay, 2020). Los microorganismos extremófilos producen compuestos específicos que les ayudan a protegerse de condiciones extremas específicas; por ejemplo, los microorganismos adaptados a condiciones salinas producen compuestos que mantienen las concentraciones de potasio y cloruros equilibradas con respecto a las concentraciones extremas del medio ambiente (Thakur et al., 2022). A pesar de ello, el microbioma marino se encuentra prácticamente inexplorado, pese a ser un ambiente rico y diverso en organismos productores de moléculas activas (Barzkar et al., 2024), por lo que se podría estar ignorando a un sinnúmero de microorganismos adaptados a condiciones específicas.



capaces de producir una amplia gama de moléculas activas únicas, comparado con los ecosistemas terrestres en donde básicamente se han agotado los recursos para el descubrimiento de estas moléculas de interés (Gudiña et al., 2016; Srinivasan et al., 2021).

Dada su capacidad para resistir condiciones extremas, los microorganismos de ambientes extremos, como las bacterias halotolerantes que habitan los cenotes prístinos de la península de Yucatán, son de especial interés. Estos organismos son una fuente prometedora de nuevos biopolímeros que podrían satisfacer la creciente demanda industrial de polímeros naturales con características comparables a los sintetizados a partir de hidrocarburos, pero con mayor estabilidad frente a condiciones adversas (Maldonado-Desena et al., 2022; Stincone y Brandelli, 2020).

Tradicionalmente, la producción industrial de EPS se realiza en cultivos planctónicos, donde los microorganismos crecen en forma libre. Sin embargo, esta metodología puede pasar por alto las condiciones ambientales reales y por ende la restricción en la producción de biomoléculas de interés. La inducción de biopelículas bajo condiciones de cultivos sésiles puede llevar a la obtención de productos extracelulares novedosos (Liu et al., 2010). No obstante, a pesar de la similitud genética entre diferentes cepas, estas pueden sintetizar compuestos con actividades distintas, esto debido a las condiciones ambientales específicas de cada especie (Serrato, 2022). Por eso, los parámetros de fermentación y las condiciones del cultivo pueden modular la producción de polímeros con pesos moleculares definidos para ser adaptados a industrias específicas, (Bonartseva et al., 2017; Ertesvåg, 2015).

En este estudio, se evaluó la producción de un compuesto emulsificante por la cepa halotolerante *Glutamicibacter* sp. XHA18, aislada del cenote prístino X'can ho che ubicado en la península de Yucatán, México 21° 04' 17" N. 89° 36' 26" O (De La Rosa-García et al., 2007) bajo condiciones contrastante de cultivo sésil (formación de biopelícula) y planctónico (vida libre). Se identificaron los tiempos de mayor actividad emulsificante y se evaluaron las condiciones de cultivo, incluyendo la



velocidad de agitación, el pH y la salinidad, así como la composición del medio de cultivo mediante la selección de fuentes de carbono y nitrógeno que favorecieran la producción y estabilidad del compuesto emulsificante. Se determinó que el compuesto con actividad emulsificante correspondía a un exopolisacárido (EPS), el cual fue purificado y caracterizado mediante técnicas espectroscópicas y estructurales (FTIR, UV-Vis, SEM-EDS y XRD), Además, se evaluó la capacidad emulsificante contra diferentes sustratos hidrofóbicos, su estabilidad en condiciones de alta salinidad y su toxicidad en dos modelos in vivo (*Artemia salina* y semillas de *Cucumis sativus*). Los resultados obtenidos destacan el potencial de este biopolímero como una alternativa sostenible en diversas aplicaciones industriales. Conocer el proceso de producción de EPS no solo permite mejorar la eficiencia en la síntesis de estas moléculas bioactivas, sino que también garantiza su viabilidad económica, su carácter no tóxico y su aplicabilidad en sectores como la biorremediación, la biotecnología agrícola y la industria alimentaria.



CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Tensoactivos

Los tensoactivos son compuestos químicos que presentan propiedades anfífilas, es decir, su estructura está compuesta por una porción hidrofóbica y otra hidrofílica y se clasifican según sus características y peso molecular (Ivanković y Hrenović, 2010). Son utilizados ampliamente por distintas industrias como ingrediente principal en muchos de sus procesos, ya que, al ser compuestos solubles, tienen la peculiaridad de reducir la tensión superficial y/o interfacial que existe entre dos compuestos inmiscibles (surfactantes). Es así como, los hidrocarburos pueden solubilizarse en agua y viceversa, así como la capacidad de emulsionar dos compuestos insolubles (emulsificantes). Sin embargo, los tensoactivos aún se producen a partir de hidrocarburos, por ello, existe una creciente preocupación ambiental en la búsqueda de alternativas ecológicas en su producción. Por lo tanto, metabolitos secundarios como los biosurfactantes (BS) y bioemulsificantes (BE) producidos por microorganismos, han ganado el interés de los investigadores (Banat, 1995; Ferreira et al., 2020).

2.1.1 Biosurfactantes

Los BS son compuestos constituidos por una parte hidrófoba y otra hidrofílica, siendo la parte hidrofóbica un ácido graso, mientras que la parte hidrofílica se encuentra constituida por cadenas lineales o cíclicas de aminoácidos, por ello, son biomoléculas con propiedades anfífilas, con una gran diversidad estructural. Se clasifican por su bajo peso molecular como glicopéptidos, fosfolípidos y lipopéptidos (Biniarz et al., 2017). Estos compuestos son biosintetizados por distintas especies de hongos y bacterias, sin embargo, se considera a estas últimas como las principales

sintetizadoras de BS. Los lipopéptidos son el grupo de BS más estudiado, estos se clasifican en tres familias (Fig. 2.1), dependiendo de la estructura cíclica de los péptidos, donde podemos encontrar a la surfactina, fengicina e iturina (Gross y Loper, 2009; Zhao et al., 2017).

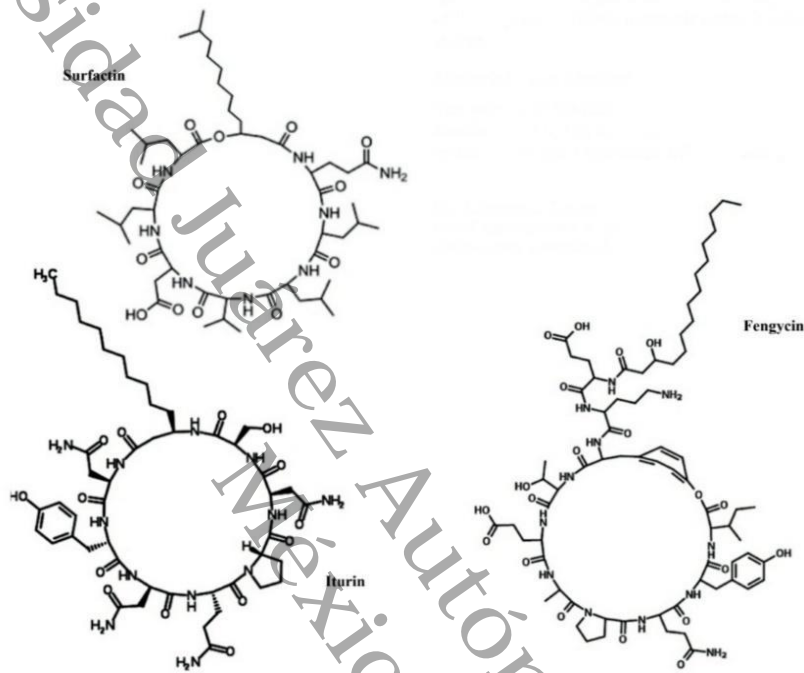


Figura 2.1. Estructura molecular de lipopéptidos. Tomado de (Grabova et al., 2016)

2.1.2 Bioemulsificantes

Los BE son compuestos con un peso molecular mayor que el de los BS, debido a que regularmente están constituidos por heteropolisacáridos, lipopolisacáridos, polisacáridos, lipoproteínas y proteínas (Perfumo et al., 2010; Raiger lustman y López, 2009). Los BE, también son conocidos como biopolímeros de alto peso molecular o exopolímeros. Estos compuestos, con una mayor eficiencia que los BS tiene la capacidad de emulsionar dos compuestos inmiscibles, incluso a bajas concentraciones. Sin embargo, presentan una baja efectividad para reducir la tensión superficial, por lo que se menciona que solo presentan actividad



emulsionante. Por lo tanto, se les han atribuido a sus diversas estructuras químicas (Fig. 2.2) la capacidad de mantener y estabilizar las emulsiones con una gran efectividad por diversos periodos de tiempo (Uzoigwe et al., 2015). Estas emulsificaciones son consideradas estables cuando las micelas mantienen sus propiedades en el tiempo, lo cual se determina cuando el sistema se transforma nuevamente en dos fases separadas (Reyes et al., 2012).

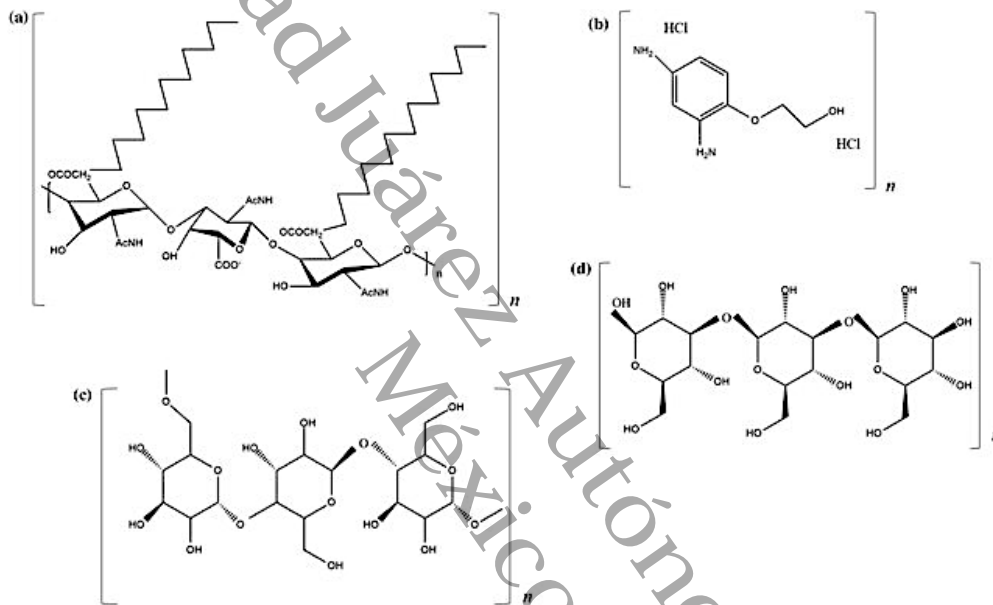


Figura 2.2 Estructura molecular de algunos Bioemulsificantes. a) Emulsano b) Goma xantana c) Pululano d) Curdlan. Tomado de *Rubio-Ribeaux et al., (2023)*

2.2 Producción de biosurfactantes y bioemulsificantes

Los metabolitos secundarios como los BS y BE son el claro ejemplo de las distintas adaptaciones evolutivas que han tenido un sinnúmero de microorganismos, ya que la producción de estas moléculas está relacionada con la necesidad de crear mecanismos de adaptación para enfrentar las condiciones adversas del medio donde se desarrollan (concentraciones elevadas de salinidad, pH, temperatura, entre otras). Por ello, la producción de una matriz extracelular conocida como



biopelícula es una estrategia eficazmente utilizada para enfrentar estas condiciones. Además, tales adaptaciones les permiten obtener su fuente de energía de sustratos inmiscibles en agua, gracias al uso de productos de superficie activa para absorber, emulsionar, humedecer, dispersar o solubilizar un compuesto (Healy et al., 1996; Nikolaev y Plakunov, 2007; Karlapudi et al., 2018). En la Tabla 2.1 se muestran diversos tipos de BS y BE producidos por diferentes microorganismos.

Tabla 2-1. Biosurfactantes y bioemulsificantes producidos por diferentes microorganismos.

Microorganismo	Compuesto	Composición química	Referencia
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG1, <i>Arthrobacter</i>	Emulsano	Polisacáridos y proteínas: enlaces O-éster y N-acilo	(Zuckerberg et al., 1979)
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Alasan	Polisacáridos proteicos (1MDa) con alanina unida covalentemente	(Navon-Venezia et al., 1995)
<i>Antarctobacter</i>	Glicoproteínas	Proteínas y ácidos urónicos	(Gutiérrez et al., 2007a; Gutiérrez et al., 2007b)
<i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682	Yansan	Proteínas, ácidos grasos: ácido palmítico, esteárico, láurico, oleico y monosacáridos: galactosa, glucosa, manosa	(Amaral et al., 2006; Trindade et al., 2008)
<i>Arthrobacter</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Halomonas</i>	Glicolípidos	Glucosa: glucosa, galactosa, etc. Lípidos: ácido caprílico, palmítico, oleico, etc.	(Peng et al., 2007; Pepi et al., 2005; Schulz et al., 1991)
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	Glicolipopéptidos	Carbohidratos, lípidos y proteínas	(Thavasi et al., 2007, 2008)
<i>Bacillus licheniformis</i> BAS50, <i>Azotobacter chroococcum</i>	Lipopéptidos	Lípidos: ácidos grasos que varían de tamaño (de C12 a C17), lineales o ramificados y péptidos: asparagina, valina, leucina, etc.	(Thavasi et al., 2008; Yakimov et al., 1995)

2.3 Factores que afectan la producción de biosurfactantes y bioemulsificantes

2.3.1 Temperatura

La temperatura es uno de los parámetros más importantes en la producción de moléculas de interés, puesto que afecta directamente el crecimiento y desarrollo del



microorganismo. Esto se debe a que el crecimiento de los microorganismos se encuentra delimitado por un rango específico de temperatura (Tripathi et al., 2019). Además, esta variable afecta el metabolismo del microorganismo, ya que para la fermentación de carbohidratos y otros sustratos es necesario una temperatura específica, además, esta debe mantenerse estable durante dicho proceso (de Carvalho, 2018). Por ejemplo, al incubarse a una temperatura mayor a la óptima del microorganismo, podría verse afectada la actividad enzimática, debido a la desnaturalización de las proteínas y/o enzimas esenciales, por ende, se vería afectada la producción de BS y BE (Begum et al., 2023).

2.3.2 pH

Al igual que la temperatura, el pH del medio es crucial para el crecimiento de los microorganismos, puesto que, estos cuentan con un rango específico en el cual pueden crecer, desarrollarse y metabolizar sustratos para incluirlos en su metabolismo (Jimoh y Lin, 2019). Por lo tanto, la producción de BS y BE podría verse afectada sino se proporcionan las condiciones apropiadas de pH en los medios donde se extraen estos compuestos (Bednarski et al., 2004).

2.3.3 Salinidad

Los microorganismos pueden encontrarse en todos los hábitats naturales, desde ambientes dulceacuícolas hasta ambientes extremos con altas concentraciones de sal como lo es el mar muerto, la principal diferencia entre estos microorganismos serán las estrategias que poseen para adaptarse a las diferentes condiciones extremas (Oren, 2002). Los microorganismos capaces de crecer en ambientes con altas y bajas concentraciones salinas están agrupados en función a su capacidad para soportar ciertas cantidades de sal presentes en el medio en que se encuentran y comúnmente se clasifican en halotolerantes moderados y halotolerantes extremos



(Soria, 2004). La composición lipídica de la membrana plasmática y la inclusión de metabolitos compatibles como los BS y los BE son los responsables de la tolerancia a las elevadas presiones osmóticas. Sin embargo, la producción de estos compuestos podría verse afectada en organismos halófilos, los cuales dependen estrictamente de altas concentraciones salinas requeridas por el microorganismo (Russell, 1989; Margesin y Schinner, 2001).

2.3.4 Disponibilidad de nutrientes

La biosíntesis, propiedades y rendimiento final de BS y BE varía considerablemente dependiendo de la composición y tipo de cultivo en el que el microorganismo se desarrolla al momento de secretar estos compuestos (Rana y Upadhyay, 2020). Por ejemplo, se lograrán obtener una variedad de compuestos activos cuando la fuente de carbono sea diversa; sin embargo, esto no es sinónimo de un medio nutricionalmente rico o adecuado; por lo que dependerá estrictamente de la capacidad del microorganismo para asimilar los compuestos disponibles en el medio (Ehlers y Luthy, 2003). Por otra parte, una diversidad nutricional en la fuente de nitrógeno proporcionará las distintas composiciones y características representadas en los BS y BE (Begum et al., 2023).



2.4 Detección de la actividad biosurfactante y bioemulsificante

Existen diversos métodos para detectar la actividad de los tensoactivos biológicos, estos métodos se basan principalmente en el análisis físico de los compuestos producidos. Los métodos más conocidos son: la actividad hemolítica, la prueba de gota colapsada, prueba de dispersión del aceite, índice de emulsificación, placa de agar azul o placa de agar CTAB, el método de agar de superposición de hidrocarburos, entre otros (Shah et al., 2016). Algunos métodos presentan ventajas o desventajas sobre otros (ver Tabla 2.2) ya que la mayoría de estos se basan en comprobar la actividad superficial/interfacial del sobrenadante de los cultivos, mientras que otros se basan en identificar la hidrofobicidad que se encuentra en la superficie celular (Walter et al., 2010).

Tabla 2-2. Métodos más utilizados para la detección rápida de biosurfactantes y bioemulsificantes.

Método de detección	Ventaja	Desventaja
Actividad hemolítica	Fácil de usar para detectar BS	Método no específico, ya que detecta enzimas líticas y factores virulentos que muestran comportamientos similares a los BS
Prueba de gota colapsada	Específico para detectar BS	No detecta bajas concentraciones de BS y suele generar falsos negativos
Agar azul	Fácil interpretación de resultados para detectar BS	Solo detecta grupos específicos de BS
Índice de emulsificación	Facilidad de aplicación para detectar BE	Método no específico, ya que detecta compuestos similares a BS y BE
Ensayo de emulsificación	Detección rápida de BE	Requiere equipos específicos para realizar la metodología
Ensayo de turbidez	Tiempo reducido de aplicación para detectar BE	Requiere equipos específicos de espectroscopia



2.5 Cultivos sésiles y planctónicos

En el medio ambiente, generalmente las bacterias viven y se desarrollan en dos tipos de crecimiento, uno donde estos microorganismos nadan y/o se desplazan libremente en el medio (planctónicas) y otro donde existe la creación de estructuras heterogéneas donde los microorganismos son rodeados por una matriz polimérica extracelular (mayormente polisacáridos) conocida como biopelícula. En esta, las comunidades sésiles se adhieren a superficies inertes (por ejemplo, rocas, troncos, vidrios, plástico, etc.) u orgánicas (por ejemplo, piel, cutícula, mucosa, etc.) con el fin de obtener mejores condiciones (Moreno-Paz et al., 2010; William Costerton et al., 1995). El cultivo planctónico, permite que estos microorganismos se dispersen y colonicen nuevos entornos. En contraste, la condición sésil, permite que las colonias regularmente constituidas por diferentes tipos de bacterias vivan de manera coordinada y prolongada, lo cual permite de manera significativa su proliferación (Berlanga y Guerrero, 2016). Las bacterias que se desarrollan en biopelículas son de principal interés para la industria biotecnológica, puesto que se encuentra activa la búsqueda de compuestos novedosos (por ejemplo, biosurfactantes, bioemulsificantes, etanol, entre otros) que son sintetizados por microorganismos bajo este tipo de crecimiento (Mukherjee et al., 2006). El desarrollo de los microorganismos dentro de una matriz polimérica extracelular ofrece una mayor protección frente a las condiciones adversas y agentes xenobióticos, lo que podría convertirlos fácilmente en cepas resistentes (Imfeld y Vuilleumier, 2012; Nickzad y Déziel, 2014), por esta razón, el 99.9% de las bacterias se desarrollan en biopelículas en una amplia gama de superficies ambientales (Donlan y Costerton, 2002).



2.6 Impacto ecológico de los tensoactivos

2.6.1 Tensoactivos sintéticos

En general, para la remediación de sitios contaminados con hidrocarburos, se utilizan moléculas sintéticas conocidas como tensoactivos o surfactantes (Mao et al., 2015). Sin embargo, al ser moléculas complejas derivadas del petróleo, su particular persistencia en el ambiente y su alta toxicidad, solo representan una remediación parcial o temporal del sitio (Reis et al., 2013). Además, el uso de los surfactantes en procesos industriales suele generar dos tipos de contaminantes: subproductos derivados de la misma actividad industrial y los remanentes de los surfactantes empleados, convirtiéndose ambos en contaminantes peligrosos para el medio ambiente, puesto que los remanentes son difícilmente biodegradados y por lo regular, consumen más energía del sistema donde son aplicados en comparación a los BS y/o BE (Edwards et al., 2003)

2.6.2 Tensoactivos biológicos

Con el interés de proteger el medio ambiente, actualmente existe una constante búsqueda de moléculas de origen biológico que posean características similares a los surfactantes sintéticos, que puedan producirse a gran escala utilizando como sustratos diversas fuentes renovables, pero que además se produzcan en tiempos cortos (Biniarz et al., 2017). En este sentido, los tensoactivos biológicos o mejor conocidos como biosurfactantes y/o bioemulsificantes ya son considerados una alternativa ecológica para los tensoactivos sintéticos, puesto que se consideran biomoléculas ecológicas, de fácil degradación y menos tóxicas que su contraparte sintética, denotando un sinfín de estructuras, propiedades y funciones, dentro de las cuales se incluyen: antimicrobianas, antitumorales, antivirales, emulsionantes,



solubilizantes, dispersantes, humectantes, entre otras (Banat et al., 2010; Kaur Walia y Swaranjit Singh, 2015).

2.6.3 Uso potencial de tensoactivos biológicos en la industria

Los BS y BE cuentan hoy en día con una amplia gama de aplicaciones en diversas industrias importantes, donde destacan la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica, teniendo mayor presencia en la industria petrolera, ya que estas biomoléculas son utilizadas para recuperación de petróleo en suelos y para biorremediación por contaminación de este. A pesar de ello, cumplen funciones distintas respectivamente en cada industria las cuales se describen en la Tabla 2.3 (Santos et al., 2016).

Tabla 2-3. Aplicaciones de los biosurfactantes y bioemulsificantes en la industria. Tomado de (Santos et al., 2016)

Industria	Aplicación	Uso/rol de los BS y BE
Petróleo	Recuperación mejorada de petróleo (MEOR) y desemulsificación	Emulsificación de aceites, descenso de tensión interfacial, solubilización de aceites, reducción de viscosidad, dispersión de aceites, humectación de superficies sólidas, esparcimiento, detergencia, formación de espuma, inhibición de corrosión en equipos.
Alimentaria	Emulsificación y desemulsificación; Ingrediente funcional	Solubilización de aceites aromatizados, control de consistencia, emulsificación, humectante, esparcimiento, detergencia, espumante, espesante.
Farmacéutica	Microbiológico; Productos farmacéuticos y terapéuticos	Agentes anti-adhesivos, agentes antifúngicos, agentes antibacterianos, agentes antivirales, vacunas, terapia génica, moléculas inmunomoduladoras.
Agrícola	Biocontrol y fertilizantes	Humectación, dispersión, suspensión de plaguicidas y fertilizantes en polvo, emulsificación de soluciones de plaguicidas, facilitación de los mecanismos de control biológico de microbios, eliminación de patógenos de plantas y aumento de la biodisponibilidad de nutrientes para microbios beneficiosos.
Cosmética	Productos de salud y belleza	Emulsificantes, espumantes, solubilizantes, humectantes, limpiadores, antimicrobianos, mediadores de la acción enzimática.



