

Mtra. María Elena Contreras Garfias  
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
**PRESENTE**

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
	22	2	2022		23	2	2022

**Datos del Alumno**

Nombre : <b>Karina Osorio Dávila</b>	
Matrícula : <b>2173027615</b>	Licenciatura : <b>Química Farmacéutica Biológica</b> <input type="checkbox"/>
Domicilio : <b>Agustín de Iturbide # 73, San Pedro Tultepec, Lerma de Villada, Estado de México.</b>	
Teléfono :	Celular : <b>5573730941</b>
Correo Electrónico : <b>2173027615@alumnos.xoc.uam.mx</b>	CURP : <b>OODK980922MMCSVR01</b>

**Datos del Proyecto**

Nombre del Proyecto : <b>CARACTERIZACIÓN DE BIOSURFACTANTES PRODUCIDOS POR CEPAS MICROBIANAS AISLADAS DEL RIO LERMA</b>							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : <b>Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Lerma</b>							
Dependencia : <b>Pública</b>							
Entidad Federativa : <b>Distrito Federal</b>							
Municipio : <b>Lerma de Villada</b>	Localidad : <b>El panteón</b>						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	28	2	22		30	9	22

**PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES**

Sector: <b>1.- Educativo</b> <input type="checkbox"/>	Tipo: <b>1.- Externo</b> <input type="checkbox"/>
Orientación: <b>10.- Otros</b>	

**FIRMAS**

**Felipe Mendoza Pérez**

Asesor Interno  
Nombre, firma y No. Económico

**Humberto García Arellano**

Asesor Externo  
Nombre, firma y No. Económico

**Karina Osorio Dávila**

Alumno  
Nombre, firma

**Felipe Mendoza Pérez**

Vo. Bo. de la Comisión  
Nombre y firma de la persona que autoriza

Lerma de Villada, Edo. de México a 2 de octubre de 2022.

**MTRA. MARÍA ELENA CONTRERAS GARFIAS**  
**Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que la alumna KARINA OSORIO DÁVILA, con matrícula 2173027615, concluyó con el proyecto de servicio social "Caracterización de biosurfactantes producidos por cepas microbianas aisladas del río Lerma" que se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Ambiental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma, ubicada en Av. de las Garzas #10, colonia El panteón, CP.52005 Lerma de Villada, Méx., en el periodo comprendido del 28 de febrero al 30 de septiembre de 2022, cubriendo un total de 480 horas.

Durante su estancia en el laboratorio se evaluó el desempeño de la alumna mediante el cumplimiento de los objetivos mismos que fueron alcanzados. Le agradezco de antemano su atención a la presente y le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Mtro. en C. Felipe Mendoza Pérez  
Ciencias Biológicas y de la Salud  
Unidad Xochimilco  
No. Económico 7183



Lerma de Villada, Edo. de México a 26 septiembre de 2022

**MTRA. MARÍA ELENA CONTRERAS GARFIAS**  
**Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que la alumna KARINA OSORIO DÁVILA, con matrícula 2173027615, concluyó con el proyecto de servicio social "Caracterización de biosurfactantes producidos por cepas microbianas aisladas del río Lerma" que se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Ambiental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma, ubicada en Av. de las Garzas #10, colonia El panteón, CP.52005 Lerma de Villada, Méx., en el periodo comprendido del 28 de febrero al 30 de septiembre de 2022, cubriendo un total de 480 horas.

Durante su estancia en el laboratorio se evaluó el desempeño de la alumna mediante el cumplimiento de los objetivos mismos que fueron alcanzados. Le agradezco de antemano su atención a la presente y le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE



Dr. Humberto Garcia Arellano  
Profesor titular C, TC  
Departamento de Ciencias Ambientales  
Unidad Lerma  
No. Económico 35473



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA**

Unidad Lerma

**PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL**

**CARACTERIZACIÓN DE BIOSURFACTANTES PRODUCIDOS POR CEPAS  
MICROBIANAS AISLADAS DEL RÍO LERMA.**

Karina Osorio Dávila 2173027615

**Lic. Química Farmacéutica Biológica**

División: Ciencias Biológicas y de la Salud

*Asesores:*



*Dr. Humberto García Arellano*

Profesor titular C, TC  
Departamento de Ciencias Ambientales  
Unidad Lerma  
No. Económico 35473

*Mtro. Felipe Mendoza Pérez*

Profesor titular C  
Departamento de Ciencias Biológicas y  
de la Salud  
Unidad Xochimilco  
No. Económico 7183

Lerma de Villada, Edo. México, septiembre del 2022.

---

---

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
<b>LA CUENCA ALTA DEL RIO LERMA</b>	<b>3</b>
<b>AMBIENTE EXTREMO</b>	<b>5</b>
<b>GENERALIDADES DE LOS HIDROCARBUROS</b>	<b>5</b>
<b>DIÉSEL</b>	<b>6</b>
Propiedades físicas y químicas	6
Diésel como contaminante	7
<b>BIORREMEDIACIÓN</b>	<b>7</b>
<i>PSEUDOMONAS PROTEGENS</i> COMO BACTERIA BIOCONTROLADORA	8
<b>BIOSURFACTANTES</b>	<b>9</b>
Biosurfactantes producidos por <i>Pseudomonas Protegenes</i>	11
<b>BIODEGRADACIÓN DEL DIÉSEL</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVO PRINCIPAL</b>	<b>15</b>
Objetivos específicos:	15
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>16</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
Identificación de la bacteria	16
Aislamiento y purificación del DNA bacteriano	16
Identificación y secuenciación genética	17
Esterilización del diésel y preparación del medio mínimo salino (MMS)	17
Cinética del crecimiento bacteriano y de la producción de biosurfactante	17

<b>Monitoreo de la cinética de crecimiento y producción de biosurfactante.</b>	<b>18</b>
<b>Extracción líquido/líquido del biosurfactante</b>	<b>19</b>
<b>Detección del biosurfactante</b>	<b>20</b>
<b>Purificación del biosurfactante</b>	<b>21</b>
<b>Identificación del biosurfactante</b>	<b>22</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>24</b>
<b>Identificación genética.</b>	<b>24</b>
<b>Preparación de diésel</b>	<b>28</b>
<b>Cinética</b>	<b>29</b>
<b>Ajuste a modelos matemáticos</b>	<b>31</b>
<b>Cribado primario y secundario</b>	<b>34</b>
<b>Resultados extracción L/L</b>	<b>40</b>
<b>Detección por TLC</b>	<b>41</b>
<b>Purificación</b>	<b>45</b>
<b>Separación por HPLC</b>	<b>47</b>
<b>Identificación IR</b>	<b>55</b>
<b>Discusión</b>	<b>56</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>57</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>58</b>

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los hidrocarburos han generado una deposición mayor de contaminantes sobre la superficie oceánica, lo que conduce al aumento drástico y grave del ambiente marino (King et al., 2019). La penetración en el suelo de hidrocarburos (benceno, tolueno, diésel, poliaromáticos, etc.) día con día aumenta, haciendo que la remediación de aguas y suelos sea una problemática de carácter apremiante, como lo señalan Raiger y López (2009).

Las investigaciones advierten que es necesario aumentar la biodisponibilidad de los hidrocarburos agregando surfactantes, sin embargo, el uso de estos agrega un contaminante extra, por ello es importante y conveniente dar paso al empleo de biosurfactantes puesto que resuelve la problemática del impacto negativo a los ecosistemas y a la salud de los seres vivos, al ser producidos por diversos microorganismos, y al ser biodegradables (Amani et al., 2013). Además, cubriría de forma amigable la demanda prevista para el 2050 de 18 millones de toneladas de surfactantes, estimación dada debido al crecimiento de los estándares de higiene en el mundo (Álvarez, 2014).

La importancia de los biosurfactanes radica en la descontaminación de ambientes marinos, así como su empleo amigable con el planeta, por ello es imprescindible la investigación de metabolitos derivados de bacterias biocontroladoras que se encuentran a nuestro alcance, en este caso el Rio Lerma es un importante nicho de bacterias que cumplen con esta función (Bojórquez, 2010).

En la presente investigación se desarrolló una caracterización del biosurfactante Orfamida A, la investigación se realizó desde la purificación de la cepa 2-2 de *Pseudomonas protegens* proveniente de un consorcio obtenido del Rio Lerma, hasta la generación de la cinética microbiana donde se encontró el punto de mayor emulsión de biosurfactante-diésel que se relacionó con la mayor producción de biosurfactante en el medio.

Se obtuvieron características cualitativas y cuantitativas del biosurfactante mediante diferentes técnicas de cribado y con base en la metodología aprobada de caracterización. Así mismo, se pudo identificar la naturaleza del compuesto, y la purificación de la orfamida A, con esto, se obtuvo información valiosa de las cualidades de la bacteria, así como de las propiedades de degradación del biosurfactante.

## La cuenca alta del Río Lerma

La cuenca del río Lerma o bien, la Cuenca Alta del Río Lerma, se ubica en la zona centro y norponiente del Estado de México (Gobierno del Estado de México, 2018) en los valles de Toluca e Ixtlahuaca, lo que representa el 24% del territorio estatal donde se sitúan 33 municipios del Edo. de México; la Cuenca Alta del Río Lerma (CARL) pertenece a la región hidrológica RH12 – Santiago y genera un caudal de 5.12 m<sup>3</sup>/s de aguas residuales; un gran porcentaje se capta en los alcantarillados, el 0.45 m<sup>3</sup>/s se disponen a través de fosas sépticas y lo demás se dirige hacia los canales, arroyos, y hacia el Río Lerma, el cual representa la principal corriente de agua de la cuenca, y cuya longitud supera 700 km, mismo que desemboca en el océano pacífico, y es alimentado por manantiales que han dado lugar a lagos, ciénagas y manantiales de bajo caudal en sus alrededores. (INEGI, 2019), así mismo, el Río Lerma es el colector general de la cuenca cuyo cauce se origina en la laguna de Almoloya, Estado de México, con coordenadas geográficas de 19° 09' 00 latitud norte y 99° 29' 00 longitud oeste, y termina al desembocar en el lago de Chapala, ubicado en las coordenadas geográficas de 20° 14' 14" latitud norte y 102° 37' 26" longitud oeste (DOF, 1996).

El clima dominante en la cuenca es subtropical lluvioso, le sigue un subhúmedo árido, y en pequeñas regiones se encuentran clima templado subhúmedo, la temperatura en las que oscila todo el año van de los 24° a los 32° C, a diferencia de la parte del alto Lerma las temperaturas durante todo el año se encuentran entre los 5 y los 15 °C. Así mismo, la cuenca tiene una precipitación media anual de 730 mm, las lluvias más importantes ocurren en agosto y septiembre (Aparicio, 2001). Sin embargo, el 64% del total de las aguas residuales que desembocan en el Río Lerma no reciben tratamiento alguno, además, el volcán Xinantécatl o Nevado de Toluca ubicado en la Ciudad de Toluca (una de las regiones del país con mayor precipitación) cuyas faldas provocan escurrimiento pluvial que acarrea materiales pétreos, azolvan cauces del Río Lerma, encharcado e inundando casi 10 municipios de la Cuenca de Lerma. En adición, el 38.5% de la superficie de hectáreas se encuentran deforestadas, hecho que provoca desertificación del suelo, poca captación de agua para infiltración, entre otras repercusiones (CAEM, 2020).

De acuerdo con Bojórquez (2010) la composición del Río Lerma es compleja debido a las aguas residuales provenientes de las diferentes industrias que se encuentran en sus alrededores, de las cuales el 36.20% someten sus plantas a tratamiento de aguas residuales según datos del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (2009); entre ellas se encuentra la industria química, petroquímica, metalurgia entre otras industrias, de tal manera que el río Lerma funciona como un colector de aguas residuales de uso agrícola, municipal, industrial, etc.

La CARL, según Zarazúa (2013) debido al poco tratamiento de aguas residuales que recibe día con día, sus sedimentos (donde se han hallado mayores tasas de contaminación) se encuentran identificados como extremadamente tóxicos, ya que además de la capacidad de asimilación de desechos, la anoxia, y otras condiciones extremas, han alterado las cadenas tróficas, y fungiendo únicamente como un espacio donde solo aquellos organismos altamente resistentes puedan sobrevivir, tal es el caso de los nemátodos, sanguijuelas y el plancton. De esta manera, las condiciones en las que se encuentra el Río Lerma además de generar estas repercusiones también alteran la reproducción y el metabolismo de los microorganismos.

De acuerdo con los resultados obtenidos por Carreño y colab. (2017) el sitio comprendido desde Mezapa hasta Naucalpan, fue aquel donde se presentaron mayores tasas de Carbono Orgánico Total



(COT), Compuestos Orgánicos Persistentes (COP) y metales, como nitrobenzono, cobre, zinc, plomo, fenoles, entre otros. De hecho, el mismo estudio concluyó que debido a la alta concentración de demanda química, y bioquímica de oxígeno, es que los contaminantes y los metales se asocian para formar compuestos insolubles, y de esta manera depositarse en los sedimentos y elevar su toxicidad.

### **Ambiente extremo**

Oliart y colaboradores (2014) describen al ambiente extremo como aquel hábitat de los microorganismos extremófilos, este tipo de ambiente se caracteriza por ser “hostil” para permitir la supervivencia de los organismos, además de los microorganismos extremófilos que se mencionarán a continuación, cabe destacar que como resultado de las actividades antropogénicas, también se considera extremófilos a aquellos que se han adaptado a crecer en ambientes contaminados como aguas residuales industriales y suelos contaminados caracterizados por la presencia de sustancias tóxicas como pesticidas, metales pesados etc. Los microorganismos extremófilos se clasifican de acuerdo a la condición física o química extrema, como termófilos (temperatura óptima  $> 80^{\circ}\text{C}$ ), psicófilos ( $< 10^{\circ}\text{C}$ ), acidófilos ( $< 5^{\circ}\text{C}$ ), alcalófilos ( $> 8^{\circ}\text{C}$ ), halófilos (5 – 30% de sal), osmófilos (altas presiones osmóticas), radiófilos (altos niveles de radiación), metalófilos (altas concentraciones de metales pesados), piezófilos o barófilos (altas presiones hidrostáticas), hay microorganismos que suelen poseer dos o más características mencionadas anteriormente, y en general son ambientes donde las condiciones fisicoquímicas del ambiente son diferentes a los valores en los que la vida de muchos organismos es posible (Puopolo et al., 2021).

Los extremófilos poseen diversas funciones biológicas como sintetizar enzimas que permiten modificaciones bioquímicas que le permiten sobrevivir a temperaturas muy bajas o altas si su membrana celular contiene ácidos grasos, estas funciones adaptativas extremas como la ya mencionada (tolerancia a factores fisicoquímicos y biológicos) poseen gran potencial para el desarrollo sustentable de productos nuevos y/o servicios biotecnológicos con alto valor industrial, además, gran parte de los metabolitos producidos por extremófilos (extremolitos) han sido de gran ayuda para su aplicación en las ramas de la biotecnología, en la industria farmacéutica y en varios giros industriales; estos microorganismos también destacan en biometalurgia y biorremediación así como en degradación de biomasa para transformarla en recursos listos para ser reutilizados (Oliart-Ros et al., 2014; Capdevielle et al., 2010; Gallo et al., 2021).

Los microorganismos que habitan en condiciones ambientales con grandes concentraciones de sal y de materiales oleosos, aunado a temperaturas altas e hidrofobicidad, han actuado como presión selectiva en microorganismos productores de biosurfactantes, de esta manera los extremófilos han desarrollado diversas estrategias para proteger la célula ofreciéndole ventaja sobre su ambiente extremo (Khire, 2010).