2.7 Demanda global de los tensoactivos

Pese a que el uso de los tensoactivos sintéticos representa un constante peligro para el medio ambiente, las propiedades y diversas aplicaciones con las que cuentan estas moléculas, han permitido que el mercado global de estos compuestos se encuentre en constante aumento. Para el año 2021 el valor aproximado del mercado era de \$ 45,450 millones de dólares (mdd) mientras que en el 2023 la demanda se estimó en \$ 54,700 mdd y dado a que presenta un crecimiento anual del 5.8%, se estima que para el año 2030, el mercado alcance los \$ 81,000 mdd (Acmite, 2024; Research y Markets, 2024)

Sin embargo, con el interés de proteger el medio ambiente a nivel mundial, y a pesar de que los surfactantes sintéticos son más económicos, la demanda global de los surfactantes biológicos también va en ascenso. Para julio de 2024 la demanda se registró en \$ 32,488 mdd y se espera que para 2030 alcance los \$ 60,112 mdd, con una tasa de crecimiento anual compuesta del 10.7 %, puesto que los tensoactivos biológicos ya son considerados una alternativa a los surfactantes sintéticos (Research & Markets, 2024)

2.8 Genoma bacteriano

El genoma bacteriano comprende el material completo del material genético presente en la célula de una bacteria. Contiene la información necesaria para regular los procesos básicos de la célula, responder a estímulos ambientales, así como para la producción de metabolitos primarios y secundarios (Bender et al., 2018). Este material genético se encuentra comúnmente contenido en un cromosoma circular, aunque ciertas especies pueden incluir estructuras conocidas como plásmidos y elementos extra cromosómicos que por lo regular están ligadas a ventajas adaptativas como la resistencia a antibióticos o la producción de compuestos especializados (García-Vallve et al., 2000; Oliveira et al., 2016).



Los análisis genómicos permiten comprender los mecanismos bioquímicos y fisiológicos que intervienen en la producción de compuestos bioactivos, como antibióticos biosurfactantes, bioemulsificantes, entre otros (Kaur y Dey, 2023). Estos análisis se basan en identificar las vías metabólicas responsables de biosíntesis de estos compuestos, así como para diseñar estrategias para optimizar su producción (Antoniou et al., 2015).

2.8.1 Rutas metabólicas de los exopolisacáridos

Los EPS desempeñan funciones estructurales y protectoras, además facilitan la adhesión celular y formación de biopelículas, siendo estas características particularmente útiles en distintas industrias biotecnológicas (Freitas et al., 2011). Desde el punto de vista genómico, la síntesis de estos compuestos está marcada por rutas metabólicas específicas, dentro de las cuales destacan las rutas Wzx/Wzy, ABC (ATP-binding cassette) y sintasa, siendo la primera la más estudiada en microorganismos productores de EPS (Schmid et al., 2015).

El proceso de síntesis en la vía Wzx/Wzy inicia con la activación de azúcares simples por medio de enzimas conocidas como glucosiltransferasas, las cuales transfieren residuos de azúcares activados a lípidos transportadores en la membrana citoplasmática. Seguidamente, proteínas transportadoras Wzx translocan las unidades repetidas de polisacáridos a través de la membrana, posteriormente, proteínas Wzy catalizan la polimerización de las unidades repetidas para formar cadenas largas de polisacáridos. Finalmente, los polisacáridos son liberados al exterior de la célula o en su caso, permanecen anclados a la membrana formando estructuras protectoras (Islam y Lam, 2014; Schmid et al., 2015; Whitfield, 2006).

Estudios recientes han demostrado que la producción de EPS puede ser inducida por condiciones ambientales específicas o a través de modificaciones genéticas, lo



que resalta la importancia de un análisis detallado del genoma bacteriano en cepas de importancia biotecnológica con el fin de identificar y optimizar las rutas de síntesis de estos compuestos (Upadhyaya et al., 2025; Y. Wang et al., 2023).

2.9 Clasificación taxonómica y características generales del género *Glutamicibacter*

El género *Glutamicibacter*, previamente clasificado como *Arthrobacter*, pertenece a la familia Micrococcaceae y al orden de los Actinomycetos (Busse, 2016). Se compone de bacterias aeróbicas, Gram positivas y catalasa-positivas, con una morfología celular variable que cambia de bacilos en cultivos jóvenes a formas cocoides en cultivos envejecidos, un fenómeno conocido como pleomorfismo (Karthik et al., 2023). Esta plasticidad fenotípica les confiere una gran adaptabilidad a diversas condiciones ambientales. El género incluye tan solo 13 especies validadas internacionalmente en la Lista Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature, siendo *Glutamicibacter protophormiae* la especie tipo (LPSN, 2025).

Las especies de *Glutamicibacter* han sido aisladas de una amplia gama de entornos, incluidos suelos contaminados con metales pesados, aguas industriales, el tracto intestinal de mamíferos, muestras clínicas y productos lácteos (Karthik et al., 2023; Monnet et al., 2010; Yamamoto et al., 2017). Su capacidad para colonizar estos nichos ecológicos se atribuye a su versatilidad nutricional y su resistencia a condiciones extremas de estrés ambiental, características típicas de los Actinomycetos (Das et al., 2020). Estas propiedades han despertado un creciente interés biotecnológico, particularmente en la producción de compuestos bioactivos con aplicaciones industriales y ambientales (Karthik et al., 2023).



2.10 Producción y regulación de exopolisacáridos en *Glutamicibacter*

Los Actinomicetos representan uno de los grupos microbianos más importantes en la producción de metabolitos secundarios con aplicaciones biotecnológicas, destacándose por su producción de antibióticos, enzimas hidrolíticas, inmunosupresores y compuestos con propiedades antitumorales (János Bérdy, 2005; Qin et al., 2011). En particular, el género *Glutamicibacter* ha sido identificado como un productor de exopolisacáridos (EPS) con actividades biológicas de interés, incluyendo propiedades antioxidantes, prebióticas y antiinflamatorias (Li et al., 2015; Xiong et al., 2020). Además, se ha reportado su capacidad para la biosorción de metales pesados, lo que lo hace un candidato prometedor para aplicaciones de biorremediación (Shuhong et al., 2014).

A pesar de la creciente evidencia sobre la producción de EPS en *Glutamicibacter*, los estudios sobre su aplicación en procesos de emulsificación y estabilización de hidrocarburos son escasos. Mientras que otros Actinomicetos, como *Rhodococcus* y *Gordonia*, han sido ampliamente estudiados por su capacidad para producir biosurfactantes y bioemulsificantes (Mohammed et al., 2021; Ta-Chen et al., 2008), los estudios en *Glutamicibacter* son limitados. Esto representa una brecha en el conocimiento que podría explorarse para el desarrollo de nuevos agentes bioemulsificantes sostenibles.

2.11 Aplicaciones biotecnológicas y potencial en biorremediación

El interés en los EPS como agentes bioemulsificantes ha crecido significativamente debido a su capacidad para mejorar la biodisponibilidad de hidrocarburos en procesos de biorremediación (Ron y Rosenberg, 2001). Además, los EPS pueden



actuar como agentes en el tratamiento de aguas residuales, lo que amplía su campo de aplicación en la industria ambiental

La exploración de EPS producidos por *Glutamicibacter* en entornos con alta salinidad y la evaluación de su estabilidad en estos medios podrían proporcionar información clave sobre su viabilidad en aplicaciones industriales. Si se confirma que estos EPS poseen actividad bioemulsificante y tolerancia a la salinidad, podrían representar una alternativa ecológica a los surfactantes sintéticos utilizados en la industria petrolera y en la remediación de ecosistemas contaminados (More et al., 2014).

2.12 Toxicidad de los tensoactivos sintéticos

Los tensoactivos sintéticos o surfactantes actualmente se emplean en diversos procesos domésticos e industriales debido a sus diversas propiedades fisicoquímicas. Sus aplicaciones van desde la producción de detergentes industriales, pinturas, productos farmacéuticos, de aseo y cuidado personal, incluso son utilizados para ciertos procesos de recuperación de petróleo y en la minería (Collivignarelli et al., 2019; Moura et al., 2019; Ramprasad y Philip, 2016).

Sin embargo, estos son considerados uno de los contaminantes emergentes más desafiantes de eliminar del medio ambiente, puesto que el uso desmedido y elevado de estos compuestos y sus derivados afectan directamente la dinámica natural de los microorganismos en el ambiente, alterando los ciclos biogeoquímicos, los procesos de crecimiento y reproducción de ciertos organismos (Badmus et al., 2021). Por ejemplo, el cloruro de benzalconio y el sulfonato de alquilbenceno lineal son comúnmente utilizados para la producción de detergentes y suavizantes de telas, así como de productos de cuidado personal (Brycki et al., 2017; Moura et al., 2019; Watson et al., 2012). Estos compuestos, o sus derivados, llegan con facilidad a las plantas de tratamiento de aguas residuales, las cuales en muchos casos no tienen



la capacidad de removerlos por completo, permitiendo su liberación directa al ambiente (Bautista-Toledo et al., 2014; Camacho-Muñoz et al., 2014). Por ello, anteriormente se reportó que los tensoactivos sintéticos se encuentran en aguas superficiales y residuales en concentraciones que varían desde los 10 a más de 1000 $\mu\text{g/L}$ (X. Wang et al., 2023). Estos compuestos, por lo general aumentan la solubilidad de los contaminantes disponibles en el medio por lo que facilitan la eutrofización de los mantos acuíferos (Zanoletti et al., 2017), de igual forma, ocasionan un gran impacto bioquímico, patológico, fisiológico, entre otros, en organismos acuáticos y terrestres (Zhu et al., 2018). Se ha demostrado que estos compuestos provocan irritación en la piel y problemas respiratorios en organismos terrestres y disminuyen la resistencia al estrés ambiental en organismos acuáticos, afectando directamente en los procesos de crecimiento y reproducción de estos (Collivignarelli et al., 2019).

Por ello, la toxicidad que presentan los tensoactivos sintéticos se ha convertido en una preocupación mundial, generado regulaciones gubernamentales sobre su producción, uso y eliminación, debido a su casi nula biodegradabilidad y alteración al medio ambiente (R. F. Nunes y Teixeira, 2022).

2.13 Estimulación de germinación en semillas

El sector agrícola enfrenta el desafío de incrementar la producción de alimentos para abastecer a una población en constante crecimiento, la cual se estima alcanzará 9,700 millones de personas para el año 2050 (OCDE-FAO, 2024). Sin embargo, el uso intensivo de recursos naturales como agua, suelo, aire y energía en la agricultura genera una considerable huella ambiental. Por ello, es fundamental optimizar las prácticas agrícolas actuales mediante estrategias sostenibles que minimicen el impacto ambiental sin comprometer la productividad (Awika, 2011).



En este contexto, la estimulación de semillas ha surgido como una estrategia innovadora para promover la germinación, el desarrollo temprano de plántulas y su resistencia a condiciones ambientales adversas (Liu et al., 2023). Actualmente, existen diversos métodos de estimulación, entre los que destacan el uso de bioestimulantes, tratamientos físicos (radiación y ultrasonido), y la inoculación directa de microorganismos o compuestos bioactivos producidos por estos (Gong et al., 2024; Li et al., 2019). Estas estrategias han demostrado ser eficaces para potenciar la germinación y promover un crecimiento uniforme en los cultivos agrícolas. Además, han permitido reducir la dependencia de agroquímicos sintéticos, mejorando la absorción de nutrientes y favoreciendo el establecimiento exitoso de los cultivos, lo que en consecuencia ha minimizado el impacto ambiental del sector agrícola (Ruzzi et al., 2024).

Entre estos enfoques, los bioestimulantes de origen microbiano han mostrado un notable potencial para mejorar la germinación, el crecimiento y la tolerancia de las plantas al estrés ambiental. Sus mecanismos de acción incluyen la solubilización de nutrientes esenciales, la modulación del microbiota del suelo y la inducción de respuestas de defensa en las plantas (Du Jardin, 2015; Rouphael y Colla, 2020). Además, se ha propuesto que la inoculación de compuestos microbianos podría favorecer la expresión de genes asociados a la tolerancia al estrés hídrico y salino, aumentando así la resiliencia de las plantas en entornos desfavorables (Vurukonda et al., 2016).

Por otro lado, los bioemulsificantes han sido ampliamente estudiados por su capacidad para estabilizar emulsiones entre fases inmiscibles, facilitando la degradación de compuestos hidrofóbicos, como los hidrocarburos (Pacwa-Płociniczak et al., 2016). Sin embargo, otros estudios han revelado que estos compuestos también pueden desempeñar un papel positivo en la promoción del crecimiento vegetal, otorgándoles un doble beneficio: contribuir tanto a la biorremediación ambiental como a la mejora del rendimiento agrícola (Dias y Nitschke, 2023; Sachdev y Cameotra, 2013).



JUSTIFICACIÓN

El uso excesivo de tensoactivos sintéticos derivados de hidrocarburos se ha popularizado debido a su amplia gama de aplicaciones y bajos costos de producción. Sin embargo, su naturaleza genera impactos ambientales negativos, contribuyendo a la contaminación de ecosistemas y afectando el equilibrio ecológico. Estas sustancias suelen ser persistentes en el medio ambiente, lo que incrementa los riesgos para la biodiversidad y la salud humana. En paralelo, las actividades antropogénicas han intensificado los problemas ambientales, destacando la necesidad urgente de desarrollar alternativas sostenibles que minimicen el impacto ecológico.

En este contexto, los exopolisacáridos (EPS) producidos por microorganismos como *Glutamicibacter* representan una solución prometedora. Estas biomoléculas con actividad biosurfactante (BS) y bioemulsificante (BE) no solo son capaces de sustituir a los tensoactivos convencionales, sino que además ofrecen ventajas significativas: son biodegradables, estables bajo condiciones extremas (altas temperaturas, salinidad y pH) y pueden ser utilizados en la remediación de sitios contaminados. Además de su papel en la remediación ambiental, estos EPS han demostrado ser inocuos para los organismos vivos y, en algunos casos, estimulantes para el crecimiento de las plantas, lo que amplía su potencial de aplicación en sectores como la agricultura sostenible.

Es esencial también que estas biomoléculas puedan producirse en tiempos cortos y con medios de cultivo económicos, asegurando su viabilidad comercial y contribuyendo a una industria más respetuosa con el medio ambiente. Sin embargo, la producción de EPS está influenciada por las condiciones proporcionadas por el cultivo, es así como el uso de los cultivos sésiles promueve la formación de biopelículas, ofrecen un entorno favorable para la síntesis de compuestos más estables y en mayores cantidades, en comparación con los cultivos planctónicos.



Este estudio busca evaluar el efecto de las condiciones de cultivo en la síntesis de EPS bioemulsificantes estables producidos por *Glutamicibacter* sp. XHA18, una cepa halotolerante aislada de un cenote prístino en la península de Yucatán. La investigación no solo se enfoca en su capacidad para remediar ambientes contaminados, sino también en demostrar que estos EPS son seguros para el entorno y con posible actividad bioestimulante, impulsando el crecimiento de las plantas. Dada la escasez de estudios sobre la producción de EPS en el género *Glutamicibacter*, este trabajo aporta conocimiento clave para el desarrollo de alternativas sostenibles que combinen remediación ambiental, aplicaciones agrícolas y viabilidad industrial.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México



PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo influye la composición del medio de cultivo, así como las condiciones de cultivo sésil y planctónico en la producción y estabilidad de los metabolitos con actividad emulsificante producidos por *Glutamicibacter* sp. XHA18, y cuál es su potencial para aplicaciones biotecnológicas en entornos de alta salinidad?

HIPÓTESIS

La producción y estabilidad de exopolisacáridos (EPS) con actividad emulsificante por *Glutamicibacter* sp. XHA18 se ve favorecida bajo condiciones sésiles (formación de biopelícula) en comparación con condiciones planctónicas, y puede ser significativamente influenciada por factores fisicoquímicos del cultivo, tales como la fuente de carbono, nitrógeno, pH, velocidad de agitación y concentración salina. Se espera que la combinación de estas condiciones lleve a la síntesis de emulsificantes estables, con potencial aplicación en la biorremediación en ambientes extremos.



OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la producción e identificar los metabolitos con actividad emulsificante producidos por *Glutamicibacter* sp. (XHA18) en cultivos sésiles y planctónicos, así como analizar su estabilidad y seguridad para su potencial aplicación industrial

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los sustratos y los parámetros ambientales sobre la producción y estabilidad de metabolitos con actividad emulsificante por *Glutamicibacter* sp. XHA18, comparando condiciones de cultivos sésiles y planctónicos.
- Analizar las propiedades de los metabolitos responsables de la actividad emulsificante de *Glutamicibacter* sp. XHA18 producidos en condiciones de cultivos sésiles y planctónicos.
- Identificar y caracterizar preliminarmente los compuestos responsables de la actividad emulsificante producidos por *Glutamicibacter* sp. XHA18.
- Examinar la citotoxicidad de los compuestos con actividad emulsificante producidos por *Glutamicibacter* sp. XHA18 en *Artemia salina* y semillas de *Cucumis sativus*.



CAPITULO III: METODOLOGÍA

3.1 Selección de cepa

De un estudio previo, se aislaron cepas halotolerantes provenientes de dos cenotes prístinos de la península de Yucatán, México. Estas cepas fueron seleccionadas por su capacidad para producir compuestos biosurfactantes y bioemulsificantes estables frente a condiciones salinas (De La Rosa-García et al., 2007). Entre estas cepas se encuentra XHA18, cuya identificación taxonómica preliminar, basada en la secuenciación del gen 16S rDNA y análisis mediante el servidor BLAST, la ubicó como *Paenibacillus* sp. (Maldonado-Desena et al., 2022). Este análisis se realizó a través del alineamiento de secuencias contra la base de datos del GenBank, siguiendo los criterios estándar de homología genética. (Sayers et al., 2024). Particularmente, esta cepa se seleccionó debido a su alto porcentaje de emulsificación y por ser capaz de mantener la estabilidad de estas emulsificaciones frente a condiciones de salinidad (Maldonado-Desena et al., 2022). El cultivo se encuentra en condiciones de ultracongelación en TSA (Agar Soya Trypticaseína; MCD LAB®) + glicerol (REACTIVO BAKER®ACS) al 15% a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el Laboratorio de Microbiología Aplicada de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

3.2 Caracterización morfológica y bioquímica de XHA18

Para evaluar la morfología de la cepa XHA18, esta se reactivó en placas de TSA a una temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, después de 24 h de incubación se registraron características como tamaño, color, textura y forma de las colonias mediante microscopía óptica y tinción de Gram.

Adicionalmente, se llevaron a cabo pruebas bioquímicas para determinar la actividad metabólica de la cepa, como la presencia de la enzima catalasa, utilizando peróxido de hidrógeno al 1% y la capacidad de utilizar citrato como única fuente de



carbono mediante la prueba de Simmons. Asimismo, se analizó su capacidad de hidrólisis de macromoléculas como almidón, lecitina, caseína y urea, siguiendo las metodologías descritas por MacFaddin (2000).

3.3 Análisis genómico

3.3.1 Extracción de ADN bacteriano

Con el fin de identificar taxonómica y filogenéticamente a la cepa de estudio, se extrajo el ADN bacteriano de XHA18. Para ello, se tomó una colonia bacteriana para su inoculación en 5 mL de medio Luria-Bertani (LB, Sigma-Aldrich). La cepa se incubó a 36 °C con agitación constante a 150 rpm por un período de 48 horas. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 6000 RPM durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante. El pellet bacteriano fue resuspendido en 300 µL de buffer de lisis AL del kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen), al cual se añadieron 5 µL de proteinasa K (20 mg/mL). Luego, los extractos de la cepa XHA18 fueron incubados a 56 °C por 30 minutos, tras lo cual se agregaron 200 µL adicionales de buffer AL y se mantuvo la incubación bajo las mismas condiciones durante 10 minutos más. Siguiendo las indicaciones del fabricante, el ADN se recuperó en 60 µL de buffer de elución AE. Para verificar su integridad, se emplearon 2 µL del ADN eluido en una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, mientras que su cuantificación se llevó a cabo mediante espectrofotometría UV-Vis en un NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific™), considerando un índice de absorbancia 260/280 nm como criterio de calidad. La extracción del ADN bacteriano fue realizada por la Maestra Verónica García Fajardo en El Colegio de la Frontera Sur, Departamento de Ciencias de la Sustentabilidad, Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Agroecológica.

Se utilizaron los protocolos sugeridos por PacBio® barcoded multiplexed library preparation para la preparación de las bibliotecas. Para la secuenciación se utilizó



la plataforma PacBio® Sequel II 8M SMRT Cell Run, en modo HiFi dejando correr la película por 30 horas, con el Single Molecule, Real-Time (SMRT) Sequencing en Maryland Genomics de la Universidad de Maryland. Se lograron obtener secuencias largas y con el HiFi (Highly accurate long reads) se obtuvieron las secuencias de consenso circular. Maryland Genomics ensambló el genoma con el software Canu versión 2.2 (Koren, et al., 2017).