### **Generalidades de los hidrocarburos**

Los hidrocarburos son sustancias orgánicas que provienen del petróleo crudo, cuya molécula está constituida por átomos de  $\text{H}_2$  y  $\text{C}_2$ , estos pueden estar en estado sólido, líquido y gaseoso, los cuales son en su mayoría derivados del petróleo, entre los que se encuentran el gas licuado a presión, gasolinas y naftas, kerosén, diésel, combustibles etc. (CONUEE, 2022), entre sus características químicas se destacan su alto peso molecular que varía desde los 16.04 hasta los 900 g/mol, además, el número de combinaciones (isómeros) que se pueden crear hacen que el número

de hidrocarburos sea infinito, de acuerdo con las bases de datos el número de hidrocarburos excede de 100 mil, de los cuales menos de 10 mil se han estudiado (Gómez et al., 2000).

Los hidrocarburos pueden identificarse de acuerdo al número de enlaces entre carbonos o de acuerdo a su estructura, ya sea alifática, cíclica o mixta, por ejemplo los hidrocarburos alifáticos saturados poseen una fórmula general  $C_nH_{2n+2}$  (metano, etano, propano, n-butano, entre otros), dentro de los alifáticos cabe destacar la presencia de las formas isoméricas como las isoparafinas, mientras que la fórmula para los no saturados es  $C_nH_{2n}$  (olefínicos o eilénicos), mismos que no se encuentran en el petróleo crudo, así mismo, los hidrocarburos cíclicos puede estar constituido generalmente de seis carbonos, es decir  $109^\circ$  de ángulo normal de unión, entre ellos se encuentran los hidrocarburos cíclicos saturados tal como el ciclopropano, ciclopentano, ciclohexano etc. y entre los no saturados se clasifican de acuerdo a cuántos dobles enlaces posean, por último, se encuentran los hidrocarburos mixtos que se caracterizan por ser moléculas híbridas donde se sustituyen los ciclos por las cadenas parafínicas, estas combinaciones enriquecen la diversidad entre moléculas, de hecho, estas moléculas constituyen las fracciones pesadas como el gasóleo, fueloil entre otros lubricantes (Secretaría de Energía, 2003).

## Diésel

### Propiedades físicas y químicas

También conocido como gasóleo pertenece a los hidrocarburos líquidos que se obtiene principalmente de la destilación fraccionada del petróleo a una temperatura entre los  $200$  y  $380^\circ C$  (CONUEE, 2022) entre sus características, de acuerdo a la hoja de seguridad de Refinería La Palmilla (2007) el diésel es una mezcla compleja de hidrocarburos del petróleo con un número de carbonos en su mayor parte dentro del intervalo de 9 a 20 incluso a 22  $C_2$  (Pitz, 2010), mientras que su punto de ebullición se presenta alrededor de los  $149^\circ C$ , pero se desconoce específicamente ya que la destilación se ve interrumpida a los  $385^\circ C$  según la Norma ASTM D-86 (Lorenzo, 2016).

Químicamente, el diésel es una mezcla compleja compuesta por el 75% de hidrocarburos alifáticos saturados (n-parafinas, isoparafinas y cicloparafinas) y 25% de hidrocarburos aromáticos como los naftalenos, algunos autores afirman que los compuestos aromáticos (Tabla 1.) pueden llegar a comprender el 35 % del peso promedio del petrodiesel.

Tabla 1. Compuestos aromáticos en el diésel (Tabla tomada de Flores, 2013)

Monoaromáticos	Diaromáticos	Triaromáticos	Tetraaromáticos	Aromáticos de azufre
Alquilbencenos	Naftalenos	Fenantrenos	Benzopirenos	Benztiofenos
Benzo Cicloalcanos	Nafto cicloalcanos	Fenantreno cicloalcanos	Benzofluorenos	Dibenzotiones
Benzodi cicloalcanos	Fluorenos		Crisenos	Benzonaftotiofenos

De acuerdo con la CONUEE (2022) existen tres tipos de diésel (A, B y C), el diésel A es el adecuado para vehículos ya que contiene aditivos para evitar la solidificación de la parafina a bajas temperaturas, posee elementos que reducen el consumo del mismo y la emisión de contaminantes; el diésel B es usado para maquinaria agrícola y pesquera, además, presenta menor proceso de

filtrado y contiene más parafina que el diésel A, por último, el diésel C se utiliza propiamente para calderas o equipos que generan calor debido a su alta concentración de parafinas y otras impurezas. El punto de inflamación mínimo tanto del diésel automotriz como el diésel agrícola es de 45° C y 60° C respectivamente, así mismo, el diésel no presenta polimerización, su densidad se encuentra entre los 0.87 – 0.95 g/ml, en adición, su combustión genera monóxido de carbono, CO<sub>2</sub> y otros gases asfíxiantes, irritantes y corrosivos (PEMEX, 2015).

### Diésel como contaminante

Según los reportes de Akhbarizadeh y colaboradores (2016), la exposición a hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) puede causar daño a diversos microorganismos y organismos superiores, puesto que las descargas de aguas residuales industriales, insumos de petróleo, entre otras fuentes de contaminación, resultan en daños citotóxicos, mutagénicos y cancerígenos. Si bien el petróleo es utilizado de forma vasta en las industrias (se calcula que el 40% petróleo es utilizado como principal fuente de energía), el diésel que es una fracción importante del petróleo, al ser derramado en aguas subterráneas y en cuerpos de agua, persiste por más tiempo y se extiende de inmediato como una película sobre la superficie, de esta manera, el agua contaminada con diésel es más tóxica que aquella contaminada con petróleo (Khalid et al, 2021).

Los derrames de diésel involuntarios u ocasionados por negligencia, impactan gravemente a todo ser vivo que habita en un ecosistema, en el agua por ejemplo, el diésel al formar la ya mencionada película gruesa en la superficie, bloquea la entrada de la luz solar y corta el suministro de oxígeno, generando así la muerte de miles de organismos, extinguiendo especies y reduciendo la población microbiana; muerte que se puede resumir en mecanismos de citotoxicidad estructural y/o celular, que resultan en apoptosis/necrosis. A pesar de la importancia del petróleo y sus derivados para las actividades humanas, la demanda de la remediación de estos contaminantes va en aumento, ya que su fuerte impacto negativo al medio ambiente y al alza en la polución biológica en agua y aire sugiere el desarrollo y la aplicación de energías más limpias, tecnologías efectivas y accesibles (Kayode et al, 2008; Morais et al, 2011; Khalid et al, 2021). Por lo anterior, la biorremediación funciona como una alternativa conveniente para restaurar el medio ambiente contaminado en conjunto por hidrocarburos aromáticos policíclicos, pesticidas piretroides, bisfenoles, entre otros hidrocarburos que, de acuerdo con informes recientes, el derrame de estos cada vez es más común, desde las 21.000 toneladas de diésel derramadas en los ríos del Ártico, hasta las incontables toneladas provenientes de todo el globo que llegan de principio como contaminación plástica pero que se degradan en los océanos a sus componentes originales (Kunal et al., 2021).

### Biorremediación

Una de las primeras definiciones de Biorremediación fue establecida por la American Academy of Microbiology en 1992, donde la definieron como aquel proceso que utiliza organismos vivos o su catálisis para mejorar la tasa de destrucción de contaminantes, por ello es considerada como un área de la tecnología de gestión de residuos peligrosos. La biorremediación es en esencia una recopilación de ciclos orgánicos que utilizan organismos nativos predominantemente bacterias y hongos, y en menor proporción algas, protozoos, plantas, ecosistemas controlados etc. que, en condiciones ideales disminuyen la cantidad, nocividad y centralización de contaminantes (Tabla 2.).

Tabla 2. Clasificación de estrategias de biorremediación según el organismo implicado. Tomado de (Muthukumaran, 2022).