3.3.2 Anotación del genoma

Se utilizaron dos diferentes herramientas bioinformáticas de anotación genómica para identificar las secuencias codificantes de XHA18: a) RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology versión 2.0; disponible en <https://rast.nmpdr.org/>) y b) Prokka (Prokaryotic Karyotype Annotator, versión 1.14.6)

3.3.3 Análisis filogenético

El análisis filogenético de la cepa XHA18 que originalmente se encontraba clasificada como un miembro del género *Paenibacillus* con número de acceso ON600579 al GenBank (Maldonado-Desena et al., 2022), experimentó un cambio en su clasificación debido a un análisis más detallado que incluyó la secuenciación de su genoma. El genoma ensamblado se cargó a la plataforma bioinformática gratuita: Type (Strain) Genome Server (TYGS) disponible en <https://tygs.dsmz.de> para realizar un análisis taxonómico más robusto basándose en el genoma completo (Meier-Kolthoff y Göker, 2019). La nomenclatura, sinonimia y la literatura taxonómica asociada fue proporcionada por la “List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature” (LPSN) disponible en <https://lpsn.dsmz.de> (Meier-Kolthoff et al., 2022). Los resultados para la identificación taxonómica de XHA18 se obtuvieron de TYGS el 13 de febrero de 2023. El análisis de TYGS se realizó en múltiples secciones, las cuales incluyeron:



a) La determinación de cepas tipo estrechamente relacionadas. Esta sección se realizó en dos pasos complementarios; como primer paso, todas las cepas tipo disponibles en la base de datos de TGYS se compararon contra el genoma de XHA18 mediante el algoritmo MASH. Además, se realizó una aproximación de la relación intergenómica (Ondov et al., 2016) y se ubicaron las diez cepas tipo con las distancias MASH más pequeñas elegidas manualmente. El segundo paso para esta sección fue ubicar las cepas tipo estrechamente relacionadas mediante la secuenciación del gen 16S rRNA, el cual fue extraído de los datos genómicos utilizando RNAmmer y BLASTed (Camacho et al., 2009; Lagesen et al., 2007) para ser comparadas contra la secuencia del gen 16S rRNA de cada una de las cepas tipo registradas en la base de datos de TGYS. Ambos pasos se complementaron para encontrar las mejores 50 cepas tipo que mejor coincidían (teniendo en cuenta la puntuación de bits). Para calcular las distancias precisas, se utilizó el enfoque de filogenia a distancia (GBDP) según el algoritmo de cobertura y la fórmula de distancia d_5 (Meier-Kolthoff et al., 2013); finalmente, estas distancias se utilizaron para determinar los 10 genomas tipo más cercanos a XHA18.

b) Comparación por pares de secuencias del genoma. En esta sección, para la inferencia filogenómica, las comparaciones resultantes por pares entre los genomas se realizaron usando GBDP y las distancias intergenómicas precisas inferidas por el algoritmo 'trimming' y la fórmula de distancia d_5 . Los valores de DDH y los intervalos de confianza se obtuvieron mediante la configuración recomendada del GGDC 3.0 (Meier-Kolthoff et al., 2013, 2022).

c) Interferencia filogenética. En esta sección, se utilizaron las distancias intergenómicas para deducir un árbol filogenético equilibrado a través de FASTME 2.1.6.1. (Lefort et al., 2015) El árbol fue visualizado con PhyD3 (Kreft et al., 2017).

d) Agrupación de especies y subespecies tipo. Esta última sección incluyó la agrupación de especies tipo basadas en un rango de dDDH de un 70%, las subespecies se realizaron bajo un umbral del 79% de dDDH (Meier-Kolthoff, Hahnke, et al., 2014). Con el fin de conocer las proteínas involucradas en el metabolismo de



XHA18, se realizó una búsqueda en la base de datos de dbCAN disponible en <https://bcb.unl.edu/dbCAN2/>

3.4 Cinética de producción de compuestos tensoactivos

Para determinar cuál es el tiempo de mayor actividad emulsificante de la cepa XHA18 en cultivo sésil, se inocularon botellas Duran que contenían el medio agarizado EPD (Extracto de Levadura (3003-E DIBICO®) 1.0 g/L, Peptona Bacteriológica (MCD LAB®) 5.0 g/L y Dextrosa Anhidra (CTR Scientific®) 30.0 g/L, modificado de Busse (2016b). El inóculo se preparó ajustando la cepa de trabajo a una densidad óptica (DO) de 0.590 a una longitud de onda de 550 nm. Posteriormente, se incubó durante 96 h en un sistema rotatorio con un agitador de rodillos para frascos/tubos (Mod. 88881003 Thermo Scientific™) a 7 número rotaciones por minuto (NRPM) a 35 °C.

En paralelo, para los cultivos planctónicos, se prepararon matraces con 90 mL de medio EPD e inoculados con 10 mL de un cultivo de 24 h. ajustado a una DO de 0.230 a 550 nm. Los matraces se incubaron a 120 RPM en un agitador orbital (Mod. SHKE6000 MaxQ™ 6000 Thermo Scientific™) a 35 °C durante 96 h (Maldonado-Desena et al., 2022). Durante este periodo, se realizó un muestreo cada 24 h en ambos sistemas de cultivo, para evaluar la actividad emulsificante, hasta completar las 96 h.

Las muestras obtenidas fueron centrifugadas a 3500 RPM y 4 °C durante 30 min utilizando una centrífuga refrigerada (Mod. NU-C200R NUAIRE®), obteniendo sobrenadantes libres de células (SLC). La capacidad tensioactiva de la cepa se evaluó como se describe en las secciones 3.5 y 3.6. Este experimento se realizó por triplicado para cada SLC.



3.5 Actividad emulsificante

El índice de emulsificación (IE_{24}) es una técnica comúnmente utilizada para conocer la capacidad emulsificante de un compuesto. Para tal efecto, se mezclaron en un tubo de ensayo 2 mL de SLC de XHA18 y 2 mL de diésel, el cual funge como un sustrato hidrófobo, posteriormente este fue agitado vigorosamente con vortex (Mod. SI-0236 Vortex-Genie II Mixer) durante 2 min. La emulsión resultante se dejó reposar en completa obscuridad durante 24 h, pasado este tiempo el IE_{24} fue definido como la altura de la emulsificación dividida por la altura total expresada como un valor porcentual aplicando la ecuación 1 (Cooper y Goldenberg, 1987). Se consideraron emulsificaciones estables cuando estas mantuvieron el tamaño de las micelas pequeñas y el mismo índice de emulsificación luego de un mes. Cada prueba se realizó por triplicado para cada SLC y se reportó en porcentaje de emulsificación.

$$IE_{24} = \frac{\text{Altura de la capa emulsificada (mm)}}{\text{Altura total de la columna del líquido (mm)}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

3.6 Gota colapsada

Con el fin de conocer la capacidad tensoactiva de los compuestos de bajo peso molecular de la cepa, en cada pozo de cubiertas de microplacas de 96 pocillos, se depositaron y estabilizaron durante 24 h en una superficie nivelada 3 μL de aceite mineral. Posteriormente, fueron colocados 5 μL del SLC de la cepa para formar una gota sobre la capa de aceite, un minuto después estas fueron evaluadas visualmente observando el tamaño y la morfología de la gota. Este experimento fue corrido por octuplicado para cada SLC y se reportó en mm.



3.7 Evaluación del efecto de los sustratos en el medio y las condiciones ambientales de cultivo

Con el objetivo de evaluar la influencia de distintos sustratos del medio en la producción y estabilidad de compuestos emulsificantes, se aplicó un diseño factorial que incluyó tres variables: dextrosa, peptona y extracto de levadura con cinco niveles cada una. Estas variables fueron seleccionadas debido a que se ha comprobado que son determinantes para la producción de compuestos tensoactivos, ya que fungen como fuente de carbono y nitrógeno (Arayes et al., 2023). Se realizaron 125 combinaciones con las diferentes variables en las diferentes concentraciones: dextrosa (0%, 0.5%, 1%, 1.5% y 2%), peptona (0 g, 2.5 g, 5 g, 7.5 g y 10 g) y extracto de levadura (0 g, 0.5 g, 1 g, 1.5 g y 2 g) bajo condiciones planctónicas y sésiles, las cuales fueron evaluadas al tiempo de mayor producción de compuestos tensoactivos. De igual modo, se realizó un diseño factorial para evaluar las condiciones ambientales de cultivo, las variables evaluadas en este diseño fueron el pH (5.60, 6.60, 7.60 y 8.60), velocidad de agitación (sésil: 4,7 y 10 NRPM, planctónico: 120, 150 y 180 RPM) y salinidad (0%, 0.5%, 1 %, 1.5% y 2 %) ya que de igual forma estas variables son determinantes para la producción de estos compuestos, puesto que permiten la oxigenación del medio. Todos los experimentos se evaluaron por triplicado bajos las distintas condiciones de cultivo utilizando diésel como sustrato hidrófobo para las pruebas descritas anteriormente en las secciones 3.5 y 3.6.

3.8 Capacidad tensoactiva con diferentes sustratos

Con el fin de evaluar la actividad/estabilidad emulsificante contra diferentes sustratos, se utilizaron distintos compuestos hidrofóbicos (Hidrocarburos/aceites) contra el SLC de HXA18. Se utilizaron los siguientes sustratos: aceite de motor nuevo, aceite de motor quemado, diésel, petróleo, hexadecano, hexano y xileno,



estos sustratos se seleccionaron de acuerdo con (Dastgheib et al., 2007; Suresh Kumar et al., 2007; Gudiña et al., 2015). La capacidad tensoactiva se evaluó mediante una versión modificada del protocolo de (Cooper y Goldenberg, 1987), para ello, se mezcló (1:1) el SLC y los diferentes sustratos en tubos de ensayo, la mezcla se agitó durante dos minutos a velocidad alta utilizando un vortex (Vortex-Genie II Mixer SI-0236). Seguidamente, los tubos mezclados se dejaron reposar en completa obscuridad a temperatura ambiente durante 24 h. Pasado este tiempo se midió la actividad emulsificante para cada sustrato.

3.9 Estabilidad de la actividad tensoactiva en condiciones de salinidad

Para verificar la estabilidad de los compuestos producidos por la cepa XHA18 en condiciones de salinidad, los SLC se ajustaron a 2.5% y 5.0% de NaCl respectivamente y se probaron contra los sustratos mencionados anteriormente para nuevamente ser evaluada la actividad tensoactiva como se describe en las secciones 3.5 y 3.6.

3.10 Purificación de los compuestos con actividad tensoactiva

A partir de las condiciones que mostraron resultados representativos en términos de actividad tensoactiva, se llevó a cabo la purificación de los compuestos de alto y bajo peso molecular, siguiendo los procedimientos detallados en esta sección.

3.10.1 Compuestos de alto peso molecular

Siguiendo el protocolo de (Cerning et al., 1994) con pequeñas modificaciones, se obtuvieron los SLC de ambos cultivos por centrifugación a 3500 RPM a 4 °C durante 30 min, seguidamente se mantuvo la temperatura de los SLC a 100 °C durante 15



min. Con el fin de inactivar las enzimas que degradan a estos tipos compuestos, una vez enfriados los SLC, se añadieron lentamente tres volúmenes de etanol previamente enfriado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a cada uno de estos y se dejaron en agitación constante durante 72 h para precipitar a los tensoactivos presentes. Pasado este tiempo, cada solución etanólica se centrifugó con el fin de obtener los compuestos tensoactivos de alto peso molecular, los cuales se lavaron dos veces con etanol enfriado y se disolvieron en agua desionizada. Por último, la solución disuelta se dializó durante 72 h mediante una membrana de diálisis Spectra/Por (Spectrum®) de 12 a 14 KDa. El concentrado recuperado de la diálisis se liofilizó y se pesó para conocer el rendimiento obtenido.

3.10.2 Compuestos de bajo peso molecular

Para la extracción de los compuestos de bajo peso molecular producidos por la cepa XHA18, al tiempo de mayor producción de los tensoactivos en las diferentes condiciones de cultivo (sésiles y planctónicas) se obtuvo el SLC por centrifugación del cultivo a 3500 RPM a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. El SLC fue ajustado a pH 2 con HCl 6 M, el cual fue dejado en agitación por 24 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posterior a ello, el SLC ajustado nuevamente fue centrifugado a 3500 RPM durante 30 min; el precipitado se congeló y liofilizó obteniendo así el extracto crudo, y este se pesó para conocer el rendimiento obtenido (Smyth et al., 2010).

3.11 Caracterización de compuestos tensoactivos de bajo peso molecular

3.11.1 Cromatografía de capa fina

Los extractos crudos obtenidos se eluyeron en placas de cromatografía de capa fina (CCF) con el fin de ubicar el factor de retención (R_f : distancia recorrida por el



compuesto entre la distancia recorrida por el disolvente) de los metabolitos con actividad superficial. Para ello, 200 μg del extracto crudo se disolvieron en metanol y se aplicaron en placas de base de aluminio impregnadas con 0.2 mm de sílica Gel 60F254, posteriormente las placas se eluyeron en un sistema de disolventes: butanol: metanol: agua (nBuOH:MeOH:H₂O, 3:2:1). Se realizaron tres placas para revelar la naturaleza de los compuestos, una con el reactivo de ninhidrina al 2% (péptidos), otra con azul de molibdeno para determinación de fosfolípidos, y la tercera con solución de Molish para los carbohidratos (Das et al., 2008; Burgos-Díaz et al., 2011).

3.12 Caracterización de compuestos tensoactivos de alto peso molecular

3.12.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Para determinar los grupos funcionales del compuesto purificado se utilizó el método estandarizado infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR). Para ello, 2 mg del extracto purificado se mezclaron con bromuro de potasio y se prensaron hasta crear una pastilla, esta se analizó con un espectrómetro infrarrojo acoplado con transformada de Fourier (FT-IR), (Nicolet iS50, Thermo Fisher Científico), en modo de absorbancia y en la región infrarrojo medio, a una longitud de 3700-500 cm^{-1} . Los espectros se adquirieron con 32 scans mediante una resolución de 16 cm^{-1} (Gudiña et al., 2016).

3.12.2 Espectroscopía ultravioleta-visible y reflectancia difusa

Las propiedades ópticas del emulsificante purificado se midieron mediante espectroscopía de reflectancia difusa UV-Vis empleando un espectrofotómetro



(Shimadzu UV-2600) con una esfera integradora en un rango de 200-800 nm utilizando Ba_2SO_4 como referencia.

3.12.3 Difracción de rayos X

La estructura cristalina del compuesto purificado de *Glutamicibacter* sp. XHA18 se analizó mediante difracción de rayos X (DRX). Para ello, se utilizó un difractómetro D8 Advance (Bruker AXS) equipado con un detector LynxEye y radiación $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), operando en geometría Bragg-Brentano. Los parámetros de adquisición incluyeron un tamaño de paso de 0.02° , un tiempo de integración de 5 s y un intervalo de barrido de $10^\circ \leq 2\theta \leq 90^\circ$.

3.12.4 Microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de energía dispersiva

La estructura microscópica y las propiedades superficiales del emulsificante purificado se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de energía dispersiva. Para ello, se depositaron 5 mg del compuesto purificado sobre una cinta de carbono y se recubrieron con una fina capa de oro mediante pulverización catódica. Posteriormente, las muestras fueron observadas utilizando un microscopio electrónico de barrido de alta resolución (MEB-AR, JEOL JSM-7600F, JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Las imágenes se adquirieron a aumentos de 200x y 500x para evaluar la morfología y la distribución de las estructuras del compuesto. La composición elemental se determinó mediante análisis de energía dispersiva.



3.12.5 Potencial Z

Con el fin de determinar la carga superficial del compuesto purificado, se realizó la medición de potencial zeta utilizando un analizador de tamaño de partícula Zetasizer (Malvern Instruments, modelo ZS). Para ello se empleó una celda capilar DTS de 0.75 mL con electrodos en ambos extremos. La muestra se preparó a una concentración de 0.5 mg/mL utilizando agua desionizada como medio dispersante y fue analizada por triplicado.

3.13 Pruebas toxicológicas en *Artemia salina*

Se realizó la prueba de ecotoxicidad aguda del tensoactivo purificado en nauplios de *Artemia salina*, puesto que es un organismo comúnmente utilizado para las pruebas toxicológicas, debido a su corto tiempo de vida, facilidad de cultivo, alta disponibilidad, bajo costo y, además, no se requieren grandes cantidades del compuesto a evaluar (Libralato, 2014; Libralato et al., 2016). Para tal efecto y para obtener los nauplios de *A. salina*, 1 g de quistes de *A. salina* (Golden Sun®) se hidrataron con una solución de agua de mar al 3.5% estéril durante una hora con aireación continua. Seguidamente, los quistes se desencapsularon con una solución de hipoclorito de sodio al 50% durante 30 s; posteriormente, se lavaron tres veces con agua destilada estéril para eliminar los residuos del hipoclorito. Los quistes lavados se depositaron en un envase cónico de 2 L en solución de agua marina al 3.5% durante 24 h a temperatura ambiente y aireación continua. Una vez obtenidos los nauplios, el ensayo de toxicidad se realizó en microplacas de 12 pozos en la cual se aplicaron 2 mL del tensoactivo purificado a diferentes concentraciones (125, 100, 75, 50 y 25 µg/mL) y 10 nauplios de *A. salina*, posteriormente, las placas se dejaron reposar durante 24 y 48 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se contabilizó el número de nauplios vivos (aquellos que mostraron un nado libre activo), y la mortalidad fue calculada utilizando la fórmula de Abbot la cual se



muestra en la ecuación 2. Siguiendo las directrices de la OECD (2004), se utilizó como control negativo una solución de agua de mar al 3.5% mientras que para el control positivo se utilizó dicromato de potasio en diferentes concentraciones (60, 30 y 15 $\mu\text{g/L}$). Este experimento se realizó por triplicado para cada concentración del tensoactivo de alto peso molecular purificado de XHA18 y controles evaluados.

$$\%M = (x - y) \times 100$$

Ecuación 2

%M = Porcentaje de mortalidad

x = Nauplios totales en el tratamiento

y = Nauplios muertos en el tratamient

Con los datos de mortalidad, junto con su control positivo, se calcularon la desviación estándar y la regresión lineal (R^2). Los datos fueron comparados mediante Excel y se determinó la concentración letal media (CL_{50}) utilizando el software StarGraphic y un análisis Probit.

3.14 Ensayo de toxicidad y estimulación en semillas de *Cucumis sativus*

Según las directrices establecidas por la OECD, EPA y la FDA, las semillas de *Cucumis sativus* son comúnmente utilizadas en ensayos de fitotoxicidad, ya que se ha reportado que presentan una mayor sensibilidad en comparación con otros organismos empleados en este tipo de pruebas (Wang et al., 2001)

Para este ensayo, se siguió la metodología modificada de (Doğaroğlu y Köleli, 2017) utilizando el SLC obtenido de XHA18 y semillas comerciales de *C. sativus* Vita®. Las semillas fueron previamente desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 10 minutos y posteriormente enjuagadas con agua destilada estéril. Luego del proceso de desinfección, se colocaron 10 semillas de manera



equidistante en cajas cuadradas de 10 × 10 cm, las cuales contenían papel absorbente (Scott SHOP) humedecido con 7 mL del tratamiento a evaluar. El tratamiento consistió en un sistema de SLC:Agua en diferentes proporciones (1:6 y 6:1). Como control positivo, se empleó agua destilada estéril. Las cajas fueron incubadas en oscuridad total a 23 °C durante 5 días, y cada tratamiento se realizó por triplicado. Al finalizar la incubación, se determinó el porcentaje de germinación (%G), el índice de germinación normalizado (IGN) y el índice de elongación residual (IER) del tallo y la raíz de cada tratamiento, mediante el cálculo de los siguientes parámetros:

$$(\%G) = \frac{NSGT}{NSET} \times 100$$

Ecuación 3

NSGT = Número de semillas germinadas en el tratamiento

NSET = Número de semillas evaluadas en el tratamiento

$$(IGN) = \frac{\%PSGT - \%PSGC}{\%PSGC}$$

Ecuación 4

%PSGT = % promedio de semillas germinadas en el tratamiento

%PSGC = % promedio de semillas germinadas en el control (agua destilada)

$$(IER) = \frac{CPSGT - CPSGC}{CPSGC}$$

Ecuación 5

CPSGT = Crecimiento promedio de semillas germinadas en el tratamiento

CPSGC = Crecimiento promedio de semillas germinadas en el control (agua destilada)

Estos cálculos se realizaron de acuerdo con metodologías descritas en estudios previos (Bagur-González et al., 2011; Doğaroğlu y Köleli, 2017).



3.15 Análisis estadístico

Para comparar los datos obtenidos de los triplicados de la actividad y estabilidad emulsificante de XHA18 producidos en las diferentes condiciones de cultivo, se verificó que los datos cumplieran con los postulados de normalidad y homocedasticidad, utilizando los coeficientes estandarizados de sesgo y curtosis, así como la prueba de Levene, respectivamente. Para determinar si existían diferencias estadísticas entre las variables, se empleó un Análisis de Varianza (ANDEVA). Posteriormente, se aplicó un contraste múltiple de rangos de Tukey para identificar las diferencias específicas entre los tratamientos. Para los datos que no cumplieron con los supuestos de la estadística paramétrica, se utilizó un contraste de medianas de Mann-Whitney para evaluar las diferencias entre los tratamientos.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statgraphics Centurion v 19.0, con un nivel de confianza del 95%. Los análisis gráficos se generaron con el software OriginPro 9® (OriginLab Corporation, EE. UU.).

CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1 Caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de XHA18

La bacteria XHA18, cuando se cultiva en placas de TSA, se caracteriza por la formación de pequeñas colonias lisas de color amarillo claro, especialmente cuando se cultiva en ausencia de luz. Sin embargo, es importante destacar que la morfología de esta cepa puede variar, a esto se le conoce como pleomorfismo, y está sujeto a las condiciones de cultivo y al tiempo de incubación. El pleomorfismo observado en la cepa XHA18 se manifiesta en algunas condiciones de cultivo (iluminación) y después de un cierto período de incubación, las células pueden presentar una disposición en diplobacilos (Fig. 4.1 a), dentro de las primeras 24 h de incubación mientras que pasadas las 72 h de incubación pueden agruparse en diplococos (Fig. 4.1 b). Siendo esto un rasgo común dentro del género *Glutamicibacter*. En cuanto a pruebas bioquímicas, la cepa XHA18 es positiva para la hidrólisis de catalasa y citrato de Simmons, pero es incapaz de hidrolizar el almidón, la lecitina, caseína y la urea, con una tolerancia a la sal del 7.5%.

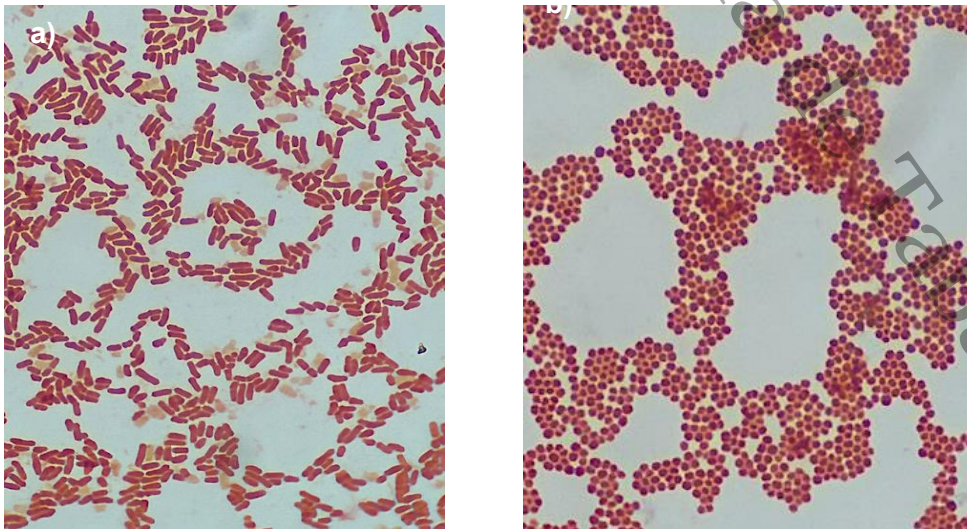


Figura 4.1. Representación del pleomorfismo observado en la cepa XHA18. a) células en disposición de diplobacilos y b) células en disposición de diplococos



4.2 Ensamblaje y análisis genómico de cepa XHA18

El análisis genómico de *Glutamicibacter* sp. XHA18 reveló que la cepa posee un genoma de 3,212,149 pb, ensamblado en un único contig. El contenido de G+C fue del 63.4% similar a otras especies del género *Glutamicibacter*. Para determinar la relación filogenética de XHA18 con otras especies del género, se realizaron dos análisis filogenéticos basados en la secuenciación del gen 16S rRNA y en el genoma completo (Fig. 4.2 y 4.3). El árbol filogenético construido con la secuencia del gen 16S rRNA muestra que la cepa XHA18 se agrupa dentro del género *Glutamicibacter*, pero sin asignación a ninguna especie descrita en la base de datos de TYGS.