Organismo biorremediador	Estrategia
Algas	Ficorremediación
Gérmenes	Remediación bacteriana
Biomoléculas derivadas de organismos	Biorremediación derivada
Hongos	Micorremediación
Microorganismos	Biorremediación o Microbiorremediación
Plantas	Fitorremediación
Rizosfera	Rizoremediación

Así mismo, la biorremediación puede utilizarse junto con otros métodos físicos y químicos, el objetivo de utilizarlos simultáneamente según Singh y colaboradores (2021) es crear una interacción sinérgica que permita la obtención eficiente de biodegradación, sin embargo, es de suma importancia que la operación sea sostenible a largo plazo, además la investigación y desarrollo del proceso debe ser abordado desde el punto de vista *rendimiento-potencial amenaza* tanto al ecosistema como a la salud humana. Por ello, dependiendo del costo, las características del sitio y la concentración de contaminantes, la biorremediación se puede llevar a cabo *ex situ* o *in situ*; puesto que, al conocer las características del sitio y la efectividad de la técnica combinada con otros enfoques (por ejemplo, la microbiorremediación asistida por plantas), se garantiza el éxito de la misma (Xiong et al, 2022).

En general, la biorremediación se puede clasificar *ex situ* e *in situ* en donde incorporan estrategias a grande y a pequeña escala respectivamente, con lo cual los costos, agravaciones al ambiente y otros efectos, se ven aumentados o disminuidos de acuerdo con la estrategia utilizada, así mismo, el mero acto de biodegradación está influenciado por los ejercicios microbianos y con ello, aceleran este efecto mediante bioestimulación y bioaumentación. La bioestimulación se mejora mediante la adición de aceptores de electrones, oxígeno etc. que permiten las mejoras del proceso metabólico de la microflora, mientras que la bioaumentación desarrolla el volumen de un degradador que añade sociedades microbianas probables que aceleran la expulsión de líquido en fase no acuosa (Muthukumaran, 2022).

De acuerdo con Litchfield (2005), los antecedentes muestran que el tratamiento de hidrocarburos están condenados a la biorremediación al ser menos costoso y más eficaz que otros tratamientos, el cual se centra en el proceso de biorremediación *in situ* (ISB) que aumenta la cantidad de bacterias que degradan el petróleo y sus derivados, e implica la adición de varios nutrientes tal como aceptores de electrones, fosfatos, nitratos y a menudo una fuente de nitrógeno, esta técnica es aplicable a suelos subterráneos, embalses, lagos, ríos y otros cuerpos de agua.

### ***Pseudomonas protegens* como bacteria biocontroladora**

Las bacterias *Pseudomonas protegens* forman parte de las *Pseudomonas fluorescentes* y son eubacterias que fueron aisladas por primera vez en las raíces de tabaco en Suiza, su morfología se caracteriza por ser bacilos Gram negativos no patógenos en forma de bastoncillos alargados rectos o ligeramente curvos. Son bacterias aerobias y saprofitas, no forman esporas y la temperatura más favorable para su desarrollo va de los 25 a 30° C, crecen en pH neutro y su crecimiento es nulo en

condiciones ácidas, se encuentran en el suelo y en ambientes acuáticos ya que poseen flagelos polares que le permiten su movimiento en líquidos así como su defensa ante los patógenos de las plantas, esta bacteria a diferencia de otras cepas fluorescentes posee un potencial catabólico reducido, lo que indica que *P. protegens* se ha especializado en exudados derivados de plantas (Henkels et al., 2014; Jousset et al., 2014; Ronnie et al., 2017; Yu et al., 2019; Clough, 2020).

### **Biosurfactantes**

Los compuestos biosurfactantes o tensoactivos son producidos por bacterias, hongos y levaduras, se caracterizan por ser compuestos de naturaleza anfipática, que les permite adsorberse en la interfase de medios determinados, es decir, proporcionan la capacidad de acumularse entre fases fluidas reduciendo la tensión superficial e interfacial en la superficie hasta 50 mN/m en agua, gracias a su naturaleza anfifílica los biosurfactantes se distribuyen entre las superficies inmiscibles aumentando la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos, además, sus capacidades robustas de resistir condiciones adversas tal como la temperatura, concentraciones de hasta 10% de sal, especificidad contra moléculas target, su estabilidad en un amplio espectro de pH, inducir nula toxicidad al ser biodegradables, y a su vez, la facilidad de sintetizarse a partir de fuentes de carbono relativamente baratas, hace de los biotensoactivos una mejor opción en comparación con sus contrapartes químicas aunado a sus propiedades de biocompatibilidad y digestibilidad (Kumar et al., 2021; Sansarode, 2018).

Las bacterias productoras de biosurfactantes se encuentran comúnmente en ambientes que incluyen suelo, cuerpos de agua y aguas residuales, sistemas hidropónicos, en tejidos humanos y superficies vegetales, mientras que en sus principales características están sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas, citotóxicas, inmunosupresoras e inhibidoras de la adhesión de patógenos, como agentes emulsionantes y dispersantes, estas propiedades le confieren un gran potencial en su aplicación medioambiental, en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética, sin embargo, su finalidad principal es la biorremediación de contaminantes orgánicos e inorgánicos (Kumar et al., 2021; Yanes, 2019), como consecuencia de su vasto uso, ha generado que la demanda de compuestos biosurfactantes aumente año con año para su uso en procesos e investigación, tal que en el 2016 el mercado mundial de biosurfactantes se valoró en 3998 millones de dólares y 460 mil toneladas, con un aumento en el 2022 de casi el doble en su costo (5520 millones de dólares) con una demanda de 560 mil toneladas (Satpute et al., 2018).

La función biológica de la mayoría de estos compuestos no se conoce por completo, lo que sí se sabe es que entre los roles biológicos propuestos durante los últimos treinta años según Twigg y colab. (2020), está el asimilar la asimilación de nutrientes poco solubles en agua, servir como reservorio de nutrientes, promover motilidad a los microorganismos, coadyuvar en el desarrollo de biopelículas, y actuar como factores antimicrobianos y de virulencia.

Se clasifican en surfactantes de alto y bajo peso molecular y son un diverso grupo de moléculas (Tabla 3.). De acuerdo con Raiger y López (2009) la efectividad de un biosurfactante puede establecerse con base en distintos parámetros relacionados a su capacidad de solubilizar compuestos hidrofóbicos y disminuir la tensión superficial; los monómeros tensoactivos se asocian espontáneamente en agregados estructurados como micelas, vesículas o bicapas que producen numerosas interacciones química débiles como puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Las estructuras que se forman son similares a los fluidos y se transforman de un estado a otro a

medida que cambian las condiciones como la temperatura, por lo tanto, la estructura del agregado depende de las condiciones en las que esté sometido y de la polaridad del disolvente, en una solución acuosa los grupos de cabeza polar de una micela se orientarán hacia la fase acuosa, y las colas hidrofóbicas se asociarán en el núcleo de la micela o/w, en cambio, en aceite la cabeza polar se asociará al centro de la micela y las colas hidrofóbicas al exterior de la micela w/o (Fracchia et al., 2012). Así mismo, se deben conocer los grupos funcionales correspondientes a cada biomolécula pues la especificidad y el mecanismo de acción que el biosurfactante ejerza radica en ello.

Tabla 3. Clasificación general de los biosurfactantes (López & Raiger, 2009).

ALTO PESO MOLECULAR (se unen fuertemente a las superficies)	BAJO PESO MOLECULAR (disminuyen la tensión superficial)
Polisacáridos	Lipopéptidos
Proteínas	Glicolípidos
Lipopolisacáridos	Fosfolípidos
Lipoproteínas	Ácidos grasos
Poliméricos	

### Caracterización de biosurfactantes

Existe mucha información sobre una gran cantidad de técnicas que permiten la caracterización de biotensoactivos, desde los tres principales cribados donde se evalúa el poder emulsificante de un tensoactivo hasta técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o el uso de MALDITOF. En el 2020, se realizó una investigación liderada por el Dr. Twigg y colaboradores, donde mencionan que muchas de las técnicas y los procesos en sí para la caracterización de biosurfactantes resultan imprecisas al carecer de pruebas sólidas y contar con procedimientos innecesarios, dicha investigación es aquella que en los últimos dos años ha propuesto la metodología de oro para dilucidar las características de una molécula biotensoactiva.