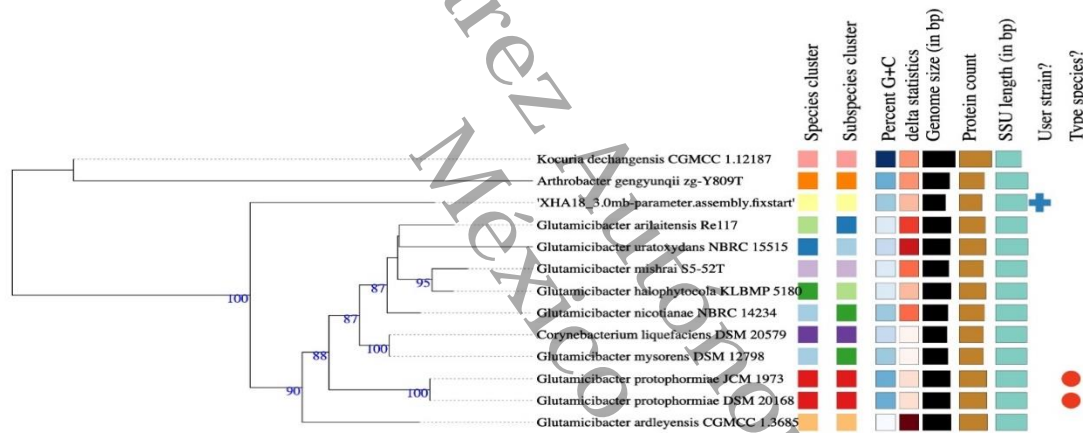


Figura 4.2 Árbol filogenético generado a partir de secuencias del gen 16S rRNA. Las longitudes de las ramas se escalan en términos de la fórmula de distancia GBDP d_5 . Los números sobre las ramas son valores de soporte de pseudo-bootstrap de GBDP > 60 % de 100 replicaciones, con un soporte de rama promedio del 76.8 %.

El análisis del genoma completo confirmó esta observación, ya que XHA18 no se encuentra dentro de ninguna de las especies conocidas del género, y presenta una diferencia en el contenido de G+C superior al 1% respecto a otras especies.



Además, el análisis de clustering filogenético reveló que XHA18 se ubicó en tres de los 11 grupos de especies y en tres de los 11 grupos de subespecies, lo que sugiere que podría tratarse de una potencial nueva especie dentro del género *Glutamicibacter*. La comparación con especies de referencia como *Glutamicibacter protophormiae*, *G. mysorens* y *G. arilaitensis* mostró similitudes en cuanto al tamaño del genoma y número de proteínas codificadas, pero diferencias significativas en su composición genómica.

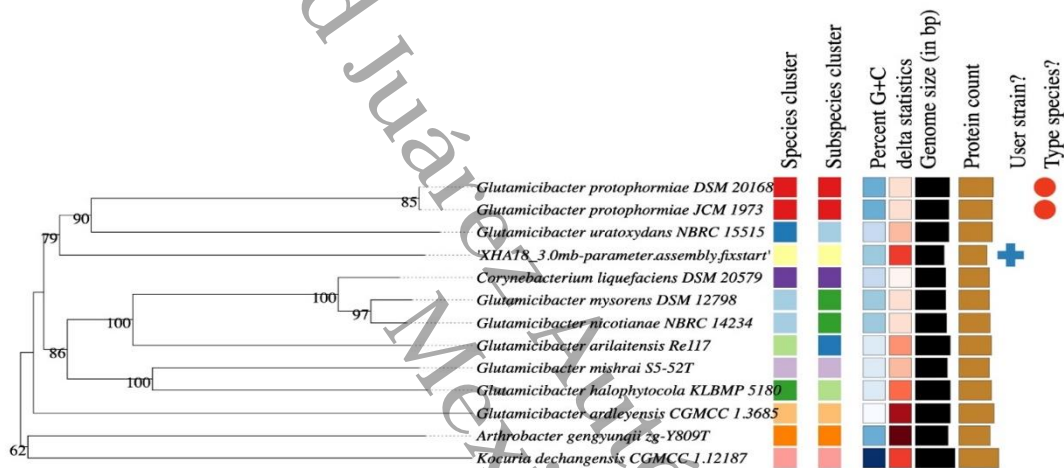


Figura 4.3. Árbol filogenético generado a partir de secuencias del genoma. Las longitudes de las ramas se escalan en términos de la fórmula de distancia GBDP d5. Los números sobre las ramas son valores de soporte de pseudo-bootstrap de GBDP > 60 % de 100 replicaciones, con un soporte de rama promedio del 91.2 %.

Desde un punto de vista funcional, el análisis de rutas metabólicas identificó dos de las cuatro vías principales asociadas a la biosíntesis de polisacáridos: la vía dependiente de Wzx/Wzy y la vía dependiente de transportadores ABC. Estos hallazgos sugieren que XHA18 posee la capacidad genética para la producción de compuestos emulsificantes, lo que concuerda con los resultados experimentales obtenidos en este estudio. Adicionalmente, el análisis en la plataforma dbCAN reveló que XHA18 codifica 158 enzimas activas de carbohidratos (CAZymes), dentro de las cuales se identificaron glicosil hidrolasas (GH), esterasa de carbohidratos (CE), proteínas de unión a carbohidratos (CBM) y glicosiltransferasas (GT). Este último grupo está estrechamente relacionado con proteínas flippasas



(Wzx) y polimerasas (Wzy), esenciales para el ensamblaje, polimerización y transporte de metabolitos fuera de la membrana celular. Además, las GT también participan en la síntesis de compuestos emulsificantes a través de la vía dependiente de transportadores ABC, donde, en lugar de Wzx y Wzy, se utilizan proteínas periplasmáticas de la familia polisacáridos copolimerasas (CPC) y proteínas de exportación de polisacáridos de la membrana externa (OPX).

4.3 Cinética de la actividad emulsificante

Durante el seguimiento de la evolución de la actividad emulsificante de *Glutamicibacter* sp. XHA18 bajo la condición de cultivo planctónico (Fig. 4.4 línea gris) se observó un aumento progresivo en el índice de emulsificación (IE_{24}), alcanzando un valor máximo de 60.09 ± 1.83 mm a las 96 h de incubación. Después de este periodo, no se observó ningún aumento significativo en la actividad. En contraste, cuando la bacteria se cultiva en condición sésil, donde se favorece la formación de biopelícula (Fig. 4.4 línea verde), la actividad emulsificante se observa desde las 24 h de incubación, alcanzando un IE_{24} máximo de 62.09 ± 1.24 %, el cual se mantuvo constante, con emulsificaciones estables, sin diferencias estadísticamente significativas hasta las 96 h.

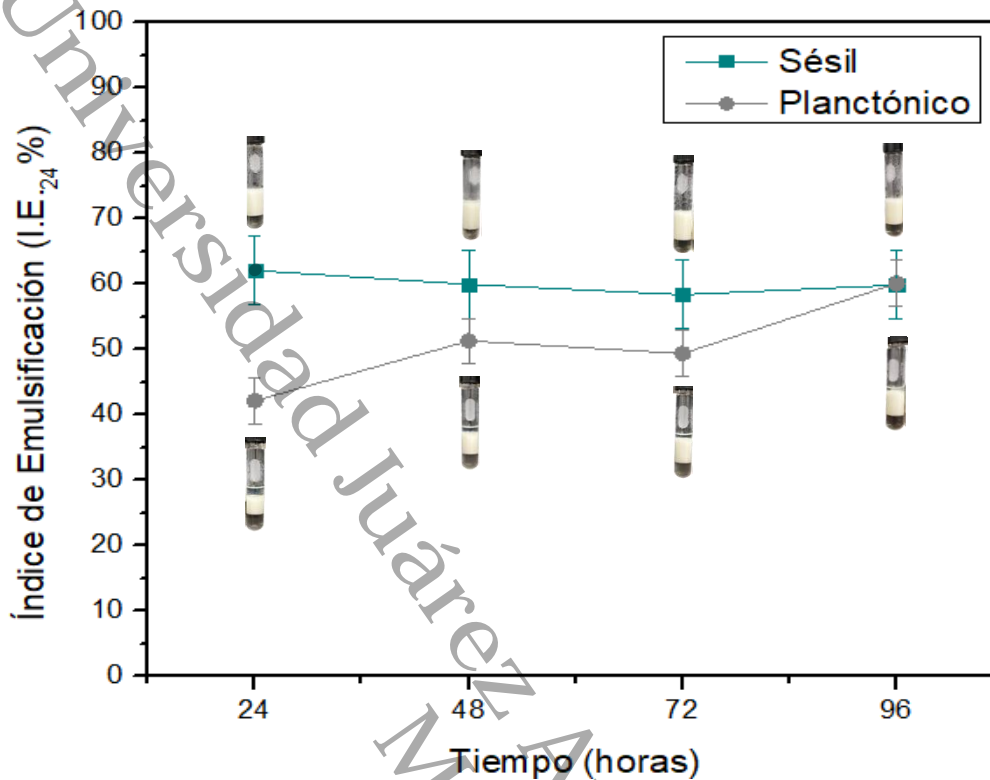


Figura 4.4. Cinética de emulsificación en cultivos sésiles y planctónicos de *Glutamicibacter* sp. XHA18. En el eje de las "X" se muestran los tiempos en horas que fueron evaluados. En el eje de las "Y" se muestran los valores promedio \pm D.E. del índice de emulsificación (IE₂₄) obtenido en cada tipo de cultivo.

4.4 Efecto de los sustratos en la producción y estabilidad de compuestos emulsificantes

Para definir como influyen los distintos componentes del medio en la producción y estabilidad de los metabolitos con actividad tensoactiva, se evaluaron diferentes concentraciones de dextrosa, peptona y extracto de levadura. Estos sustratos, además de ser fuentes esenciales de carbono, nitrógeno y micronutrientes, demostraron influir significativamente en la producción y estabilidad del compuesto emulsificante sintetizado por *Glutamicibacter* sp. XHA18, particularmente bajo condiciones de cultivo sésil.



4.4.1 Dextrosa

El análisis de varianza evidenció diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones evaluadas ($p > 0.05$). Tras comparar las medias de los tratamientos mediante la prueba de Tukey se evidenció que la concentración de 1% de dextrosa resultó en la mayor actividad emulsificante, con un promedio de IE_{24} de $60.06 \pm 1.56\%$. No obstante, más allá del valor máximo alcanzado, la estabilidad de la emulsificación a lo largo del tiempo fue un criterio decisivo para este trabajo. El monitoreo posterior demostró que las emulsiones generadas con 1.0% de dextrosa se mantuvieron estables durante más de un mes, lo que confirmó que esta concentración es la más adecuada tanto en la eficiencia como en la persistencia de la emulsificación en la condición de cultivo planctónico.

En el cultivo sésil, las diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas ($p > 0.05$), resaltan nuevamente la importancia de evaluar los componentes relacionados con la producción de compuestos bioactivos. En esta condición de cultivo, la concentración de 1.0% de dextrosa resultó ser la más adecuada, al alcanzar una actividad emulsificante promedio de $60.06 \pm 1.56\%$, además de mantener una alta estabilidad a lo largo del tiempo. La comparación entre ambos tipos de cultivo en función de esta variable se presenta en la figura 4.5.

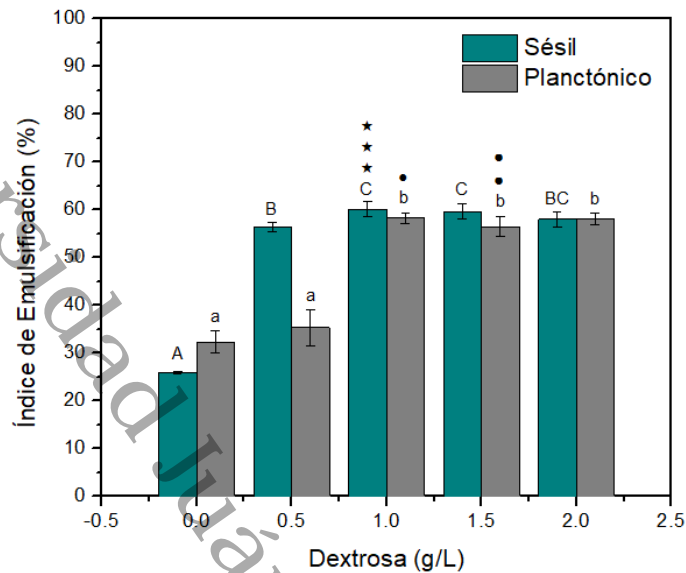


Figura 4.5. Efecto de la dextrosa en la actividad emulsificante de *Glutamicibacter* sp. XHA18 en cultivos sésiles y planctónicos. En el eje de las "X" se muestran los niveles/concentraciones de dextrosa. En el eje de las "Y" se muestran los valores promedio \pm D.E. del índice de emulsificación (IE_{24}) obtenido en cada nivel/concentración. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey; $p < 0.05$). * : Mayor actividad emulsificante, ** : Mayor estabilidad emulsificante, *** : Mayor actividad y estabilidad emulsificante. ° : Mayor actividad emulsificante, °° : Mayor estabilidad emulsificante, °°° : Mayor actividad y estabilidad emulsificante

4.4.2 Peptona

La adición de la peptona en el medio tuvo un efecto en la actividad emulsificante, se observó que a medida que aumenta la concentración de peptona, también lo hizo la emulsificación, alcanzando su punto máximo a la adición de 5.0 g/L. Sin embargo, después de esta concentración se observó una disminución en la actividad. En condiciones de cultivo planctónico, la mayor actividad emulsificante se obtiene con la adición de 5.0 g/L, alcanzando un valor promedio de IE_{24} de $53.06 \pm 1.60\%$. No obstante, el seguimiento de la estabilidad mostró que las emulsiones generadas con 2.5 g/L de peptona fueron más estables a lo largo del tiempo, por lo que consideramos esta concentración como la más adecuada en esta condición.



Un comportamiento similar se observó bajo condiciones sésiles. En este caso, el análisis de varianza confirmó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones probadas. En esta condición, la mayor producción y estabilidad del compuesto emulsificante también se alcanzaron con 2.5 g/L de peptona, registrando un IE_{24} promedio de $60.77 \pm 1.17\%$. La comparación de esta variable entre ambos tipos de cultivo se presenta en la figura 4.6.

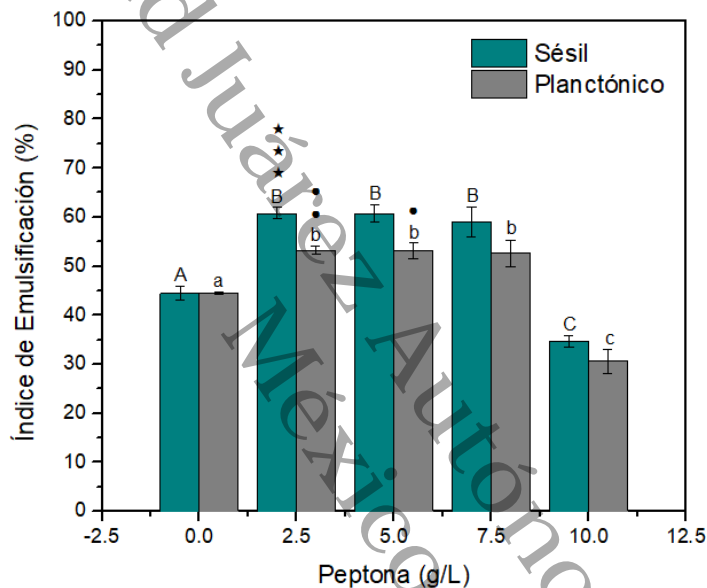


Figura 4.6. Efecto de la peptona en la actividad emulsificante de *Glutamicibacter* sp. XHA18 en cultivos sésiles y planctónicos. En el eje de las "X" se muestran los niveles/concentraciones de peptona. En el eje de las "Y" se muestran los valores promedio \pm D.E. del índice de emulsificación (IE_{24}) obtenido en cada nivel/concentración. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey; $p < 0.05$). * : Mayor actividad emulsificante, ** : Mayor estabilidad emulsificante, *** : Mayor actividad y estabilidad emulsificante. ° : Mayor actividad emulsificante, °° : Mayor estabilidad emulsificante, °°° : Mayor actividad y estabilidad emulsificante

4.4.3 Extracto de levadura

La adición de extracto de levadura al medio de cultivo tuvo un efecto significativo en la actividad emulsificante de *Glutamicibacter* sp. XHA18 en ambos cultivos. En el cultivo planctónico. El análisis de varianza mostró diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones evaluadas ($p < 0.05$), identificando que la



adicción de 1.5 g/L como la más eficiente con un valor promedio de IE_{24} de $53.18 \pm 3.56\%$, además de mantener una emulsificación estable en el tiempo.

En el cultivo sésil, aunque también se observaron diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas ($p < 0.05$), la mayor actividad y estabilidad emulsificante se alcanzó con 2.0 g/L de extracto de levadura, con un IE_{24} ligeramente superior al obtenido en las demás concentraciones. Cabe destacar que el comportamiento en ambos cultivos evidenció un aumento progresivo en la actividad emulsificante con el incremento de la concentración de extracto de levadura, hasta alcanzar la emulsificación más alta, a partir del cual se observó una disminución en la condición de cultivo planctónico. La comparación de esta variable entre ambos tipos de cultivo se muestra en la Figura 4.7, donde se aprecia una mayor respuesta en términos de actividad y estabilidad en la condición sésil.

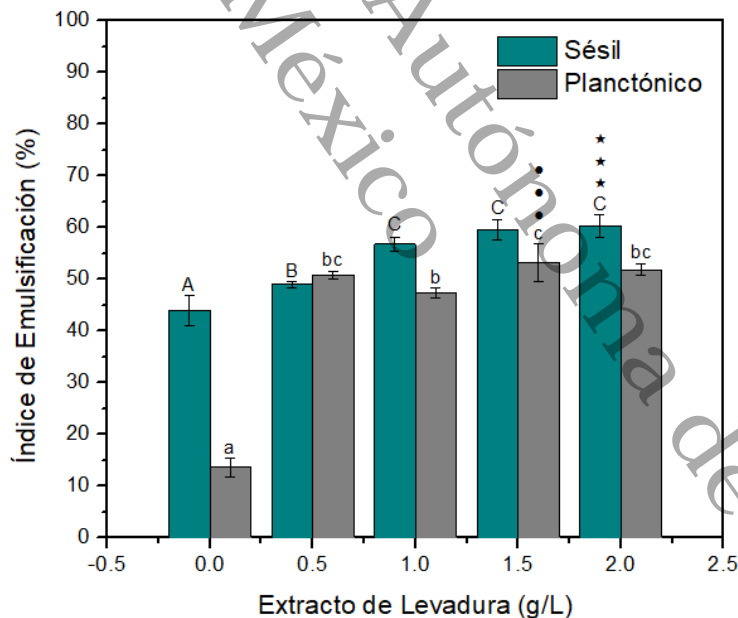


Figura 4.7. Efecto del extracto de levadura en la actividad emulsificante de *Glutamicibacter* sp. XHA18 en cultivos séviles y planctónicos. En el eje de las "X" se muestran los niveles/concentraciones de extracto de levadura. En el eje de las "Y" se muestran los valores promedio \pm D.E. del índice de emulsificación (IE_{24}) obtenido en cada nivel/concentración. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey; $p < 0.05$). * : Mayor actividad emulsificante, ** : Mayor estabilidad emulsificante, *** : Mayor actividad y estabilidad emulsificante. ° : Mayor actividad emulsificante, °° : Mayor estabilidad emulsificante, °°° : Mayor actividad y estabilidad emulsificante



4.5 Efecto de las condiciones ambientales en la producción y estabilidad de compuestos emulsificantes

Los resultados obtenidos demostraron que las condiciones evaluadas (agitación, pH y salinidad) influyen de manera directa en la producción y estabilidad de las moléculas con actividad tensoactiva. En particular, se observó que ciertas combinaciones de estos factores favorecen la producción del compuesto, mientras que otras pueden llegar a inhibir completamente su síntesis o afectar su estabilidad a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos evidenciaron que las condiciones evaluadas (agitación, pH y salinidad) tienen un impacto significativo en la estabilidad y producción de estas moléculas, llegando incluso a inhibir completamente su producción bajo condiciones no óptimas

4.5.1 Velocidad de agitación

Las pruebas estadísticas mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las distintas velocidades de agitación y rotación evaluadas. En el cultivo planctónico la velocidad de 120 RPM resultó en la mayor producción y estabilidad del compuesto emulsificante con un IE_{24} promedio de 57.05 ± 0.59 %. Por otra parte, en el cultivo séstil, la velocidad de agitación de 7 NRPM fue la condición que induce la mayor producción y estabilidad con respecto a la demás con un IE_{24} promedio de 56.86 ± 1.73 %. La interacción de esta variable en ambos tipos de cultivos se muestra en la figura 4.8.

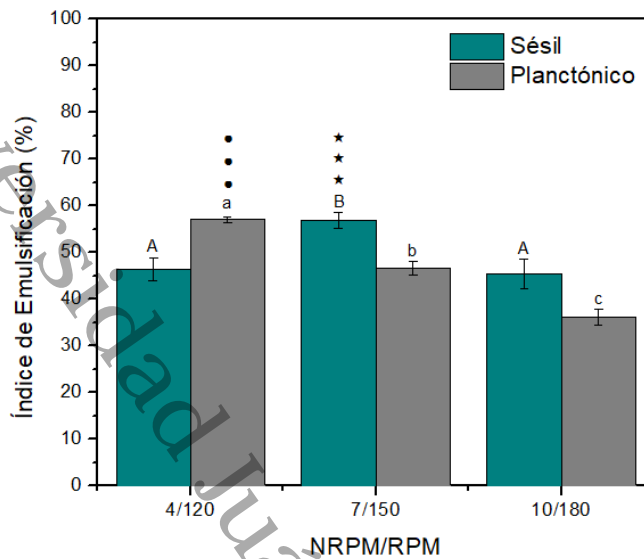


Figura 4.8. Efecto de la agitación en la actividad emulsificante de *Glutamicibacter* sp. XHA18 en cultivos sésiles y planctónicos. En el eje de las "X" se muestran las velocidades de agitación/rotación. En el eje de las "Y" se muestran los valores promedio \pm D.E. del índice de emulsificación (IE_{24}) obtenido en cada nivel/concentración. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey; $p < 0.05$). * : Mayor actividad emulsificante, ** : Mayor estabilidad emulsificante, *** : Mayor actividad y estabilidad emulsificante. ° : Mayor actividad emulsificante, °° : Mayor estabilidad emulsificante, °°° : Mayor actividad y estabilidad emulsificante

4.5.2 pH

En el cultivo planctónico, los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones de pH evaluadas excepto en la concentración de 5.60, donde no se registró actividad emulsificante. El mayor dato de emulsificación fue a pH de 7.60 el cual mostró la mayor actividad emulsificante, con un IE_{24} promedio de 60.65 ± 1.69 %. Sin embargo, considerando la estabilidad de la emulsificación en el tiempo, se determinó que un pH de 8.60 era el más adecuado para esta condición.