En la Figura 1. presenta una breve descripción de la metodología a llevar a cabo, donde los estudios publicados deben incluir la caracterización fenotípica de los rasgos indicativos de la producción de compuestos tensoactivos, en cual está compuesto por un cribado primario y secundario, donde resaltan las técnicas de colapso de la gota (DCM), la dispersión de aceite, el ensayo hemolítico, la prueba de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), el test de actividad emulsificante (E24) y la medición de tensión superficial. En orden descendente, dentro de un análisis químico robusto incluyen técnica de cromatografía en capa fina (TLC), espectroscopia infrarroja y cromatografía de alta resolución (FTIR y HPLC respectivamente), donde la utilización de estas técnicas provee una caracterización significativamente más concluyente (Twigg, 2020; Wuyang, 2018).

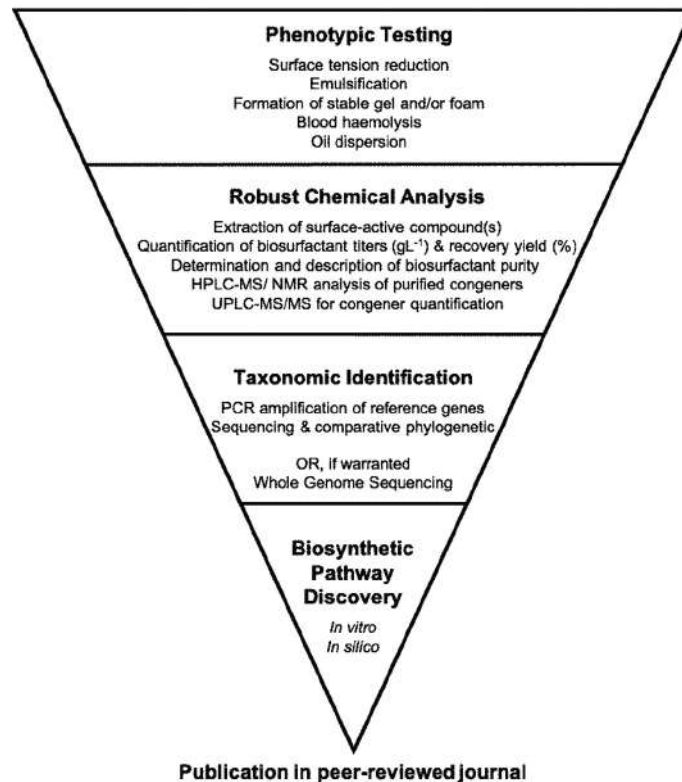


Figura 1. Metodología para investigar la producción de compuestos tensoactivos. Tomado de Twigg et al. 2020

Las técnicas de biología molecular para la clasificación taxonómica de los microorganismos productores de biosurfactantes son las más precisas ya que incorporan elementos de genomas microbianos que consecutivamente poseen dominios con secuencia conservada y variable, mismos que se denominan como secuencias de referencia, en las bacterias por ejemplo, es el gen que codifica la subunidad 16S del RNA ribosómico (RNAr 16S), DNA girasa B (*gyrB*) y el gen que codifica al factor sigma de la RNA polimerasa RpoD (*rpoD*) (Langille et al., 2013). Una vez que se extrae el DNA, se amplifica mediante PCR utilizando primers universales, luego los amplicones resultantes se secuencian y comparan en bases de datos con búsqueda de alineación local (BLAST).

Por último, si la cepa microbiana de interés a la fecha no cuenta con reportes que proporcionen información acerca de su tentativa producción de biosurfactantes, se deben efectuar las técnicas que evidencian la vía biosintética/enzimática de la producción de biotensoactivos.

### **Biosurfactantes producidos por *Pseudomonas Protegenes***

La mayoría de las cepas de biocontrol producidas por *Pseudomonas* son compuestos CLP; caracterizados por ser compuestos anfífilos donde un anillo de lactona oligopéptido cíclico está unido a una cola de ácido graso, que son sintetizados por péptidos sintasas no ribosómicos (NRPS) que normalmente codifican diferentes módulos para cargar, seleccionar y sintetizar aminoácidos que luego son liberados por dominios de tiolación. El papel principal de los CLP es la formación de poros de membrana, lo que conduce a un desequilibrio en flujos de iones transmembrana y muerte celular (Clough, 2020; Zongwang et al., 2016).

Las *Pseudomonas* son gammaproteobacterias, generan productos naturales biológicamente activos, los CLP más comunes por *Pseudomonas* son: Viscosina, Orfamida A, Anikasina, que contienen 8 a 25 aminoácidos, de los cuales 4 a 10 residuos forman un macrocilo, dichos metabolitos se dividen actualmente en ocho grupos estructurales diferentes que difieren en longitud, en la composición del oligopéptido y la cola de ácidos grasos (Yeong, 2013) todos cuentan con un extremo acoplado a un lípido, tal como se muestra en la Fig 2., esto les confiere diversas propiedades como antibiosis contra bacterias, hongos, protozoos y líneas tumorales humanas, y son candidatos potenciales farmacéuticos o para el biocontrol de patógenos (Bando et al., 2022).

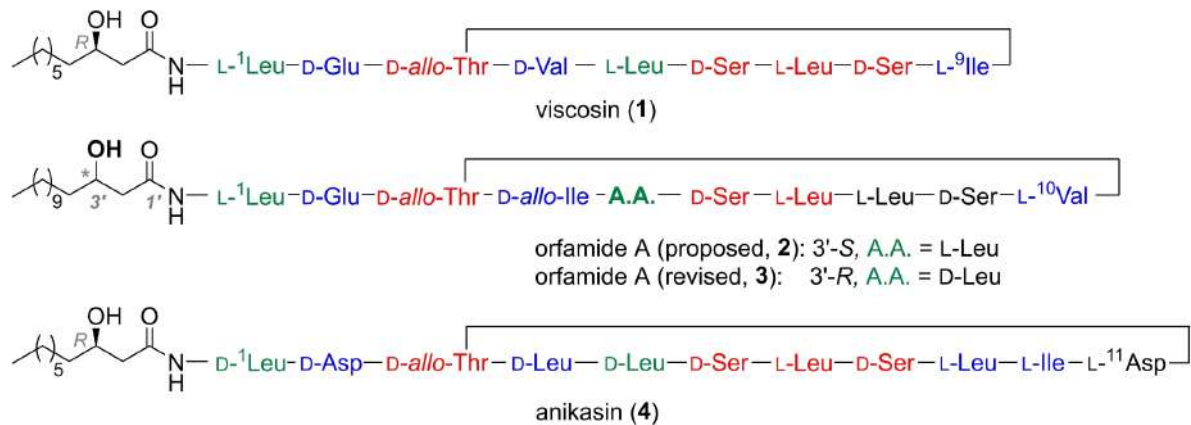


Figura 2. CLP más comunes por *Pseudomonas*. Los residuos de aminoácidos están codificados por colores para indicar residuos conservados (rojo), similares (azul) o estereoisoméricos (verde). Imagen tomada de Bando 2022.

Las orfamidas son un tipo de CLP producido por algunas *Pseudomonas*, son importantes en la motilidad de la superficie bacteriana, adherencia a superficies y por antagonismo con otros microorganismos, además de las propiedades insecticidas y fungicidas que posee, la producción de este metabolito mejora el movimiento bacteriano reduciendo la tensión superficial y el crecimiento en las superficies de las semillas.

La orfamida A (Figura 3.) es producida por *Pseudomonas protegens* pf-5 y por *P. protegens* CHA0, su peso molecular es de 1295.7 g/mol, su nombre formal es N-(3-hydroxy-1-oxotetradecyl)-L-leucyl-D- $\alpha$ -glutamyl-D-allothreonyl-D-alloisoleucyl-L-leucyl-D-seryl-L-leucyl-L-leucyl-D-seryl-L-valine, (10 $\rightarrow$ 3)-lactone, organolépticamente no presenta olor pero sí un color verde amarillento, este biosurfactante es propio de *P. protegens*, es fácilmente soluble en etanol, metanol, DMSO, DMF y soluble pobremente en agua (Cayman, 2021) y se ha caracterizado como insecticida, antifúngico, e inmovilizador de varias algas flageladas. La orfamida A está conformada por diez aminoácidos y un ácido  $\beta$ -hidroxidecanoico ( $\beta$ -HTDA), El grupo 3'-OH tiene una configuración S, en contraste con otros beta hidroxiaácidos que se encuentran en otros CLP de *Pseudomonas* que tienen configuración R (Bando et al., 2022). Hasta la fecha no se ha informado de una síntesis total de Orfamida A, excepto por una reivindicación de patente.



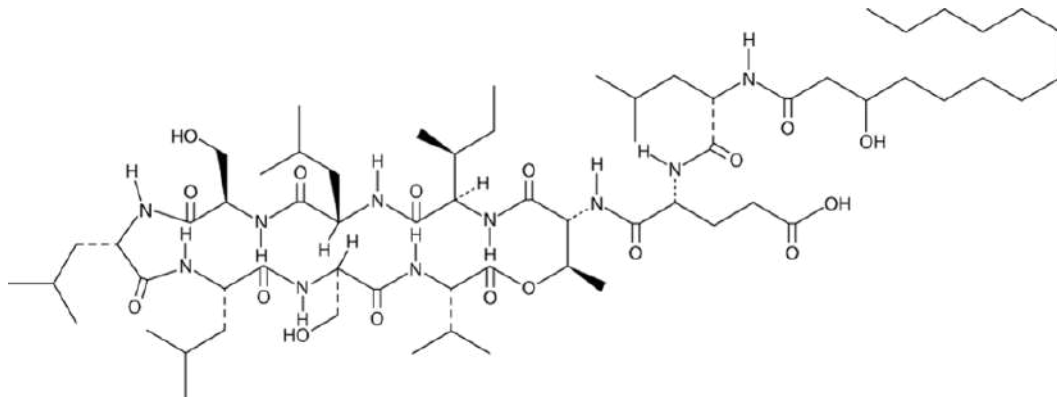


Figura 3. Estructura química del biosurfactante Orfamida A. Imagen tomada de Cayman 2021.

### Biodegradación del diésel

Owsianak y colaboradores (2008) demostraron que los hidrocarburos como el diésel, y los ésteres metílicos de ácidos grasos de biodiésel se degradan rápidamente en sistemas acuosos, señalando que se deben considerar diferentes vías metabólicas para los hidrocarburos aromáticos y ésteres metílicos basados en la existencia de enzimas que actúan sobre el diésel como sustrato. Dichos autores señalan que los perfiles de biomasa están estrechamente correlacionados, al haber una relación casi lineal entre el contenido de diésel y la producción de biomasa, subrayando que los biosurfactantes producidos por microorganismos especializados que utilizaron para la degradación de hidrocarburos, tuvieron una clara tendencia a metabolizar el diésel derivado del petróleo en contraposición con su homólogo el biodiésel.

La biodegradación de hidrocarburos ocurre generalmente bajo condiciones aeróbicas y como resultado de la catálisis intracelular que involucra generalmente cuatro pasos: absorción del hidrocarburo y secreción de tensoactivos para facilitar la emulsificación, adsorción en la superficie de la membrana celular, entrada a la membrana celular por endocitosis por transporte activo o pasivo y por último, la cadena de reacción enzimática para metabolizar los hidrocarburos (Diagrama. 1). Los PAHs generalmente experimentan oxidación terminal o subterminal mediada por diversos de alcano hidroxilasa, incluidas las metanomonooxigenasas, alcano hidroxilasas de hierro no hemo de membrana integral y alcano hidroxilasas de tipo citocromo P450 (Farah et al., 2021).

Bhuvaneswar y colaboradores en 2012, identificaron que la combinación específica de microorganismos, denominados consorcio normalmente tenían los mejores rendimientos en la degradación de hidrocarburos, aún con esto, la cepa *Pseudomonas* lograba tiempos cortos en comparación con otras cepas como *Staphylococcus* cuando era cultivada en medio mínimo y con diésel como única fuente de carbono.

El diésel contiene una gran cantidad de alcanos carentes de oxígeno, carencia que es cubierta por la producción de enzimas que reconocen estas moléculas, y que son fácilmente degradados día con día, seguido de los alcanos ramificados, n-alquilosaromáticos, ciclo alcanos y aromáticos polinucleares (Shamiyan, 2015)

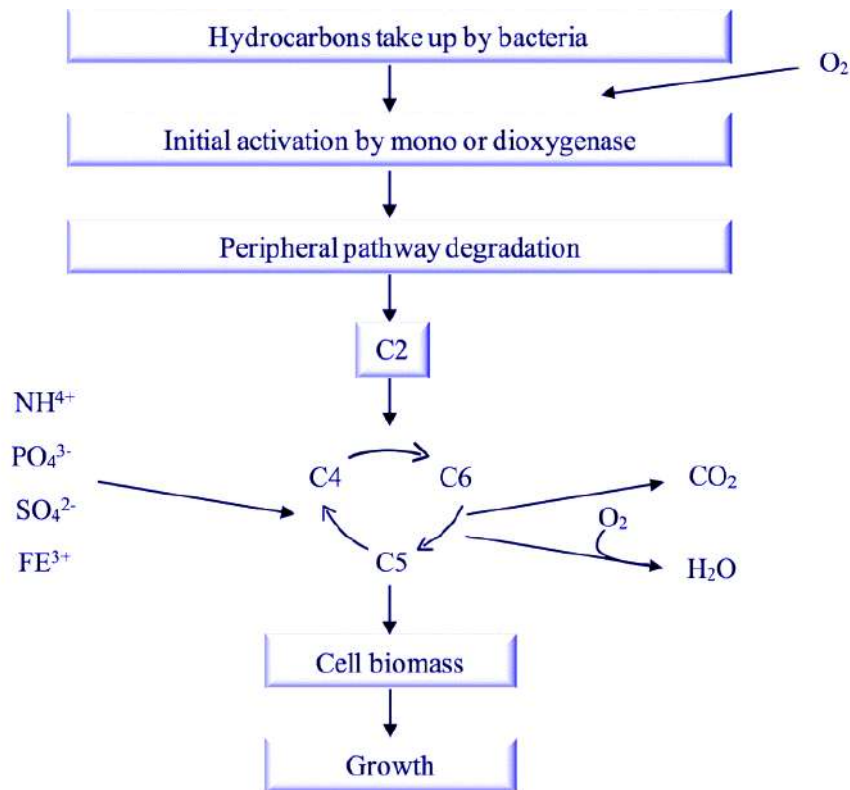


Diagrama 1. Los hidrocarburos atacan intracelularmente a través de la oxidación, activación e incorporación de oxígeno, a través de la hidroxilación de un anillo aromático del sustrato mediante la acción de la dioxigenasa, los metabolitos pueden ser escindidos por dioxigenasas del anillo. Por lo tanto, se producen intermediarios tal como el ácido salicílico y el catecol. Al finalizar el metabolismo aeróbico de los hidrocarburos, también se forma biomasa, oxígeno, y dióxido de carbono (Farah et al., 2021). Imagen tomada de Bioremediation of diesel contaminated marine water by bacteria: a review and bibliometric analysis (2021).

### **OBJETIVO PRINCIPAL**

Estudiar las propiedades fisicoquímicas y biológicas del metabolito con capacidad surfactante procedente de la bacteria *Pseudomonas protegens* aislada a partir de un consorcio bacteriano obtenido de muestras del Rio Lerma, Estado de México.