En el cultivo sésil, la concentración de 8.60 de pH también se identificó como el más favorable, alcanzando IE_{24} promedio de 59.04 ± 0.49 además esta concentración mantuvo la estabilidad de la emulsificación por largo tiempo. La interacción de esta variable en las diferentes condiciones se presenta en la figura 4.9.

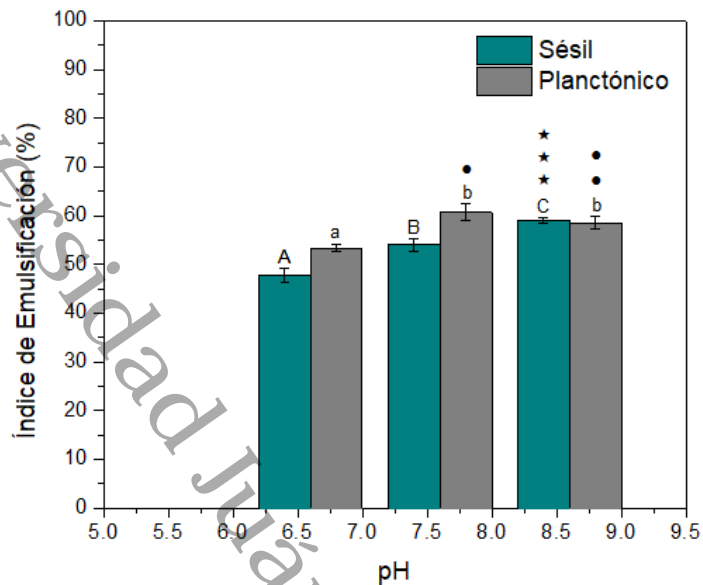


Figura 4.9. Efecto del pH en la actividad emulsificante de *Glutamicibacter* sp. XHA18 en cultivos sésiles y planctónicos. En el eje de las "X" se muestran las concentraciones evaluadas de pH. En el eje de las "Y" se muestran los valores promedio \pm D.E. del índice de emulsificación (IE₂₄) obtenido en cada concentración. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey; $p < 0.05$). * : Mayor actividad emulsificante, ** : Mayor estabilidad emulsificante, *** : Mayor actividad y estabilidad emulsificante. ° : Mayor actividad emulsificante, °° : Mayor estabilidad emulsificante, °°° : Mayor actividad y estabilidad emulsificante

4.5.3 Salinidad

La adición de NaCl afectó directamente en la capacidad emulsificante de *Glutamicibacter* sp. XHA18 en ambos tipos de cultivos. Si bien se logró observar una emulsificación parcial tras aplicar agitación mediante vórtex, estas fueron inestables dentro de las primeras 24 h. Este impacto, se observó desde concentraciones superiores al 1.5% de NaCl donde las micelas se disgregaron debido a su gran tamaño y por ende se perdía la emulsificación.



4.6 Actividad emulsificante contra diversos sustratos y estabilidad en condiciones de salinidad

Para evaluar el potencial emulsificante de los tensoactivos producidos por *Glutamicibacter* sp. XHA18, se utilizaron distintos sustratos hidrofóbicos. Al mismo tiempo, se analizó la estabilidad de las emulsificaciones obtenidas en presencia de diferentes concentraciones de NaCl (2.5% y 5.0%).

4.6.1 Actividad y estabilidad emulsificante en cultivo planctónico

Los resultados mostraron que el índice de emulsificación más alto se obtuvo con el aceite de motor y el aceite de motor quemado, alcanzando valores promedios de IE_{24} de $90.70 \pm 2.96\%$ y $84.99 \pm 2.72\%$, respectivamente. En contraste, la actividad emulsificante fue considerablemente menor en el hexadecano y xileno, mientras que en el hexano y el tolueno no se detectó actividad emulsificante bajo estas condiciones (Fig. 4.10). En términos de estabilidad en NaCl, se observó que la emulsificación de los aceites de motor y motor quemado se mantuvo estable en concentraciones de hasta 2.5% de NaCl, aunque con una ligera reducción en la emulsificación a concentraciones más altas. Sin embargo, las emulsificaciones con hexadecano y xileno presentaron una disminución más pronunciada en presencia de NaCl.

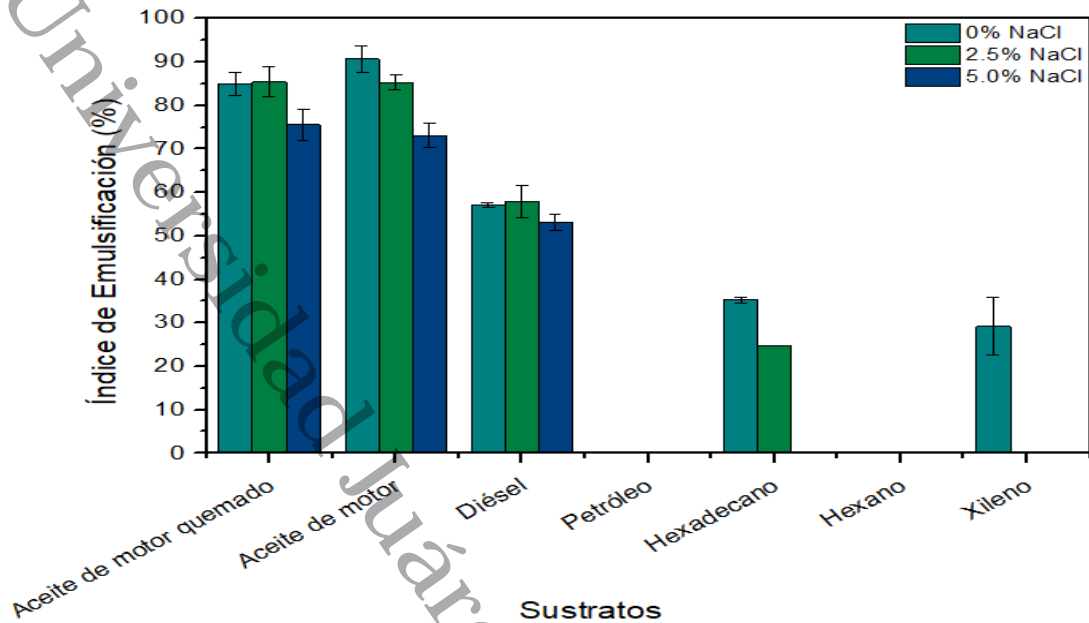


Figura 4.10. Actividad emulsificante del EPS sintetizado por *Glutamicibacter* sp. XHA18 en cultivo planctónico, evaluada en distintos sustratos hidrofóbicos. En el eje de las "X" se muestran los sustratos hidrofóbicos evaluados. En el eje de las "Y" se muestran las emulsificaciones obtenidas sin y con diferentes concentraciones de NaCl.

4.6.2 Actividad y estabilidad emulsificante en cultivo sésil

En el cultivo sésil, la actividad emulsificante general fue menor en comparación con la máxima emulsificación alcanzada en el cultivo planctónico. Sin embargo, se observó una notable ventaja en términos de estabilidad frente a diferentes concentraciones salinas. A diferencia de lo registrado en el cultivo planctónico, en esta condición se detectó actividad emulsificante significativa en todos los sustratos evaluados, incluyendo aquellos en los que no se había observado actividad en el otro sistema de cultivo (Fig. 4.11).

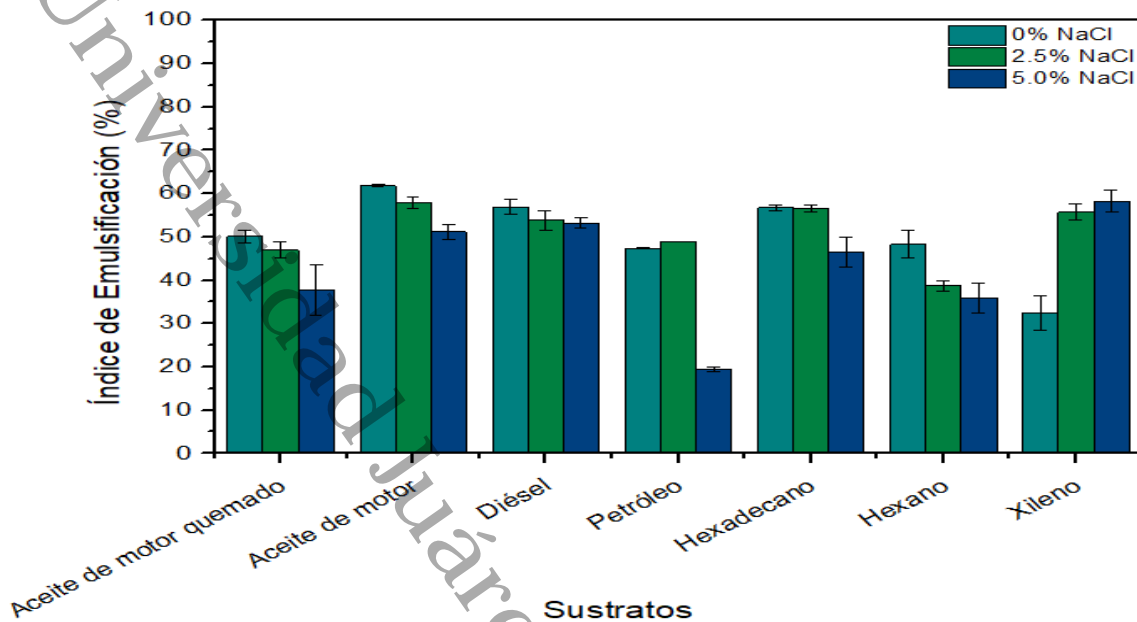


Figura 4.11. Actividad emulsificante del EPS sintetizado por *Glutamicibacter* sp. XHA18 en cultivo sésil, evaluada en distintos sustratos hidrofóbicos. En el eje de las “X” se muestran los sustratos hidrofóbicos evaluados. En el eje de las “Y” se muestran las emulsificaciones obtenidas sin y con diferentes concentraciones de NaCl.

En la mayoría de los sustratos, la actividad emulsificante inicial se mantuvo estable o incluso aumentó con el incremento en la concentración de NaCl. Este efecto fue particularmente evidente en el xileno y el tolueno, que mostraron un aumento progresivo en la actividad emulsificante a medida que la concentración de salinidad aumentaba. Por otro lado, la emulsificación en otros sustratos se mantuvo constante a lo largo de todas las pruebas de salinidad, con la excepción del petróleo, donde la actividad emulsificante se vio afectada negativamente en la concentración de NaCl más alta evaluada.

4.7 Emulsificante purificado

De acuerdo con los datos obtenidos mediante las metodologías para la purificación de compuestos tensoactivos de alto y bajo peso molecular, se observó un mayor rendimiento del compuesto producido en condiciones de cultivo sésil, alcanzando



un rendimiento de 2.8 g/L, en comparación con el cultivo planctónico, del cual se extrajo 1.8 g/L. Por otra parte, la metodología empleada para la recuperación de metabolitos de bajo peso molecular no permitió la extracción de compuestos con actividad superficial detectable.

4.8 Caracterización molecular del compuesto emulsificante purificado

Se realizaron análisis espectrofotométricos y morfológicos con el objetivo de determinar las propiedades estructurales y fisicoquímicas del compuesto emulsificante purificado, obtenido a partir del cultivo sénil de *Glutamicibacter* sp. XHA18. Las pruebas incluyeron espectroscopía de absorción ultravioleta-visible y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, microscopía electrónica de barrido acoplada a espectroscopía de dispersión de energía y la carga superficial mediante medición de potencial zeta.

4.8.1 Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier

El análisis espectroscópico mediante FTIR permitió la identificación de los grupos funcionales presentes en el emulsificante purificado producido por *Glutamicibacter* sp. XHA18. En la figura 4.12 se presenta el espectro obtenido, donde se observan señales características que sugieren la composición química del biopolímero. Se observó una banda de absorción ancha centrada alrededor de 3270 cm^{-1} , indicativa de vibraciones de estiramiento O–H, típicamente asociadas con matrices polisacáridas ricas en grupos hidroxilo. Esta característica, a menudo intensificada por enlaces de hidrógeno intermoleculares, también puede incluir contribuciones de grupos N–H provenientes de enlaces peptídicos.



En la región alifática, se detectaron bandas débiles cerca de 2920 y 2850 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de estiramiento C–H de grupos metilo y metileno, lo que sugiere la presencia de cadenas laterales lipídicas o alifáticas. La región entre 1750 y 1600 cm^{-1} mostró un pico prominente alrededor de 1640 – 1650 cm^{-1} , que puede atribuirse al estiramiento de enlaces C=O, probablemente provenientes de ácidos carboxílicos, ácidos urónicos o grupos amida I presentes en residuos proteicos.

Bandas adicionales en la región de 1550 – 1450 cm^{-1} , asociadas con vibraciones de amida II (estiramiento C–N y flexión N–H), respaldan aún más la presencia de componentes proteicos incrustados en la estructura del biopolímero. Las características más distintivas se encontraron entre 1200 y 1000 cm^{-1} , donde múltiples bandas superpuestas fueron consistentes con enlaces glucosídicos C–O–C, vibraciones del esqueleto C–C y modos de estiramiento C–OH, lo que confirma la estructura sacarídica del EPS.

Finalmente, las absorciones por debajo de 900 cm^{-1} , típicamente asociadas con modos de deformación de anillos furanósicos y piranósicos, refuerzan la interpretación del compuesto como un exopolisacárido (EPS) estructuralmente heterogéneo con funcionalidades asociadas de tipo proteico y lipídico.

En conjunto, estos resultados sugieren que el EPS producido y purificado de *Glutamicibacter* sp. XHA18 es un bioemulsificante de naturaleza exopolisacarídica, con posibles interacciones entre proteínas y lípidos que podrían influir en su actividad emulsificante y estabilidad estructural.

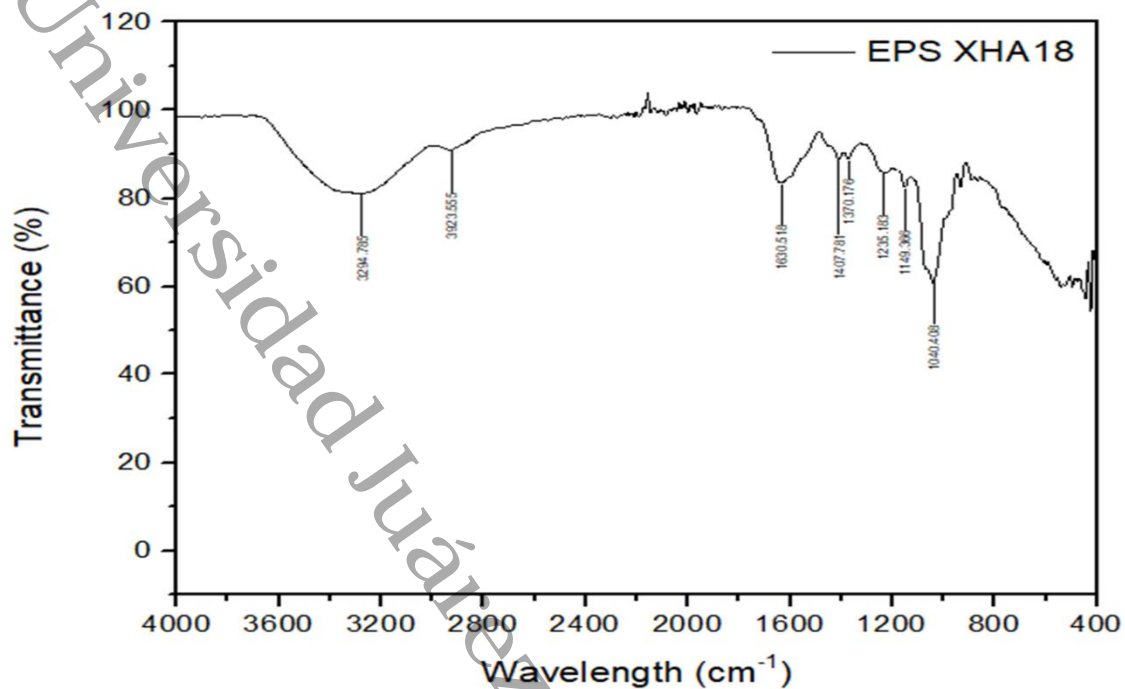


Figura 4.12. Espectro FTIR de transmitancia del EPS producido por XHA18. Se identifican distintos grupos funcionales asociados a polisacáridos, proteínas y lípidos, con picos de absorción correspondientes a las bandas características del infrarrojo.

4.8.2 Espectroscopía ultravioleta-visible y refractancia difusa

El análisis de espectroscopia UV-Vis del EPS purificado reveló una absorbancia máxima en el rango de 260 a 280 nm, lo que sugiere la presencia de proteínas en la muestra. Esta absorbancia es característica de los aminoácidos aromáticos, particularmente triptófano y tirosina, los cuales están comúnmente presentes en proteínas.

Estos resultados respaldan la hipótesis de que el compuesto responsable de la actividad emulsificante en *Glutamicibacter* sp. XHA18 es de origen orgánico, lo que concuerda con la naturaleza bioquímica de los bioemulsificantes de tipo exopolisacárido (EPS). El espectro resultante se presenta en la figura 4.13, donde se puede observar la presencia de bandas de absorción en los intervalos



previamente mencionados, reforzando la caracterización del EPS como un compuesto complejo que contiene fracciones polisacáridicas y proteicas.

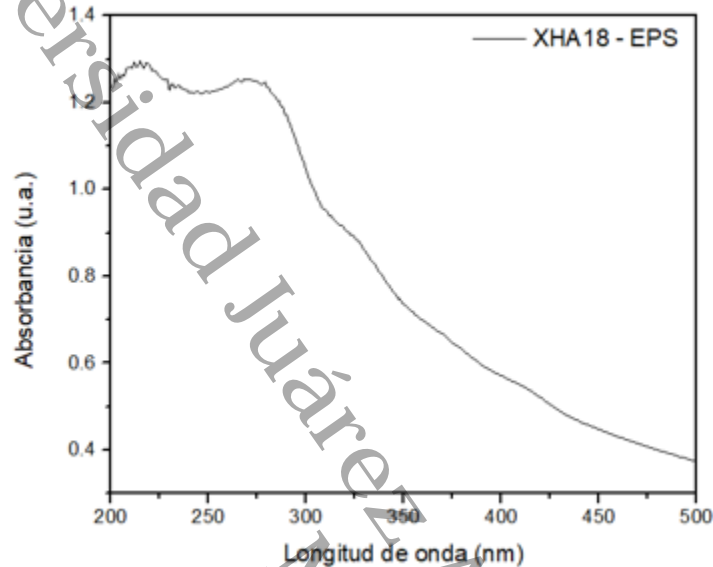


Figura 4.13. Espectro de absorción UV-Vis del EPS sintetizado por *Glutamicibacter* sp. XHA18. Se observa una banda de absorción característica en el rango de 200 a 300 nm, asociada a la presencia de proteínas y compuestos orgánicos en la muestra.

4.8.3 Espectroscopía de dispersión de energía por rayos X y microscopía electrónica de barrido

Los resultados de estas pruebas permitieron determinar la composición química y la morfología microscópica del EPS, los cuales se presentan en la figura 4.14. El EDS reveló que los picos de mayor intensidad corresponden a carbono (C) y oxígeno (O), lo que confirma que el compuesto responsable de la actividad emulsificante es de origen orgánico (Fig. 4.14b). Sin embargo, también se identificó un tercer pico de menor intensidad correspondiente a azufre (S), lo que sugiere la posible presencia de proteínas dentro del EPS, dado que este elemento es un componente estructural en ciertos aminoácidos, como la cisteína y metionina.

Por otro lado, el análisis de SEM permitió visualizar la estructura morfológica del EPS obtenido en el cultivo sésil, la cual se muestra en la figura 4.14a, con aumentos de 200X. En términos generales, se observó que el EPS está conformado por estructuras amorfas de tamaños irregulares, lo que es característico de biopolímeros exopolisacárido.

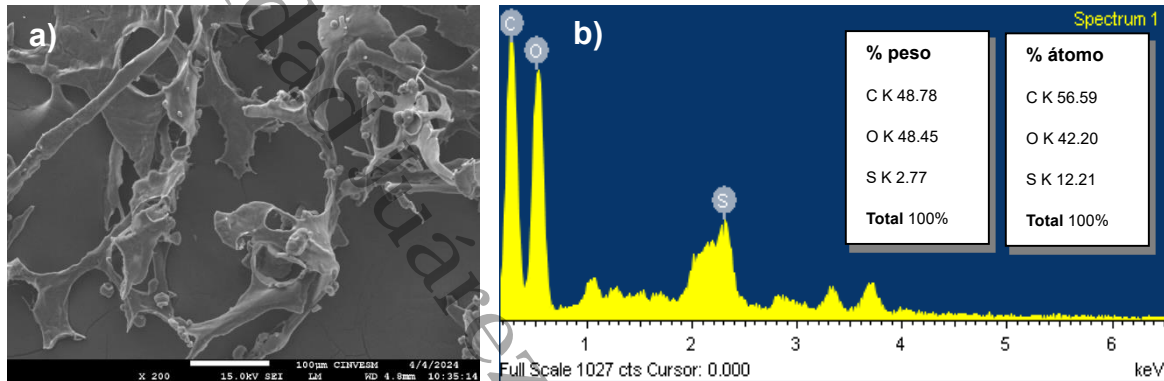


Figura 4.14. Análisis de Energía Dispersiva de Rayos y Microscopía Electrónica de Barrido del EPS sintetizado por *Glutamicibacter* sp. XHA18. a) Espectro de EDX que muestra la composición elemental del EPS, con el porcentaje de cada elemento en peso y en átomos. b) Imagen obtenida por MEB que revela la estructura morfológica del EPS

4.8.4 Potencial zeta

El análisis del potencial zeta del EPS mostró un valor promedio de -39.5 ± 4.71 mV, indicando una carga neta negativa. Lo que concuerda con la caracterización mediante FTIR, donde se identificaron grupos funcionales como carboxilo (-COO-), hidroxilo (-OH) y carbonilo (C=O), los cuales están asociados con la carga negativa observada en el potencial Zeta.