### **Objetivos específicos:**

- Aislar y purificar el biosurfactante efectuando las técnicas de separación más convenientes.
- Identificar la naturaleza del biosurfactante a través de sus propiedades fisicoquímicas.
- Determinar las condiciones de cultivo más favorables para generar la mayor cantidad de biosurfactante.

## METODOLOGÍA

Se llevará a cabo la investigación bibliográfica y experimental en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Ambiental de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Lerma (Diagrama 1.), mientras que la información bibliográfica se revisará en las principales bases de datos científicas (ScienceDirect, SprigerLink, DrugBank, Redalyc, Scielo, NCBI, etc.) durante un periodo comprendido de seis meses, en donde se evaluará la naturaleza y propiedades del biosurfactante derivado de la bacteria *Pseudomonas protegens*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Identificación de la bacteria

Se recuperaron los ribotipos 11, 12, 22 y 91 que cumplieron con las características morfológicas reportadas anteriormente como *Pseudomonas protegens* y se cultivaron en tubos con 20 microL de medio LB y se sembraron con 10 µL de muestra ultracongelada de glicerol, se dejaron crecer durante 24 h, a 36°C, a 200 rpm.

Una vez que los tubos presentaron suficiente turbidez, se identificaron mediante tinción de Gram, con el método clásico de tinción; 1 min con cristal violeta, 1min con lugol, 15 segundos aclarando con alcohol-acetona y 30 segundos con safranina.

Todos los ribotipos se sembraron posteriormente en placas de agar LB por la técnica de estría junto con dos controles negativos, a 36°C durante 48 h. Luego del descarté de los ribotipos 1-1 y 1-2, se procedió a guardar cinco gliceroles del ribotipo 2-2 y 9-1, con 200 µL de cultivo y 800 µL de glicerol estéril.

### Aislamiento y purificación del DNA bacteriano

Se siguió el procedimiento de obtención de DNA del Kit de extracción Wizard, y el DNA extraído se dejó durante toda la noche en refrigeración. Posteriormente se amplificaron ambas muestras de DNA (2-2 y 9-1) por PCR, donde se realizó un stock donde se utilizaron 112.5 µL de máster mix, 9 µL de cada uno de los primers universales 1492R y 27F, 9 µL del DNA molde y 85.5 µL de agua miliQ estéril.

Se realizó una mezcla 1:1 del DNA extraído y se pipeteó para homogeneizar perfectamente y se diluyeron 2 µL de DNA en 18 µL de agua miliQ, lo anterior se tomó como stock de dilución y de este tubo se tomaron 1, 2 y 3 µL y se agregaron a los tubos para iniciar la amplificación por PCR.

Una vez que la amplificación del DNA finalizó, se comprobó su extracción por medio de electroforesis, se utilizó gel de agarosa 1%, TAE 1X, buffer de carga en relación con la muestra 2:3, y se realizó la corrida 110V durante 35 min, se monitoreó la migración de los colores. Las muestras se añadieron al gel de la siguiente manera: Marcador lambda, Control -, DNA 1:10, DNA 1 µL, DNA 2 µL, controles positivos. Luego de la electroforesis, los geles se re. Después, los geles se tiñeron durante 45 min en Hydragreen y revelados en un transluminador UV con un filtro estándar.

Posteriormente, se llevó a cabo la purificación de las cinco muestras de DNA amplificado por Wizard SV Gel, se purificaron 5 muestras con un contenido de 22 µL, se llevaron a refrigeración durante unos minutos y nuevamente se comprobó su purificación mediante electroforesis con los mismos reactivos, esta vez con un marcador KB, las muestras extraídas y un control positivo, la corrida fue de 45 min a 110V. Cabe destacar que durante la realización de todas las técnicas cada cámara de electroforesis fue lavada con alcohol al 70% para evitar posible contaminación.

Realizadas las técnicas de obtención de DNA puro, las muestras se guardaron a  $-26.6^{\circ}\text{C}$ .

### Identificación y secuenciación genética

Las muestras de DNA purificado se enviaron a Corea del Sur para obtener la secuenciación de la subunidad 16S del RNA ribosómico para posteriormente compararlo en el apartado BLAST de NCBI.

### Esterilización del diésel y preparación del medio mínimo salino (MMS)

Se realizó un preinóculo de 50 mL durante 24 horas, luego se inoculó con 200  $\mu\text{L}$  de este preinóculo a un matraz overnight de 300  $\mu\text{L}$ , ambos se inocularon a  $25^{\circ}\text{C}$ , con 200 rpm.

Mientras la bacteria crecía, se determinó la densidad del diésel, el método consistió en tarar un vaso de precipitado donde se colocó 1 ml de diésel. El vial con diésel se colocó en la estufa  $25^{\circ}\text{C}$ , y se registró su peso (diésel-vial) cada 30 min hasta completar 6 mediciones.

Para desechar cualquier contaminación en el diésel se realizaron frotis con la técnica de tinción de Gram, y se sembró diésel en placas de agar LB que se mantuvieron durante 48 h, a  $25^{\circ}\text{C}$ . Por lo tanto, se realizaron técnicas para esterilizar 200 mL de diésel por luz UV durante 30 min, y mediante filtración de membrana (0.22  $\mu\text{m}$ ) a través de un kit de filtración que funciona como trampa de vacío. Para verificar la esterilización del diésel se realizaron ocho placas de agar LB donde se sembraron 2 controles sin microorganismos, 2 placas con diésel puesto bajo luz UV, 2 placas esterilizadas por membrana y 2 placas con diésel sin esterilizar. En caso de que creciera algún microorganismo, se guardaron gliceroles de lo que se halló en ultracongelación.

Se realizó un testeo de la campana de extracción para descartar posible contaminación cruzada, colocando 6 placas de agar LB en la superficie de contacto, durante 40 min, después se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

Para la preparación del medio mínimo salino (MMS) se consultó la bibliografía y se optó por un medio de 9 elementos:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ . Donde los primeros 5 elementos fueron esterilizados por autoclave y los últimos 4 fueron esterilizados por filtro de membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  para evitar su precipitación por calor.

### Cinética del crecimiento bacteriano y de la producción de biosurfactante

La cinética de crecimiento se determinó mediante medición indirecta por turbidimetría con un espectrofotómetro Thermo scientific, durante 295 h, así mismo, la cinética de producción de biosurfactante se determinó al mismo tiempo midiendo sus propiedades de emulsión (E24) y actividades superficiales cada 24 h.

Una vez que el cultivo overnight llegó a una  $\text{DO}_{600\text{ nm}}$  de 1.2804, de acuerdo con la fórmula de diluciones  $V_1C_1=V_2C_2$ , se agregaron 15.62 mL del cultivo overnight a los cultivos que servirían como cinética de crecimiento, para ello, se utilizaron 9 matraces con 100 ml de medio (MMS y diésel); triplicados de medios control sin bacteria con diésel 5% (C s/b c/d), triplicado de medios inoculados con la bacteria y 5% de diésel (5% c/b c/d) y triplicado de matraces inoculados con bacteria y 10% de diésel (10% c/b s/d).

Para obtener la biomasa de los 15.62 mL, se agregó 1 mL de cultivo overnight en 8 tubos *eppendorf* de 1.5mL, se centrifugaron durante 5 min a 16000 g, una vez formado el pellet se agregó nuevamente 1 mL a los 8 tubos y se centrifugó nuevamente con las mismas condiciones, de esta

manera se realizaron tomas del cultivo hasta obtener el pellet correspondiente a 15.62 mL de cultivo overnight, al final con 1 mL de MMS sin diésel se efectuó un lavado del pellet, y se descartó el sobrenadante, de esta manera se procedió a inocular 8 de los 10 matraces (Tabla X.), resuspendiendo perfectamente el pellet con MMS sin diésel.