4.9 Ensayos de Citotoxicidad del EPS

4.9.1 *Artemia salina*

Los resultados de la prueba de citotoxicidad con *Artemia salina* se presentan en la figura 4.15. La figura a) muestra la anatomía representativa de un nauplio de *A. salina* correspondiente al control después de 48 horas de exposición. En general, no se registró mortalidad ni alteraciones significativas en el comportamiento natatorio de los nauplios tras la exposición al EPS, incluso en las concentraciones más elevadas. Su movimiento fue comparable al del control negativo, lo que sugiere que el EPS no genera efectos tóxicos evidentes. Aún a concentraciones más altas (125, 100 y 75 mg/L; Fig. 4.15b-d), se observó un ligero oscurecimiento en el tracto digestivo, lo que indica la acumulación del EPS. Este efecto no estuvo asociado con mortalidad ni con daño fisiológico aparente, lo que sugiere que la ingesta del EPS no representa un riesgo letal para *A. salina*. En las concentraciones más bajas (50 y 25 mg/L; Fig. 4.15e-f), incluso no se detectaron cambios morfológicos ni alteraciones en la estructura de los órganos, manteniendo un estado similar al del control negativo (agua salina; Fig. 4.15g).

En contraste, en el control positivo (dicromato de potasio, $K_2Cr_2O_7$; Fig. 4.15H-J), se registró una mortalidad del 100% tras 48 h de exposición. Los organismos expuestos presentaron un oscurecimiento marcado en las anténulas, antenas, segmento abdominal y tracto digestivo, el comportamiento observado en el control positivo siguió un patrón típico de dosis-respuesta, registrándose una mortalidad del 100% a una concentración de 60 mg/L. El análisis Probit permitió determinar una CL_{50} de 9.9 mg/L, lo que reafirma la alta toxicidad del dicromato de potasio en *A. salina* dentro del intervalo de concentración evaluada.

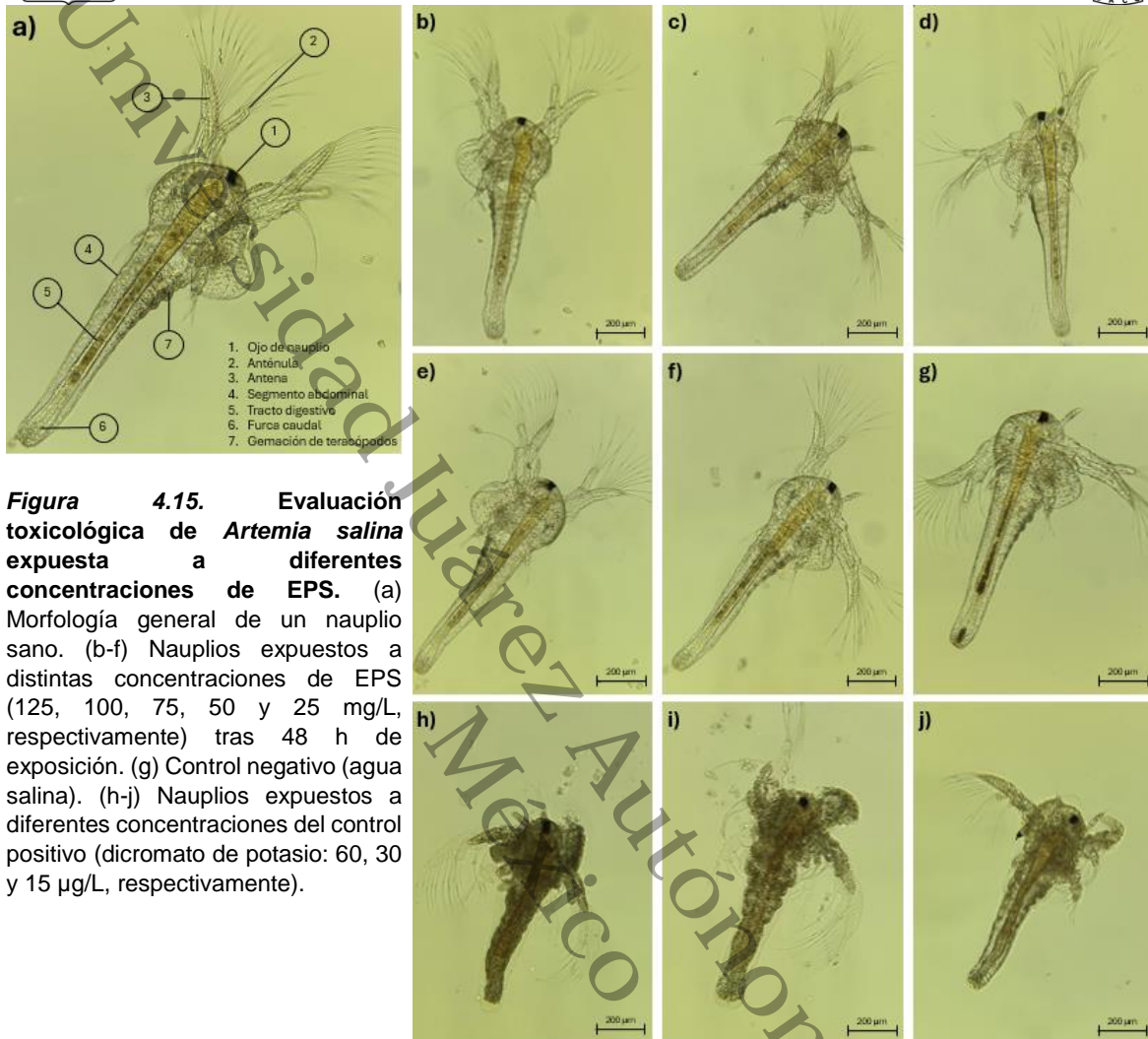


Figura 4.15. Evaluación toxicológica de *Artemia salina* expuesta a diferentes concentraciones de EPS. (a) Morfología general de un nauplio sano. (b-f) Nauplios expuestos a distintas concentraciones de EPS (125, 100, 75, 50 y 25 mg/L, respectivamente) tras 48 h de exposición. (g) Control negativo (agua salina). (h-j) Nauplios expuestos a diferentes concentraciones del control positivo (dicromato de potasio: 60, 30 y 15 µg/L, respectivamente).

4.9.2 Germinación de semillas de *Cucumis sativus*

Los resultados obtenidos del ensayo de germinación de pepino (*Cucumis sativus*), (Fig. 4.16) mostraron que el SLC obtenido de *Glutamicibacter* sp. XHA18 no presentó efectos tóxicos evidentes sobre la viabilidad de las semillas. Todas germinaron exitosamente, sin diferencias significativas en el porcentaje de germinación en comparación con el control negativo (agua destilada estéril; Fig. 4.16a).

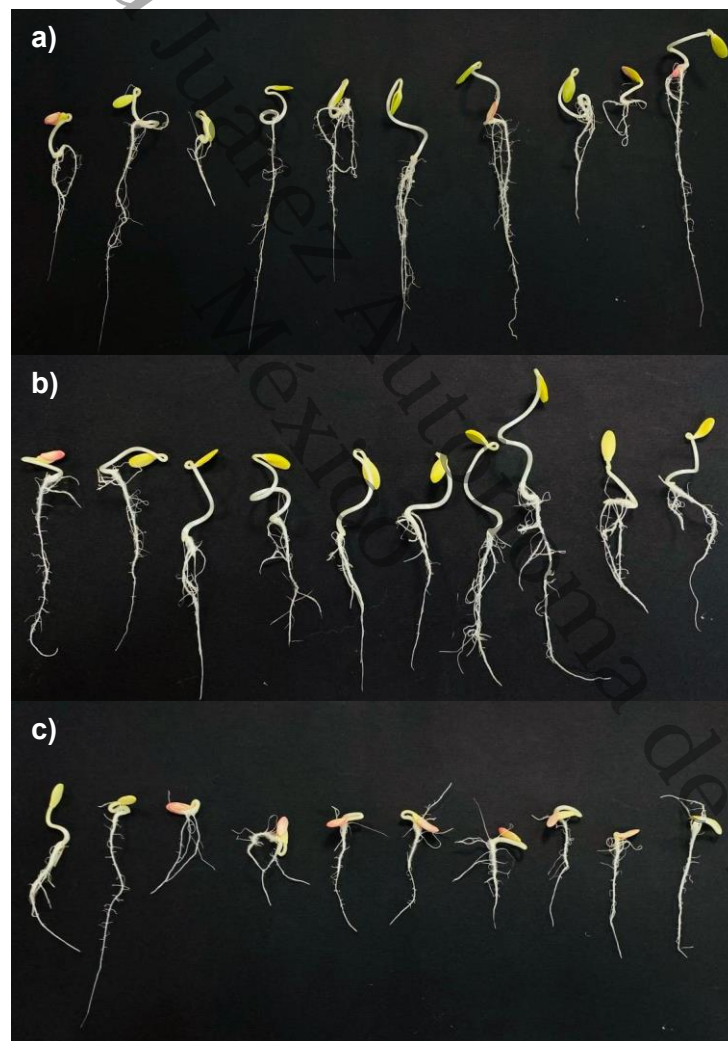


Figura 4.16. Efecto del SLC de *Glutamicibacter* sp. XHA18 en la germinación y crecimiento de semillas de pepino *Cucumis sativus*. (a) Control negativo (agua destilada estéril), (b) Concentración baja de SLC (1:6) y (c) Concentración alta de SLC (6:1). Se observa la influencia del SLC en el desarrollo de la raíz y el tallo.



En el tratamiento con la menor concentración de SLC 1:6 (Fig. 4.16b), se observó un desarrollo similar al del control, sin efectos adversos visible. No obstante, al analizar por separado las estructuras de las plántulas, se detectó una ligera estimulación en la elongación radicular, mientras que el desarrollo del tallo se mantuvo sin diferencias, e incluso con valores ligeramente inferior al control. En contraste, cuando se aplica el SLC en una mayor proporción 6:1 (Fig. 4.16c), resultado en una reducción significativa del crecimiento de la raíz ($p < 0.05$).

Para cuantificar el efecto del SLC en el crecimiento de las plántulas, se calculó el índice de germinación (IG) y el índice de elongación relativo (IER) tanto en el tallo como en las raíces. Estos índices permitieron distinguir entre un efecto promotor o inhibitorio. Valores positivos fueron interpretados como estimulación del crecimiento, mientras que valores negativos indicaron inhibición en comparación con el control.

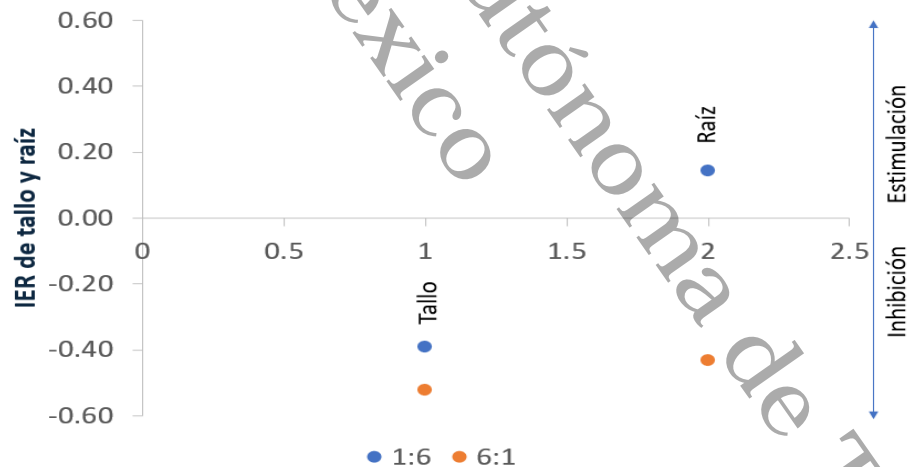


Figura 4.17. Índice de Efecto Relativo (IER) en el crecimiento del tallo y la raíz de *Cucumis sativus* tratado con SLC. Los puntos azules representan la concentración más baja de SLC (1:6), mientras que los puntos anaranjados indican la concentración más alta evaluada (6:1).

Los resultados mostraron que la concentración más baja evaluada (1:6) favoreció el desarrollo de las raíces, aunque presentó un efecto inhibitorio en el crecimiento del tallo. En contraste, la concentración más alta (6:1) registró valores negativos tanto



en el tallo como en la raíz. En la figura 4.17 se muestra el efecto del SLC sobre el crecimiento de las plántulas de *C. sativus*, expresado mediante el índice del efecto relativo.



CAPITULO V: DISCUSIÓN

El análisis genómico de *Glutamicibacter* sp. XHA18 reveló una serie de características que no solo respaldan su posible clasificación como una nueva especie dentro del género, sino que también podrían estar relacionadas con las propiedades fisicoquímicas particulares del EPS que produce. Se identificaron múltiples genes asociados a rutas de biosíntesis de exopolisacáridos, así como enzimas específicas del metabolismo de carbohidratos, lo que sugiere una capacidad metabólica distintiva para la producción de biopolímeros estructuralmente complejos.

La presencia de genes codificantes para transportadores, glicosiltransferasas y proteínas asociadas a la exportación de polisacáridos sugiere que el EPS de XHA18 puede presentar una composición rica en grupos funcionales con carga negativa como lo son los ácidos urónicos, lo cual explicaría su elevada estabilidad coloidal y su capacidad para mantener la emulsificación en condiciones de salinidad elevada. Esta correlación entre el perfil genómico y las propiedades del EPS indica que las diferencias genéticas no son únicamente taxonómicas, sino funcionales.

Además, la divergencia en el contenido de G+C respecto a otras especies del género (superior al 1%) refuerza la hipótesis de que XHA18 posee adaptaciones moleculares específicas que podrían estar asociadas al entorno de donde fue aislada (cenote prístino) y a su capacidad para producir un EPS con aplicaciones biotecnológicas en condiciones extremas. En este contexto, las diferencias genómicas observadas se traducen en propiedades bioquímicas del EPS que distinguen a esta cepa frente a otras del mismo género, lo cual resalta su valor como potencial biotecnológico para la producción de compuestos funcionales únicos. (Meier-Kolthoff et al., 2014). De igual forma se identificaron genes que forman parte de dos rutas génicas principales para la síntesis de EPS: la vía dependiente de Wzx/Wzy y la vía de transportadores ABC, las cuales incluyen glicosiltransferasas y proteínas transmembranas. La presencia de múltiples enzimas involucradas en el



metabolismo de carbohidratos sustenta que XHA18 podría ser un recurso valioso para la industria biotecnológica, particularmente en la producción de biopolímeros con aplicaciones en biorremediación y bioemulsificación (Guan et al., 2025)

Para evidenciar que las condiciones de cultivo sénil y planctónico ejercen un efecto diferencial sobre la producción de metabolitos secundarios con actividad tensoactivo en *Glutamicibacter* sp. XHA18, se realizó una cinética de producción bajo ambas condiciones, evaluándose cada 24 h la actividad emulsificante y la capacidad de reducir la tensión superficial mediante el método de gota colapsada. Los resultados mostraron que, desde las primeras 24 h de incubación, el cultivo sénil favoreció una mayor actividad emulsificante, la cual se mantuvo estable durante todo el periodo evaluado. En contraste, el cultivo planctónico mostró una actividad considerablemente menor y menos sostenida, lo que sugiere que el modo de crecimiento influye significativamente en la biosíntesis y estabilidad de estos metabolitos. No obstante, durante toda la cinética no se detectó actividad asociada a la reducción de la tensión superficial, lo cual indica que, *Glutamicibacter* sp. XHA18 no produce compuestos con propiedades biosurfactantes, sino únicamente bioemulsificantes.

Estos hallazgos coinciden con estudios previos (Flemming y Wingender, 2010; Hall-Stoodley et al., 2004) que demuestran cómo las biopelículas tienen un impacto directo sobre la producción y funcionalidad de los metabolitos secundarios. Esta ventaja puede atribuirse a varios factores inherentes a la fisiología de las biopelículas. En este tipo de crecimiento, las células bacterianas se encuentran inmersas en una matriz extracelular autogenerada, rica en polisacáridos, proteínas y lípidos, que no solo ofrece protección frente a condiciones ambientales adversas, sino que también modula la expresión génica involucrada en la síntesis de compuestos bioactivos (Flemming et al., 2016; Limoli et al., 2015). Además, se ha reportado que el microambiente dentro de una biopelícula promueve una mayor interacción célula-célula y una concentración localizada de señales de *quorum sensing*, lo que puede inducir rutas metabólicas específicas que no se expresan en crecimiento libre (Karatan y Watnick, 2009). En el caso de los EPS, estas condiciones permiten una



síntesis más estructurada y funcional, lo que explicaría la mayor estabilidad observada en los compuestos obtenidos bajo esta condición. Por ejemplo, Singh et al. (2006) demostraron que bacterias cultivadas en biopelícula produjeron EPS con una arquitectura más compleja y una mejor capacidad emulsificante frente a hidrocarburos pesados. En contraste, los cultivos planctónicos presentan tasas de crecimiento elevadas, pero no favorecen la producción sostenida de estas moléculas (Branda et al., 2005). La capacidad bioemulsificante del EPS producido en cultivo sésil lo hace particularmente atractivo para aplicaciones industriales.

Diversos estudios han evidenciado que la composición del medio de cultivo influye de manera significativa en la funcionalidad de metabolitos extracelulares, como los EPS. En este estudio, se evaluaron seis variables: dextrosa, peptona, extracto de levadura, velocidad de agitación, salinidad y pH, con el objetivo de comprender su impacto sobre la actividad y estabilidad emulsificante del EPS producido por *Glutamicibacter* sp. XHA18.

Los resultados mostraron que la dextrosa desempeña un papel clave en la producción del compuesto emulsificante. Como fuente primaria de carbono y de arranque, la dextrosa ha sido ampliamente reportada como un sustrato eficiente para promover la síntesis de EPS al proveer energía fácilmente metabolizable y precursores estructurales (Banat et al., 2021; 2014; Sutherland, 2001). Sin embargo, también se ha reportado que un exceso de este carbohidrato puede tener un efecto negativo en la producción de EPS debido a un efecto de represión catabólica (Maalej et al., 2015), efecto observado en este estudio (datos no mostrados). El extracto de levadura aporta nutrientes esenciales como vitaminas, minerales y factores de crecimiento que favorecen el crecimiento y la expresión de rutas biosintéticas complejas (Flemming y Wingender, 2010; Hall-Stoodley et al., 2004; Sharma et al., 2023). De forma semejante, la peptona, al actuar como una fuente orgánica de nitrógeno, puede favorecer tanto el crecimiento microbiano como la producción de metabolitos secundarios, al influir en la actividad de enzimas esenciales involucradas en las rutas biosintéticas de polisacáridos (Delbarre-Ladrat et al., 2022). No obstante, a concentraciones elevadas tanto la peptona como el extracto de levadura pueden



ejercer un efecto de inhibición metabólica o represión por exceso de nutrientes. En este contexto, se ha reportado que elevadas concentraciones de nitrógeno orgánico y factores de crecimiento estimulan las rutas metabólicas asociadas a la proliferación celular, lo que conlleva una reducción en la síntesis de metabolitos extracelulares como los exopolisacáridos (Vuyst y Vandamme, 1994). Adicionalmente, compuestos solubles en el medio, pueden alterar la osmolaridad y la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de polisacáridos estructurados, afectando la conformación funcional del EPS y su capacidad de emulsión (Janczarek, 2011). En particular, se observó que la actividad puede mantenerse sin el aporte de peptona en el medio (datos no mostrados). Esto sugiere que el fin de este sustrato está más dirigido a la formación de biomasa que a la producción de EPS (Jyoti et al., 2024).

En este trabajo no solo se consideró la capacidad de emulsificación, sino también la estabilidad de las emulsificaciones formadas. Los mejores resultados se obtuvieron con una relación de C/N de 11.36 en condiciones de cultivo séstil y de 16.00 en cultivo planctónico, alcanzando índices de emulsificación de 56.87 ± 1.73 y 57.05 ± 0.59 respectivamente. Estas proporciones carbono/nitrógeno son coherentes con investigaciones previas que señalan una mayor eficiencia en la biosíntesis de exopolisacáridos cuando se emplean condiciones con niveles moderadamente altos de carbono y una disponibilidad limitada de nitrógeno (Cui et al., 2017; Miqueleto et al., 2010). Estos hallazgos confirman la importancia de establecer concentraciones óptimas y no necesariamente recurrir a formulaciones máximas, para favorecer tanto la cantidad como la funcionalidad del biopolímero producido por *Glutamicibacter* sp. XHA18. En este caso, el uso de concentraciones excesivas resultó en una pérdida significativa de la actividad emulsificante.

Respecto a las condiciones fisicoquímicas, se observó que un pH alcalino (8.6) favorece la actividad emulsificante del EPS en ambos cultivos, posiblemente a la estabilización de su estructura polimérica en condiciones básicas, comportamiento ya reportado para otros EPS bacterianos (Muñoz-Almagro et al., 2020). En ese mismo sentido, también se ha reportado que una concentración de pH elevado puede



potenciar la actividad enzimática responsable de la síntesis de EPS, mejorando la producción (Ju et al., 2022).

En cambio, la salinidad mostró un efecto dual y contrastante. Por un lado, su presencia durante el cultivo redujo la actividad emulsificante, probablemente debido al aumento en la osmolaridad del medio, lo que podría afectar la expresión de genes involucrados en la biosíntesis del EPS, fenómeno reportado también cuando los componentes del medio se encuentran en altas concentraciones. Por otro lado, cuando el microorganismo se cultiva en condiciones sin sal, pero el sobrenadante libre de células (SLC) se suplementa posteriormente con sal, esta actúa como un estabilizante externo de las emulsiones. Este comportamiento se ha asociado a fenómenos de repulsión electrostática entre moléculas de EPS con carga negativa, como ocurre en el caso del EPS purificado de *Glutamicibacter* sp. XHA18, lo que contribuye a una mayor estabilidad coloidal (Mulligan, 2005). La capacidad que posee el EPS para conservar su eficacia en ambientes con alta salinidad lo hace especialmente adecuado para aplicaciones en entornos exigentes, como los procesos de la industria petrolera o marina, donde las condiciones salinas representan un desafío crítico en la selección de bioemulsificantes funcionales (Mann y Wozniak, 2012).

La velocidad de agitación también mostró influencia en la producción y funcionalidad del EPS, ya que afecta la oxigenación del medio, la disponibilidad de nutrientes y el cizallamiento celular. Estos factores son reconocidos por influir tanto en la masa celular como en la calidad del metabolito producido (Villarreal-Soto et al., 2019).

Si bien en este estudio no se realizó una optimización cuantitativa exhaustiva del medio de cultivo, los análisis estadísticos permitieron identificar las condiciones más favorables y funcionales para la producción y estabilidad del EPS por *Glutamicibacter* sp. XHA18. En particular, se observó que ciertas combinaciones de sustratos en concentraciones reducidas mantienen una actividad emulsificante comparable a la del medio original lo que sugiere la viabilidad de diseñar formulaciones más económicas y sostenibles, sin comprometer la funcionalidad del



compuesto emulsificante. Esta reducción en la concentración de componentes representa una ventaja potencial para procesos de escala industrial, ya que puede disminuir los costos de producción sin afectar el rendimiento del EPS (Muthusamy et al., 2008). Por otra parte, cuando se realizaron las emulsificaciones utilizando tanto el EPS purificado al 1% como el sobrenadante libre de células (SLC), se obtuvieron índices de emulsificación y niveles de estabilidad similares. Este resultado sugiere que el uso directo del SLC podría ser viable, lo cual permitiría prescindir, al menos parcialmente, de etapas complejas y costosas de purificación. Esta simplificación del proceso incrementaría su viabilidad comercial, especialmente en aplicaciones donde no se requiere un biopolímero altamente refinado (Gao et al., 2024; Uzoigwe et al., 2015).

El EPS producido por *Glutamicibacter* sp. XHA18 bajo condiciones de cultivo séstil presentó una capacidad emulsificante superior en comparación con el obtenido en cultivo planctónico. Esta diferencia funcional puede atribuirse a la arquitectura molecular del polímero sintetizado durante su crecimiento estimulando la formación de la biopelícula, en la que se favorecen la formación de estructuras más complejas y estables. La capacidad para formar emulsiones duraderas con diversos sustratos hidrofóbicos sugiere un amplio potencial de aplicación en procesos que requieren una separación controlada de fases, como en el tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos, formulaciones cosméticas y sistemas alimentarios.

La notable estabilidad del EPS frente a condiciones de alta salinidad y pH alcalino refuerza su idoneidad para ambientes extremos, donde los emulsificantes sintéticos suelen perder eficacia. Esta característica lo posiciona como un candidato prometedor para su uso en la industria petrolera, particularmente en procesos de recuperación mejorada de petróleo o biorremediación de suelos y aguas contaminadas (Muthusamy et al., 2008; Uzoigwe et al., 2015). Además, su origen microbiano y baja toxicidad lo convierten en una alternativa ecológica y sostenible frente a emulsificantes químicos derivados del petróleo, lo cual responde a la creciente demanda de compuestos biodegradables y compatibles con entornos



naturales en industrias como la alimentaria y cosmética (Li et al., 2021; Suryawanshi et al., 2022).

El análisis del EPS utilizando las técnicas de FTIR, UV-Vis, XRD y SEM y potencial zetas, confirmó su composición y propiedades fisicoquímicas. El espectro FTIR evidenció la presencia de grupos funcionales característicos de los exopolisacáridos, como hidroxilos (-OH), carbonilos (C=O) y cadenas alifáticas, lo que coincide con estudios previos (Rehman et al., 2021; Sheng et al., 2022). El análisis UV-Vis mostró una banda de absorción en 280 nm, indicativa de la presencia de proteínas asociadas al EPS, lo que sugiere una posible interacción con macromoléculas biológicas (Silverstein et al., 2014). Por otro lado, la difracción de rayos X reveló picos característicos de compuestos orgánicos, en concordancia con estudios sobre polisacáridos extracelulares (Mathivanan et al., 2021). Las imágenes obtenidas mediante SEM mostraron que el EPS presenta una morfología amorfa y porosa, lo que podría conferirle una alta capacidad de retención de agua, haciéndolo potencialmente útil en aplicaciones que requieran conservación de humedad (Nambiar et al., 2018). Finalmente, el análisis del potencial zeta determinó que la carga superficial netamente negativa del EPS favorece la estabilidad coloidal al generar repulsión electrostática entre las partículas. Este comportamiento es deseable en sistemas emulsionados, ya que ayuda a evitar la coalescencia de las fases y garantiza una mayor persistencia de la emulsión bajo diversas condiciones fisicoquímicas, favoreciendo su uso en diversas aplicaciones industriales (Gandhi et al., 2017).

Las pruebas de toxicidad realizadas en *Artemia salina* y *Cucumis sativus* muestran que el EPS producido por *Glutaminicibacter* sp. XHA18 no presenta toxicidad significativa para organismos acuáticos y terrestres, incluso en las concentraciones más altas evaluadas. No obstante, en concentraciones elevadas se observó una reducción del crecimiento radicular de *C. sativus*, posiblemente atribuida a la formación de una barrera física sobre la superficie de la raíz que limita la absorción de agua. En cambio, en concentraciones bajas, no se observaron efectos fitotóxicos, lo que sugiere su viabilidad de usos para aplicaciones agrícolas sin comprometer el



desarrollo vegetal (Chen et al., 2023; Nunes et al., 2006). Estos resultados son consistentes con estudios previos donde EPS bacterianos han documentado efectos positivos en la germinación y crecimiento de plantas, así como en la mejora de las propiedades fisicoquímicas del suelo (Wei et al., 2024; Xiong et al., 2019). Sin embargo, se recomienda explorar su impacto en otras especies vegetales para determinar su aplicabilidad en diferentes contextos agrícolas.



CAPITULO VI: CONCLUSIONES

Este estudio reporta por primera vez, la producción de un exopolisacárido (EPS) con actividad emulsificante por una cepa del género *Glutamicibacter*, aislada de un cenote prístino en la península de Yucatán en dos condiciones de cultivo contrastante (planctónico y sésil).

El cultivo sésil estimulo el crecimiento del microorganismo, que a su vez se reflejó en una mejor producción, funcionalidad y estabilidad del EPS producido en este escenario. Además, este cultivo favorece significativamente la síntesis y estabilidad de la actividad emulsificante en tan solo 24 h y con un rendimiento del EPS superior en casi al doble en comparación con cultivos planctónicos.

La composición del medio también tuvo un papel determinante. Se observó que ciertas combinaciones de sustratos en concentraciones reducidas mantienen una actividad comparable a la del medio inicial, lo que representa una oportunidad para diseñar formulaciones más económicas y sostenibles. Los análisis genómicos revelaron la presencia de rutas metabólicas asociadas a la biosíntesis de EPS y de enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos, lo que proporciona una base molecular para futuras estrategias de optimización genética.

Las técnicas de caracterización confirmaron que el EPS responsable de la actividad emulsificante es un biopolímero no iónico, con estructura amorfa, porosa y alta estabilidad frente a variaciones de pH y salinidad, lo que respalda su potencial uso en aplicaciones industriales, especialmente en entornos extremos. Además, los ensayos de toxicidad indicaron que el EPS no es tóxico para *Artemia salina* ni para *Cucumis sativus* a bajas concentraciones; sin embargo, a concentraciones elevadas puede limitar el crecimiento radicular, posiblemente por efectos físicos sobre la absorción de agua y nutrientes.

En conjunto, estos hallazgos destacan a *Glutamicibacter* sp. XHA18 como una fuente microbiana prometedora para la producción de EPS con propiedades



emulsificantes. Su estabilidad en condiciones adversas, bajo impacto ambiental y potencial versatilidad industrial lo posicionan como un candidato atractivo para aplicaciones en biotecnología, agricultura y biorremediación.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México



CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

Los hallazgos de este trabajo proporcionan una base sólida para la comprensión de la biosíntesis de exopolisacáridos (EPS) bioemulsificantes por la cepa *Glutamicibacter* sp. XHA18, así como de su estabilidad y potencial biotecnológico. Sin embargo, para maximizar el aprovechamiento de este compuesto en distintas aplicaciones industriales, es necesario continuar con estudios complementarios que permitan profundizar en su caracterización, producción y aplicabilidad.

1. Producir el EPS en un sistema a gran escala, con el fin de optimizar la producción y reducir costos industriales.
2. Explorar el uso de materias primas de bajo costo y origen renovable, como residuos agroindustriales o efluentes ricos en azúcares, que permitan mejorar la viabilidad económica y la sustentabilidad de su producción.
3. Realizar la caracterización estructural completa del EPS, mediante técnicas como Resonancia Magnética Nuclear (RMN), para determinar la composición de monómeros, los tipos de enlaces glicosídicos y la configuración estructural. Complementariamente, se recomienda el uso de MALDI-TOF-MS o LC-MS tras hidrólisis controlada del EPS, con el fin de identificar fragmentos oligosacáridicos o posibles componentes funcionales asociados.
4. Validación la funcional del EPS o SLC en condiciones de microcosmo, campo o ambientes controlados para evaluar la eficacia del EPS en procesos de biorremediación de suelos y aguas contaminadas con hidrocarburos u otros compuestos hidrofóbicos.
5. Estudiar la interacción con microbiota y plantas: Investigar el efecto del EPS sobre la microbiota edáfica y su posible influencia positiva en la absorción de nutrientes y en la tolerancia de cultivos agrícolas frente a condiciones de estrés, como salinidad o sequía.



BIBLIOGRAFÍA

- Acmite. (2024, noviembre 8). *Global Surfactant Market*. Market Intelligence. <https://www.acmite.com/market-reports/chemicals/global-surfactant-market.html>
- Antoniou, E., Fodelianakis, S., Korkakaki, E., & Kalogerakis, N. (2015). Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strains using crude oil as carbon source. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00274>
- Arayes, M. A., Mabrouk, M. E. M., Sabry, S. A., & Abdella, B. (2023). Exopolysaccharide production from *Alkalibacillus* sp. w3: statistical optimization and biological activity. *Biologia*, 78(1), 229–240. <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01233-1>
- Ates, O. (2015). Systems biology of microbial exopolysaccharides production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00200>
- Awika, J. M. (2011). *Major cereal grains production and use around the world*. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Badmus, S. O., Amusa, H. K., Oyehan, T. A., & Saleh, T. A. (2021). Environmental risks and toxicity of surfactants: overview of analysis, assessment, and remediation techniques. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 62085–62104. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16483-w/Published>
- Bagur-González, M. G., Estepa-Molina, C., Martín-Peinado, F., & Morales-Ruano, S. (2011). Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *Journal of Soils and Sediments*, 11(2), 281–289. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0285-4>
- Banat, I. M. (1995). Biosurfactans production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource Technology*, 51, 1–12.
- Banat, I. M., Carboué, Q., Saucedo-Castañeda, G., & de Jesús Cázares-Marinero, J. (2021). Biosurfactants: The green generation of speciality chemicals and potential production using Solid-State fermentation (SSF) technology. En *Bioresource Technology* (Vol. 320). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124222>
- Barzkar, N., Sukhikh, S., & Babich, O. (2024). Study of marine microorganism metabolites: new resources for bioactive natural products. En *Frontiers in Microbiology* (Vol. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1285902>
- Bautista-Toledo, M. I., Rivera-Utrilla, J., Méndez-Díaz, J. D., Sánchez-Polo, M., & Carrasco-Marín, F. (2014). Removal of the surfactant sodium dodecylbenzenesulfonate from water by processes based on adsorption/bioadsorption and biodegradation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 418, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.12.001>



- 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>
- Begum, W., Saha, B., & Mandal, U. (2023). A comprehensive review on production of bio-surfactants by bio-degradation of waste carbohydrate feedstocks: an approach towards sustainable development. En *RSC Advances* (Vol. 13, Número 36, pp. 25599–25615). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d3ra05051c>
- Bender, M., Buckley, S., Sattley & Stahl. (2018). *Brock biology of microorganisms fifteenth edition*.
- Berlanga, M., & Guerrero, R. (2016). Living together in biofilms: The microbial cell factory and its biotechnological implications. En *Microbial Cell Factories* (Vol. 15, Número 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0569-5>
- Biniarz, P., Łukaszewicz, M., & Janek, T. (2017). Screening concepts, characterization and structural analysis of microbial-derived bioactive lipopeptides: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(3), 393–410. <https://doi.org/10.3109/07388551.2016.1163324>
- Bonartseva, G. A., Akulina, E. A., Myshkina, V. L., Voinova, V. V., Makhina, T. K., & Bonartsev, A. P. (2017). Alginate biosynthesis by *Azotobacter* bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 53(1), 52–59. <https://doi.org/10.1134/S0003683817010070>
- Branda, S. S., 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>
- Brycki, B., Małecka, I., Koziróg, A., & Otlewska, A. (2017). Synthesis, structure and antimicrobial properties of novel benzalkonium chloride analogues with pyridine rings. *Molecules*, 22(1). <https://doi.org/10.3390/molecules22010130>
- Burgos-Díaz, C., Pons, R., Espuny, M. J., Aranda, F. J., Teruel, J. A., Manresa, A., Ortiz, A., & Marqués, A. M. (2011). Isolation and partial characterization of a biosurfactant mixture produced by *Sphingobacterium* sp. isolated from soil. *Journal of Colloid and Interface Science*, 361(1), 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.05.054>
- Busse, H. J. (2016). Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *arthrobacter* sensu lato, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. Nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(1), 9–37. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000702>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>



- Camacho-Muñoz, D., Martín, J., Santos, J. L., Aparicio, I., & Alonso, E. (2014). Occurrence of surfactants in wastewater: Hourly and seasonal variations in urban and industrial wastewaters from Seville (Southern Spain). *Science of the Total Environment*, 468–469, 977–984. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.020>
- Cerning, J., Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., & Topisirovic, A. L. (1994). Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* cg11 and partial structure analysis of the polymer. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 3914–3919.
- Chen, S. M., Zhang, C. M., Peng, H., Qin, Y. Y., Li, L., Li, C. G., Xing, K., Liu, L. L., & Qin, S. (2023). Exopolysaccharides from endophytic *Glutamicibacter halophytocota* KLBMP 5180 functions as bio-stimulants to improve tomato plants growth and salt stress tolerance. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126717>
- Collivignarelli, M. C., Carnevale Miino, M., Baldi, M., Manzi, S., Abbà, A., & Bertanza, G. (2019). Removal of non-ionic and anionic surfactants from real laundry wastewater by means of a full-scale treatment system. *Process Safety and Environmental Protection*, 132, 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.10.022>
- Cooper, D. G., & Goldenberg, B. G. (1987). Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. En *applied and environmental microbiology*.
- Cui, Y. W., Shi, Y. P., & Gong, X. Y. (2017). Effects of C/N in the substrate on the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and extracellular polymeric substances by *Haloferax mediterranei* via kinetic model analysis. *RSC Advances*, 7(31), 18953–18961. <https://doi.org/10.1039/c7ra02131c>
- Das, L., Deb, S., & Das, S. K. (2020). *Glutamicibacter mishrai* sp. nov., isolated from the coral *Favia veroni* from Andaman Sea. *Archives of Microbiology*, 202(4), 733–745. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01783-0>
- Das, P., Mukherjee, S., & Sen, R. (2008). Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6), 1675–1684. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03701.x>
- Dastgheib, S. M. M., Amoozegar, M. A., Elahi, E., Asad, S., & Banat, I. M. (2007). 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 Carvalho, C. C. C. R. (2018). Marine biofilms: A successful microbial strategy with economic implications. *Frontiers in Marine Science*, 5(APR). <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00126>
- De La Rosa-García, S. C., Muñoz-García, A. A., Barahona-Pérez, L. F., & Gamboa-Angulo, M. M. (2007). Antimicrobial properties of moderately halotolerant bacteria from cenotes of the Yucatan peninsula. *Letters in Applied Microbiology*, 45(3), 289–294. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02185.x>



- Delbarre-Ladrat, C., Sinquin, C., Marchand, L., Bonnetot, S., Zykwinska, A., Verrez-Bagnis, V., & Collicec-Jouault, S. (2022). Influence of the Carbon and Nitrogen Sources on Diabolicsin Production by the Marine *Vibrio diabolicus* Strain CNCM I-1629. *Polymers*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/polym14101994>
- Dias, M. A. M., & Nitschke, M. (2023). Bacterial-derived surfactants: an update on general aspects and forthcoming applications. En *Brazilian Journal of Microbiology* (Vol. 54, Número 1, pp. 103–123). Institute for Ionics. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-00905-7>
- Doğaroğlu, Z. G., & Köleli, N. (2017). Effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles on germination and antioxidant system of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied Ecology and Environmental Research*, 15(3), 1499–1510. https://doi.org/10.15666/aeer/1503_14991510
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. En *Scientia Horticulturae* (Vol. 196, pp. 3–14). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Edwards, K. R., Lepo, J. E., & Lewis, M. A. (2003). Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. *Marine Pollution Bulletin*, 46(10), 1309–1316. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00238-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00238-8)
- Ehlers, L. J., & Luthy, R. G. (2003). *Contaminant BIOAVAILABILITY in Soil and Sediment Improving risk assessment and remediation rests on better understanding bioavailability*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/es032524f>
- Ertesvåg, H. (2015). Alginate-modifying enzymes: Biological roles and biotechnological uses. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00523>
- Ferreira, I. N. S., Rodríguez, D. M., Campos-Takaki, G. M., & Andrade, R. F. da S. (2020). Biosurfactant and bioemulsifier as promising molecules produced by *Mucor hiemalis* isolated from Caatinga soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, 47, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.06.006>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. En *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 14, Número 9, pp. 563–575). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. En *Trends in*



- Biotechnology* (Vol. 29, Número 8, pp. 388–398).
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008>
- Funari, R., & Shen, A. Q. (2022). Detection and characterization of bacterial biofilms and biofilm-based sensors. *ACS Sensors*, 7(2), 347–357.
<https://doi.org/10.1021/acssensors.1c02722>
- G., K. K., & M., R. R. (2014). Effect of carbon and nitrogen sources on exopolysaccharide production by rhizobial isolates from root nodules of *Vigna trilobata*. *African Journal of Microbiology Research*, 8(22), 2255–2260. <https://doi.org/10.5897/ajmr2013.6539>
- Gandhi, A. D., Vizhi, D. K., Lavanya, K., Kalpana, V. N., Devi Rajeswari, V., & Babujanathanam, R. (2017). In vitro anti- biofilm and anti-bacterial activity of *Sesbania grandiflora* extract against *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 12, 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.004>
- Gao, Y., Li, X., Xu, H., Sun, H., Zhang, J., Wu, X., & Fu, J. (2024). Response surface methodology-based optimization of *Inonotus hispidus*' liquid fermentation medium and evaluation of its exopolysaccharide activities. *Frontiers in Microbiology*, 15.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1456461>
- Garcia-Vallve, S., Romeu, A., & Palau, J. (2000). Horizontal gene transfer in bacterial and archaeal complete genomes. *Genome Research*, 10(11), 1719–1725.
<https://doi.org/10.1101/gr.130000>
- Gong, M., Kong, M., Huo, Q., He, J., He, J., Yan, Z., Lu, C., Jiang, Y., Song, J., Han, W., & Lv, G. (2024). Ultrasonic treatment can improve maize seed germination and abiotic stress resistance. *BMC Plant Biology*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05474-x>
- Gross, H., & Loper, J. E. (2009). Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Natural Product Reports*, 26(11), 1408–1446.
<https://doi.org/10.1039/b817075b>
- Guan, C., Yu, P., Su, J., Liu, Y., Zhang, C., Chen, D., Huang, Y., & Gu, R. (2025). Characterization of novel exopolysaccharide from *Lacticaseibacillus rhamnosus* YT: Structural features, biosynthetic gene expression, physical properties and bioactivities. *LWT*, 219, 117559. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.117559>
- Gudiña, E. J., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2016). Biosurfactants produced by marine microorganisms with therapeutic applications. *Marine Drugs*, 14(2).
<https://doi.org/10.3390/md14020038>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Healy, M. G., Devine, C. M., & Murphy, R. (1996). *Microbial production of biosurfactants*. 18, 57.



- Imfeld, G., & Vuilleumier, S. (2012). Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review. *European Journal of Soil Biology*, 49, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2011.11.010>
- Islam, S. T., & Lam, J. S. (2014). Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway. *Canadian Journal of Microbiology*, 60(11), 697–716. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0595>
- 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>
- Janczarek, M. (2011). Environmental Signals and Regulatory Pathways That Influence Exopolysaccharide Production in Rhizobia. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(11), 7898–7933. <https://doi.org/10.3390/ijms12117898>
- János Bérdy. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal Of Antibiotics*, 58(1), 1–26.
- Jean F. MacFaddin. (2000). *Biochemical tests for identification of medical bacteria* (3rd ed.). Williams and Wilkins.
- Jimoh, A. A., & Lin, J. (2019). Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 184. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109607>
- Ju, Y., Shan, K., Liu, W., Xi, C., Zhang, Y., Wang, W., Wang, C., Cao, R., Zhu, W., Wang, H., Zhao, Y., & Hao, L. (2022). Effect of different initial fermentation pH on exopolysaccharides produced by *Pseudoalteromonas agarivorans* Hao 2018 and identification of key genes involved in exopolysaccharide synthesis via transcriptome analysis. *Marine Drugs*, 20(2). <https://doi.org/10.3390/md20020089>
- Jyoti, K., Soni, K., & Chandra, R. (2024). Optimization of the production of Exopolysaccharide (EPS) from biofilm-forming bacterial consortium using different parameters. *The Microbe*, 4, 100117. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100117>
- Karatan, E., & Watnick, P. (2009). Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(2), 310–347. <https://doi.org/10.1128/mubr.00041-08>
- 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*, 4(3), 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007>
- Karthik, Y., Ishwara Kalyani, M., Krishnappa, S., Devappa, R., Anjali Goud, C., Ramakrishna, K., Wani, M. A., Alkafafy, M., Hussien Abduljabbar, M., Alswat, A. S., Sayed, S. M., & Mushtaq, M. (2023). Antiproliferative activity of antimicrobial peptides and bioactive compounds from the mangrove *Glutamicibacter mysorens*. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1096826>



- Kaur, N., & Dey, P. (2023). Bacterial exopolysaccharides as emerging bioactive macromolecules: from fundamentals to applications. *Research in Microbiology*, 174(4), 104024. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.104024>
- Kaur Walia, N., & Swaranjit Singh, C. (2015). Lipopeptides: Biosynthesis and Applications. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 07(02). <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000189>
- Koren, S., Walenz, B. P., Berlin, K., Miller, J. R., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2017). Canu: Scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Research*, 27(5), 722–736. <https://doi.org/10.1101/gr.215087.116>
- Kreft, L., Botzki, A., Coppens, F., Vandepoele, K., & Van Bel, M. (2017). PhyD3: A phylogenetic tree viewer with extended phyloXML support for functional genomics data visualization. *Bioinformatics*, 33(18), 2946–2947. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx324>
- Lagesen, K., Hallin, P., Rødland, E. A., Stærfeldt, H. H., Rognes, T., & Ussery, D. W. (2007). RNAmmer: Consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 35(9), 3100–3108. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm160>
- Lefort, V., Desper, R., & Gascuel, O. (2015). FastME 2.0: A comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program. *Molecular Biology and Evolution*, 32(10), 2798–2800. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv150>
- Li, M., Zhou, J., Xu, F., Li, G., & Ma, T. (2021). An cost-effective production of bacterial exopolysaccharide emulsifier for oil pollution bioremediation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 159. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105202>
- Li, Y., Li, Q., Fengying, Y., Bao, J., Hu, Z., Zhu, W., Zhao, Y., Lin, Z., & Dong, Q. (2015). Chromium (VI) detoxification by oxidation and flocculation of exopolysaccharides from *Arthrobacter* sp. B4. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.013>
- Li, Z. G., Gou, H. Q., & Li, R. Q. (2019). Electrical stimulation boosts seed germination, seedling growth, and thermotolerance improvement in maize (*Zea mays* L.). *Plant Signaling and Behavior*, 14(12). <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1681101>
- Libralato, G. (2014). The case of *Artemia* spp. in nanoecotoxicology. *Marine Environmental Research*, 101(1), 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.08.002>
- Libralato, G., Prato, E., Migliore, L., Cicero, A. M., & Manfra, L. (2016). A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological Indicators*, 69, 35–49. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.04.017>
- Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2015). Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiology Spectrum*, 3(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0011-2014>



- Liu, X., Ren, B., Chen, M., Wang, H., Kokare, C. R., Zhou, X., Wang, J., Dai, H., Song, F., Liu, M., Wang, J., Wang, S., & Zhang, L. (2010). Production and characterization of a group of bioemulsifiers from the marine *Bacillus velezensis* strain H3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(5), 1881–1893. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2653-9>
- Liu, Z., Fadiji, T., Yang, J., Li, Z., & Tchuembou-Magaia, F. (2023). Impact of mechanical stimulation on the life cycle of horticultural plant. *Horticultural Plant Journal*, 9(3), 381–394. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2023.01.003>
- LPSN. (2025, noviembre 14). *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*. <https://lpsn.dsmz.de/genus/glutamicibacter>
- Luc Vuyst, & Erick J. Vandamme. (1994). BACTERIOCINS OF LACTIC ACID BACTERIA. *Microbiology, Genetics and Applications*.
- Maalej, H., Hmidet, N., Boisset, C., Buon, L., Heyraud, A., & Nasri, M. (2015). Optimization of exopolysaccharide production from *Pseudomonas stutzeri* AS22 and examination of its metal-binding abilities. *Journal of Applied Microbiology*, 118(2), 356–367. <https://doi.org/10.1111/jam.12688>
- Maldonado-Desena, F., De la Cruz-Ceferino, N., Gómez-Cornelio, S., Alvarez-Villagomez, C., Herrera-Candelario, J. L., & De la Rosa-García, S. (2022). Bacteria Halotolerant from Karst Sinkholes as a Source of Biosurfactants and Bioemulsifiers. *Microorganisms*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071264>
- Mann, E. E., & Wozniak, D. J. (2012). Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 893–916. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x>
- 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>
- Mathivanan, K., Chandirika, J. U., Mathimani, T., Rajaram, R., Annadurai, G., & Yin, H. (2021). Production and functionality of exopolysaccharides in bacteria exposed to a toxic metal environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111567>
- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H.-P., & Oker, M. G. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. En *BMC Bioinformatics* (Vol. 14). <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/14/60>
- Meier-Kolthoff, J. P., Carbasse, J. S., Peinado-Olarte, R. L., & Göker, M. (2022). TYGS and LPSN: A database tandem for fast and reliable genome-based classification and



- nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D801–D807. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab902>
- Meier-Kolthoff, J. P., & Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>
- Meier-Kolthoff, J. P., Hahnke, R. L., Petersen, J., Scheuner, C., Michael, V., Fiebig, A., Rohde, C., Rohde, M., Fartmann, B., Goodwin, L. A., Chertkov, O., Reddy, T., Pati, A., Ivanova, N. N., Markowitz, V., Kyrpides, N. C., Woyke, T., Göker, M., & Klenk, H.-P. (2014). EXTENDED GEN Complete genome sequence of DSM 30083 T, the type strain (U5/41 T) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy. *BMC Bioinformatics*. <http://www.standardsingenomics.com/content/9/1/2>
- Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P., & Göker, M. (2014). Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 2), 352–356. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.056994-0>
- Meseguer Soria, I. (2004). Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología. *Ciencia e Investigación*, 7(2), 13–17.
- Miqueleto, A. P., Dolosic, C. C., Pozzi, E., Foresti, E., & Zaiat, M. (2010). Influence of carbon sources and C/N ratio on EPS production in anaerobic sequencing batch biofilm reactors for wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 101(4), 1324–1330. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.026>
- Mohammed, Y. M. M., Saad, M. M. G., & Abdelgaleil, S. A. M. (2021). Production, characterization and bio-emulsifying application of exopolysaccharides from *Rhodotorula mucilaginosa* YMM19. *3 Biotech*, 11(7). <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02898-2>
- Monnet, C., Loux, V., Gibrat, J. F., Spinnler, E., Barbe, V., Vacherie, B., Gavory, F., Gourbeyre, E., Siguier, P., Chandler, M., Elleuch, R., Irlinger, F., & Vallaes, T. (2010). The *Arthrobacter arilaitensis* Re117 genome sequence reveals its genetic adaptation to the surface of cheese. *PLoS ONE*, 5(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015489>
- Moreno-Paz, M., Gómez, M. J., Arcas, A., & Parro, V. (2010). Environmental transcriptome analysis reveals physiological differences between biofilm and planktonic modes of life of the iron oxidizing bacteria *Leptospirillum* spp. in their natural microbial community. *BMC Genomics*, 11, 404. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/404>
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/404>
- Moura, A. G. L., Centurion, V. B., Okada, D. Y., Motteran, F., Delforno, T. P., Oliveira, V. M., & Varesche, M. B. A. (2019). Laundry wastewater and domestic sewage pilot-scale anaerobic treatment: Microbial community resilience regarding sulfide production. *Journal of Environmental Management*, 251. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109495>



- Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. En *Trends in Biotechnology* (Vol. 24, Número 11, pp. 509–515). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.09.005>
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133(2), 183–198. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>
- Muñoz-Almagro, N., Gilbert-López, B., Pozuelo-Rollón, M. C., García-Fernandez, Y., Almeida, C., Villamiel, M., Mendiola, J. A., & Ibáñez, E. (2020). Exploring the microalga *euglena cantabrica* by pressurized liquid extraction to obtain bioactive compounds. *Marine Drugs*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/md18060308>
- Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Kochupappy Ravi, T., & Sivachidambaram, P. (2008). Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Current Science Association*, 94(6), 736–747. <https://about.jstor.org/terms>
- Nambiar, R. B., Sellamuthu, P. S., Perumal, A. B., Sadiku, E. R., Phiri, G., & Jayaramudu, J. (2018). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* HM47 isolated from human breast milk. *Process Biochemistry*, 73, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.018>
- Nickzad, A., & Déziel, E. (2014). The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development - an approach for control? *Letters in Applied Microbiology*, 58(5), 447–453. <https://doi.org/10.1111/lam.12211>
- 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>
- Nunes, B. S., Carvalho, F. D., Guilhermino, L. M., & Van Stappen, G. (2006). Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. En *Environmental Pollution* (Vol. 144, Número 2, pp. 453–462). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.037>
- Nunes, R. F., & Teixeira, A. C. S. C. (2022). An overview on surfactants as pollutants of concern: Occurrence, impacts and persulfate-based remediation technologies. En *Chemosphere* (Vol. 300). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134507>
- OCDE-FAO. (2024). *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2024-2033*. OECD. <https://doi.org/10.1787/2b0c9d81-es>
- Oliveira, P. H., Touchon, M., & Rocha, E. P. C. (2016). Regulation of genetic flux between bacteria by restriction-modification systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(20), 5658–5663. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603257113>
- Ondov, B. D., Treangen, T. J., Melsted, P., Mallonee, A. B., Bergman, N. H., Koren, S., & Phillippy, A. M. (2016). Mash: Fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0997-x>



- Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 56–63. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000176>
- Pacwa-Płociniczak, M., Płociniczak, T., Iwan, J., Zarska, M., Chorazewski, M., Dzida, M., & Piotrowska-Seget, Z. (2016). Isolation of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria and assessment their plant growth-promoting traits. *Journal of Environmental Management*, 168, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.11.058>
- Perfumo, A., Smyth, T. J. P., Marchant, R., & Banat, I. M. (2010). Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates. En *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 1501–1512). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_103
- Qin, S., Xing, K., Jiang, J. H., Xu, L. H., & Li, W. J. (2011). Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. En *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 89, Número 3, pp. 457–473). <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2923-6>
- Raiger lustman, L. J., & López, N. I. (2009). Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Química viva*, 8(3), 146–161. www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar
- Ramprasad, C., & Philip, L. (2016). Surfactants and personal care products removal in pilot scale horizontal and vertical flow constructed wetlands while treating greywater. *Chemical Engineering Journal*, 284, 458–468. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.08.092>
- Rana, S., & Upadhyay, L. S. B. (2020). Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 157, 577–583. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.084>
- Rehman, Z. U., Vrouwenvelder, J. S., & Saikaly, P. E. (2021). Physicochemical Properties of Extracellular Polymeric Substances Produced by Three Bacterial Isolates From Biofouled Reverse Osmosis Membranes. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.668761>
- Reis, R. S., Pacheco, G. J., Pereira, A. G., & Freire, D. M. G. (2013). Biosurfactants: Production and Applications. En *Biodegradation - Life of Science*. InTech. <https://doi.org/10.5772/56144>
- Research & Markets. (2024, noviembre 10). *Global Biosurfactants Market*. The world's largest market research store. <https://www.researchandmarkets.com/reports/4437552/global-biosurfactants-market-by-type>
- Reyes, P., Sabrina, Y., & Scipio, D. I. (2012). Caracterización físico-química de emulsiones de aceite de maíz en agua physicochemical characterization of corn oil in water emulsions. *Revista de la Facultad de Ingeniería U.C.V.*, 27(1), 56–69.



- Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, David J. Kiemle, & David L. Bryce. (2014). *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (I. John Wiley & Sons, Ed.; 7 th).
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2001). Minireview Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 3(4), 229–236.
- Rouphael, Y., & Colla, G. (2020). Editorial: Biostimulants in Agriculture. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00040>
- Rubio-Ribeaux, D., da Costa, R. A. M., Montero-Rodríguez, D., do Amaral Marques, N. S. A., Puerta-Díaz, M., de Souza Mendonça, R., Franco, P. M., dos Santos, J. C., & da Silva, S. S. (2023). Sustainable production of bioemulsifiers, a critical overview from microorganisms to promising applications. En *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 39, Número 7). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03611-6>
- Russell, N. J. (1989). Adaptive Modifications in Membranes of Halotolerant and Halophilic Microorganisms. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 21(1), 93–113.
- Ruzzi, M., Colla, G., & Rouphael, Y. (2024). Editorial: Biostimulants in agriculture II: towards a sustainable future. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 15). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1427283>
- Sachdev, D. P., & Cameotra, S. S. (2013). Biosurfactants in agriculture. En *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 97, Número 3, pp. 1005–1016). <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4641-8>
- Samrot, A. V., Mohamed, A. A., Faradjeva, E., Jie, L. S., Sze, C. H., Arif, A., Sean, T. C., Michael, E. N., Mun, C. Y., Qi, N. X., Mok, P. L., & Kumar, S. S. (2021). Mechanisms and impact of biofilms and targeting of biofilms using bioactive compounds—a review. *Medicina (Lithuania)*, 57(8). <https://doi.org/10.3390/medicina57080839>
- 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). <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>
- Sayers, E. W., Beck, J., Bolton, E. E., Brister, J. R., Chan, J., Comeau, D. C., Connor, R., DiCuccio, M., Farrell, C. M., Feldgarden, M., Fine, A. M., Funk, K., Hatcher, E., Hoepfner, M., Kane, M., Kannan, S., Katz, K. S., Kelly, C., Klimke, W., ... Sherry, S. T. (2024). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D33–D43. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1044>
- Schmid, J., Sieber, V., & Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: Biosynthesis pathways and engineering strategies. En *Frontiers in Microbiology* (Vol. 6, Número MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00496>
- Serrato, R. V. (2022). Bacterial Alginate Biosynthesis and Metabolism. *IntechOpen*. <https://doi.org/doi:10.5772/intechopen.109295>



- 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), 5–10. <https://doi.org/10.5958/2394-5478.2016.00002.9>
- Sharma, N., Kabeer, S. W., Singh, I. P., & Tikoo, K. (2023). Cisplatin conjugation with an exopolysaccharide extracted from *Lactobacillus gasseri* potentiates its efficacy and attenuates its toxicity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 225, 227–240. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.256>
- Sheng, S., Fu, Y., Pan, N., Zhang, H., Xiu, L., Liang, Y., Liu, Y., Liu, B., Ma, C., Du, R., & Wang, X. (2022). Novel exopolysaccharide derived from probiotic *Lactobacillus pantheris* TCP102 strain with immune-enhancing and anticancer activities. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1015270>
- Shuhong, Y., Meiping, Z., Hong, Y., Han, W., Shan, X., Yan, L., & Jihui, W. (2014). Biosorption of Cu²⁺, Pb²⁺ and Cr⁶⁺ by a novel exopolysaccharide from *Arthrobacter ps-5*. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.021>
- Singh, R., Paul, D., & Jain, R. K. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. En *Trends in Microbiology* (Vol. 14, Número 9, pp. 389–397). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.07.001>
- Smyth, T. J. P., Perfumo, A., McClean, S., Marchant, R., & Banat*, I. M. (2010). Isolation and Analysis of Lipopeptides and High Molecular Weight Biosurfactants. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 3687–3704. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_290
- Srinivasan, R., Kannappan, A., Shi, C., & Lin, X. (2021). Marine bacterial secondary metabolites: A treasure house for structurally unique and effective antimicrobial compounds. *Marine Drugs*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/md19100530>
- Stincone, P., & Brandelli, A. (2020). Marine bacteria as source of antimicrobial compounds. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(3), 306–319. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1710457>
- Suresh Kumar, A., Mody, K., & Jha, B. (2007). Evaluation of biosurfactant/bioemulsifier production by a marine bacterium. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79(6), 617–621. <https://doi.org/10.1007/s00128-007-9283-7>
- Suryawanshi, N., Naik, S., & Eswari, J. S. (2022). Exopolysaccharides and their applications in food processing industries. En *Food Science and Applied Biotechnology* (Vol. 5, Número 1, pp. 22–44). University of Food Technologies Plovdiv. <https://doi.org/10.30721/fsab2022.v5.i1.165>
- Sutherland, I. W. (2001). MINI-REVIEW Biofilm exopolysaccharides : a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, 3–9.



- Ta-Chen, L., Chang, J. S., & Young, C. C. (2008). Exopolysaccharides produced by *Gordonia alkanivorans* enhance bacterial degradation activity for diesel. *Biotechnology Letters*, 30(7), 1201–1206. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9667-8>
- Thakur, N., Singh, S. P., & Zhang, C. (2022). Microorganisms under extreme environments and their applications. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100141. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100141>
- Trilokesh, C., Harish, B. S., & Uppuluri, K. B. (2024). The antibiofilm potential of a heteropolysaccharide produced and characterized from the isolated marine bacterium *Glutamicibacter nicotianae* BPM30. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 54(2), 175–183. <https://doi.org/10.1080/10826068.2023.2209886>
- Tripathi, L., Twigg, M. S., Zompra, A., Salek, K., Irorere, V. U., Gutierrez, T., Spyroulias, G. A., Marchant, R., & Banat, I. M. (2019). Biosynthesis of rhamnolipid by a *Marinobacter* species expands the paradigm of biosurfactant synthesis to a new genus of the marine microflora. *Microbial Cell Factories*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1216-8>
- Upadhyaya, C., Patel, H., Patel, I., & Upadhyaya, T. (2025). Extremophilic Exopolysaccharides: Bioprocess and Novel Applications in 21st Century. *Fermentation*, 11(1), 16. <https://doi.org/10.3390/fermentation11010016>
- 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(245), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00245>
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., Renard, T., Rollan, S., & Taillandier, P. (2019). Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. *Process Biochemistry*, 83, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.004>
- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting *rhizobacteria*. En *Microbiological Research* (Vol. 184, pp. 13–24). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>
- Walter, V., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2010). Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. *Biosurfactants*, 1–13.
- Wang, X., Du, G., Qiao, Z., Yang, Y., Shi, H., Zhang, D., & Pan, X. (2023). Environmental concentrations of surfactants as a trigger for climax of horizontal gene transfer of antibiotic resistance. *Heliyon*, 9(6). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17034>
- Wang, X., Sun, C., Gao, S., Wang, L., & Shuokui, H. (2001). Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. *Chemosphere*, 44, 1711–1721. www.elsevier.com/locate/chemosphere



- Wang, Y., Peng, Q., Liu, Y., Wu, N., He, Y., Cui, X., & Dan, T. (2023). Genomic and transcriptomic analysis of genes involved in exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* IMAU20561 grown on different sources of nitrogen. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1328824>
- Watson, M. K., Tezel, U., & Pavlostathis, S. G. (2012). Biotransformation of alkanoylcholines under methanogenic conditions. *Water Research*, 46(9), 2947–2956. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.021>
- Wei, Z., Niu, S., Wei, Y., Liu, Y., Xu, Y., Yang, Y., Zhang, P., Zhou, Q., & Wang, J. J. (2024). The role of extracellular polymeric substances (EPS) in chemical-degradation of persistent organic pollutants in soil: A review. *Science of The Total Environment*, 912, 168877. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168877>
- Whitfield, C. (2006). Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. En *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 75, pp. 39–68). <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142545>
- William Costerton, J., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). *MICROBIAL BIOFILMS*. www.annualreviews.org
- Xiong, Y. W., Gong, Y., Li, X. W., Chen, P., Ju, X. Y., Zhang, C. M., Yuan, B., Lv, Z. P., Xing, K., & Qin, S. (2019). Enhancement of growth and salt tolerance of tomato seedlings by a natural halotolerant actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180 isolated from a coastal halophyte. *Plant and Soil*, 445(1–2), 307–322. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04310-8>
- Xiong, Y. W., Ju, X. Y., Li, X. W., Gong, Y., Xu, M. J., Zhang, C. M., Yuan, B., Lv, Z. P., & Qin, S. (2020). Fermentation conditions optimization, purification, and antioxidant activity of exopolysaccharides obtained from the plant growth-promoting endophytic actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 1176–1185. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.247>
- Yamamoto, K., Hayakawa, K., Nagamatsu, M., Fujiya, Y., Mawatari, M., Kutsuna, S., Takeshita, N., Tamura, S., Mezaki, K., & Ohmagari, N. (2017). Bacteremia due to *Arthrobacter creatinolyticus* in an elderly diabetic man with acute cholangitis. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 70(2), 201–202. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2016.033>
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., & He, J. (2019). Biofilms: The microbial “protective clothing” in extreme environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14). <https://doi.org/10.3390/ijms20143423>
- Zanoletti, A., Federici, S., Borgese, L., Bergese, P., Ferroni, M., Depero, L. E., & Bontempi, E. (2017). Embodied energy as key parameter for sustainable materials selection: The case of reusing coal fly ash for removing anionic surfactants. *Journal of Cleaner Production*, 141, 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.09.070>



- Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., Rajoka, M. S. R., Yang, H., & Jin, M. (2017). Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(15), 5951–5960. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8396-0>
- Zhu, F. J., Ma, W. L., Xu, T. F., Ding, Y., Zhao, X., Li, W. L., Liu, L. Y., Song, W. W., Li, Y. F., & Zhang, Z. F. (2018). Removal characteristic of surfactants in typical industrial and domestic wastewater treatment plants in Northeast China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 153, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.001>



Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional	
Título de Tesis:	INFLUENCIA DEL TIPO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN Y ESTABILIDAD DE UN EXOPOLISACÁRIDO BIOEMULSIFICANTE POR <i>Glutamicibacter</i> sp. XHA18.
Autor(a) o autores(ras) de la Tesis:	Biol. José Luis Herrera Candelario, Dra. Susana del Carmen de la Rosa García y Dra. Guadalupe Eugenia Zarza Franco
ORCID:	https://orcid.org/0009-0003-8538-5615
Resumen de la Tesis:	Los ambientes prístinos albergan una gran diversidad de microorganismos con propiedades únicas y aún poco exploradas, entre ellas, la capacidad de producir exopolisacáridos (EPS) con propiedades bioemulsificantes, lo cual representa un área de creciente interés biotecnológico en la industria alimentaria, farmacéutica y ambiental. En este estudio, se evaluó el efecto de dos condiciones contrastantes de cultivo (sésil y planctónico), sobre la producción y estabilidad de un compuesto emulsificante. Dicho compuesto fue producido por la cepa halotolerante <i>Glutamicibacter</i> sp. XHA18, aislada de un cenote prístino de la península de Yucatán. La producción y estabilidad de este compuesto fue evaluada mediante el índice de emulsificación a 24 h (IE ₂₄). Para ello, se ajustaron las condiciones fisicoquímicas en ambos tipos de cultivo, las cuales incluyeron la fuente de carbono y nitrógeno, así como el pH, agitación y salinidad. Posteriormente se aplicaron



	<p>metodologías específicas para la extracción de compuestos de alto y bajo peso molecular, logrando la purificación de un EPS que fue caracterizado mediante FTIR, UV-Vis, SEM-EDS, XRD y análisis de carga iónica. Los resultados mostraron que el cultivo sésil promovió una mayor actividad emulsificante (IE₂₄ 62.09%) en un tiempo menor (24 h) y estable por más de un año. En contraste, el cultivo planctónico (IE₂₄ 60.09%) a 96 h, demostró la pérdida progresiva de la emulsificación en el tiempo. En ambas condiciones, la dextrosa y un pH alcalino favorecieron significativamente la producción, mientras que la salinidad afectó negativamente la producción del bioemulsificante. El rendimiento de EPS fue superior en cultivo sésil (2.8 g/L) respecto al planctónico (1.8 g/L), y la caracterización FTIR y el potencial Z confirmaron su naturaleza polisacáridica con una carga negativa, asociada a su capacidad de formar emulsiones estables con diversos sustratos hidrofóbicos incluso en condiciones de salinidad al 5 y 10%. Seguidamente, los ensayos toxicológicos realizados con <i>Artemia salina</i> y <i>Cucumis sativus</i> confirmaron la baja toxicidad del EPS, con solo efectos mínimos en plántulas a concentraciones elevadas. El análisis genómico reveló que la cepa XHA18 pertenece al género <i>Glutamicibacter</i>, pero con diferencias en el contenido de G+C y perfil metabólico respecto a otras cepas disponibles en GenBank, lo que sugiere que podría tratarse de una nueva especie. En conjunto, los hallazgos de este estudio aportan información novedosa sobre la biosíntesis y estabilidad del EPS bioemulsificante en condiciones sésiles, con alto rendimiento y estabilidad, proponiendo a <i>Glutamicibacter</i> sp. XHA18 como un recurso biotecnológico promisorio para aplicaciones industriales y ambientales.</p>
--	---



Palabras claves de la Tesis:	Metabolitos secundarios, Toxicidad, Bioestimulación, Tolerancia a salinidad, Emulsificaciones.
Referencias citadas:	<p>Acmite. (2024, noviembre 8). Global Surfactant Market. Market Intelligence. https://www.acmite.com/market-reports/chemicals/global-surfactant-market.html</p> <p>Antoniou, E., Fodelianakis, S., Korkakaki, E., & Kalogerakis, N. (2015). Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strains using crude oil as carbon source. <i>Frontiers in Microbiology</i>, 6(APR). https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00274</p> <p>Arayes, M. A., Mabrouk, M. E. M., Sabry, S. A., & Abdella, B. (2023). Exopolysaccharide production from <i>Alkalibacillus</i> sp. w3: statistical optimization and biological activity. <i>Biologia</i>, 78(1), 229–240. https://doi.org/10.1007/s11756-022-01233-1</p> <p>Ates, O. (2015). Systems biology of microbial exopolysaccharides production. <i>Frontiers in Bioengineering and Biotechnology</i>, 3. https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00200</p> <p>Awika, J. M. (2011). Major cereal grains production and use around the world. https://pubs.acs.org/sharingguidelines</p>