#### **Monitoreo de la cinética de crecimiento y producción de biosurfactante.**

La cinética de crecimiento se llevó a cabo midiendo la turbidez del medio mediante DO600 nm (Diagrama 2.) a través del tiempo, se tomaron de cada uno de los matraces 5 mL de medio en tubos falcón, 2 ml se tomaron para medir su crecimiento y la absorbancia que generen se dividirá entre dos para tener una medida equivalente a 1 mL, y los otros 2 mL se conservarán para efectuar la prueba de E24, los tubos se centrifugaron durante 10 min a 16000 rfc, se guardó el sobrenadante para su posterior extracción líquido líquido, y el pellet se resuspendió con 1 ml de MMS hasta su homogeneización por inversión, el pellet ya resuspendido se pasó a celdas de cuarzo de 1 mL y se midió la absorbancia de las muestras utilizando MMS como blanco, las celdas fueron enjuagadas con acetona y aclaradas con agua destilada.

La prueba de actividad emulsificadora (E24) se realizó con tubos de 10 mL, el experimento consistió tubos control (agua más diésel) y tubos donde se vertieron 2 mL de sobrenadante libre de células de cada uno de los matraces de la cinética y 2 mL de diésel, es decir 12 tubos en total. Primero se colocaron los 2 mL de sobrenadante o en su caso de agua destilada y posteriormente 2 mL de diésel, se agitaron en vortex durante 30 segundos, luego fueron colocados verticalmente y puestos bajo temperatura ambiente durante 24 horas para posteriormente calcular su E24.

$$E24 = (\text{Altura de la capa de emulsificación} / \text{altura total de la mezcla}) \times 100$$

Se cuidó de no mover los tubos de su posición original.

Para la realización del cribado primario se realizó la prueba del colapso de la gota. Se colocó un papel parafilm de 5x5 cm sobre un portaobjetos, donde colocaron gotas de 2  $\mu$ L de cada uno de los siguientes reactivos: agua destilada, tensoactivo Tritón, muestras de cultivo al 5% y 10%, así como de los controles.

También se llevó a cabo la prueba del esparcimiento del diésel, donde se vertieron aprox. 20 mL de agua destilada en una caja Petri y luego se esparcieron otros 20 mL de diésel sobre la superficie del agua, posteriormente se agregaron gentilmente 10 mL de sobrenadante en el centro de la superficie de la capa de aceite, se midió el diámetro del área de esparcimiento de aceite. Se realizó un control sin sobrenadante y se compararon ambos resultados.

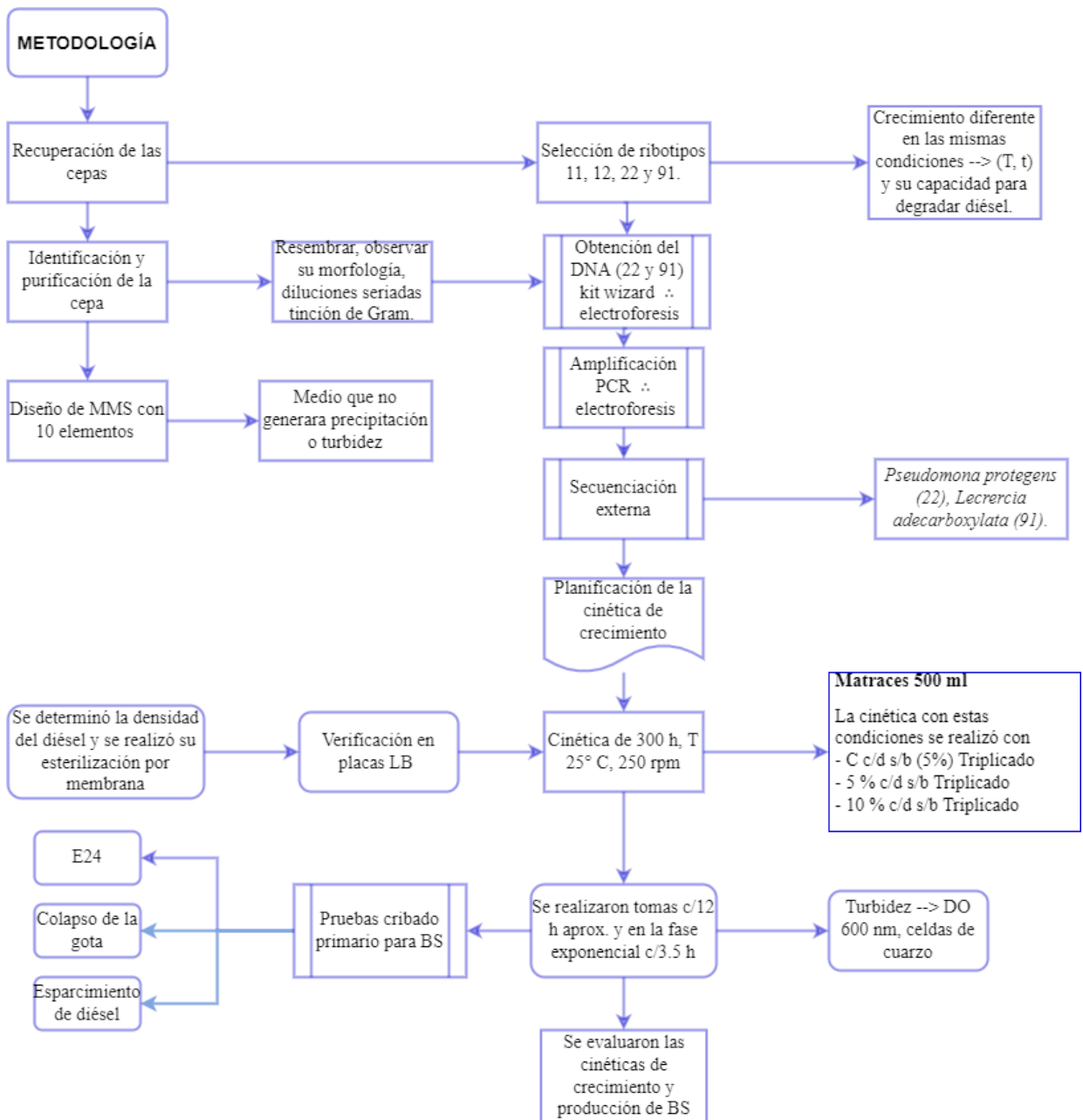


Diagrama 2. Diagrama de flujo de la primera parte de la metodología.

### Extracción líquido/líquido del biosurfactante

Se eligieron dos muestras/alícuotas previamente guardadas en refrigeración donde se observó mayor porcentaje de emulsificación de cada grupo de matraces, se tomaron 2 muestras de 1 mL de controles, 3 muestras de 1 mL de los cultivos de 5 y 10%. Se cuidó que el sobrenadante estuviera libre de células.

De esta manera las alícuotas del sobrenadante fueron guardadas a  $-6^{\circ}\text{C}$ , y al finalizar la cinética se descongelaron y centrifugaron a 16000 g durante 15 min, la capa superior que aún contenía diésel y

biomasa fue aspirada por pipeteo y guardada en un tubo *falcon* de 15 ml, y luego fue acidificado añadiendo 1.2 ml de HCl 1N para ajustar el pH a 2.0, y se dejó toda la noche a 4° C, después el sobrenadante que presentaba precipitación fue centrifugado a 16000 g por 20 min hasta obtener un pellet; mismo que serviría como biosurfactante en bruto, fue extraído usando cloroformo-metanol (2:1, v/v), la fase acuosa fue extraída con 3 lavados (1 ml, 750 microL y 500 microL) para colectar la fase orgánica, después se evaporó el cloroformo-metanol en la campana durante una noche y luego se evaporó por completo con ayuda de un SpeedVac, se realizaron tres ciclos de evaporación a 65°C durante 30 min, se guardó el metabolito con propiedades tensoactivas en refrigeración (Diagrama 3.)

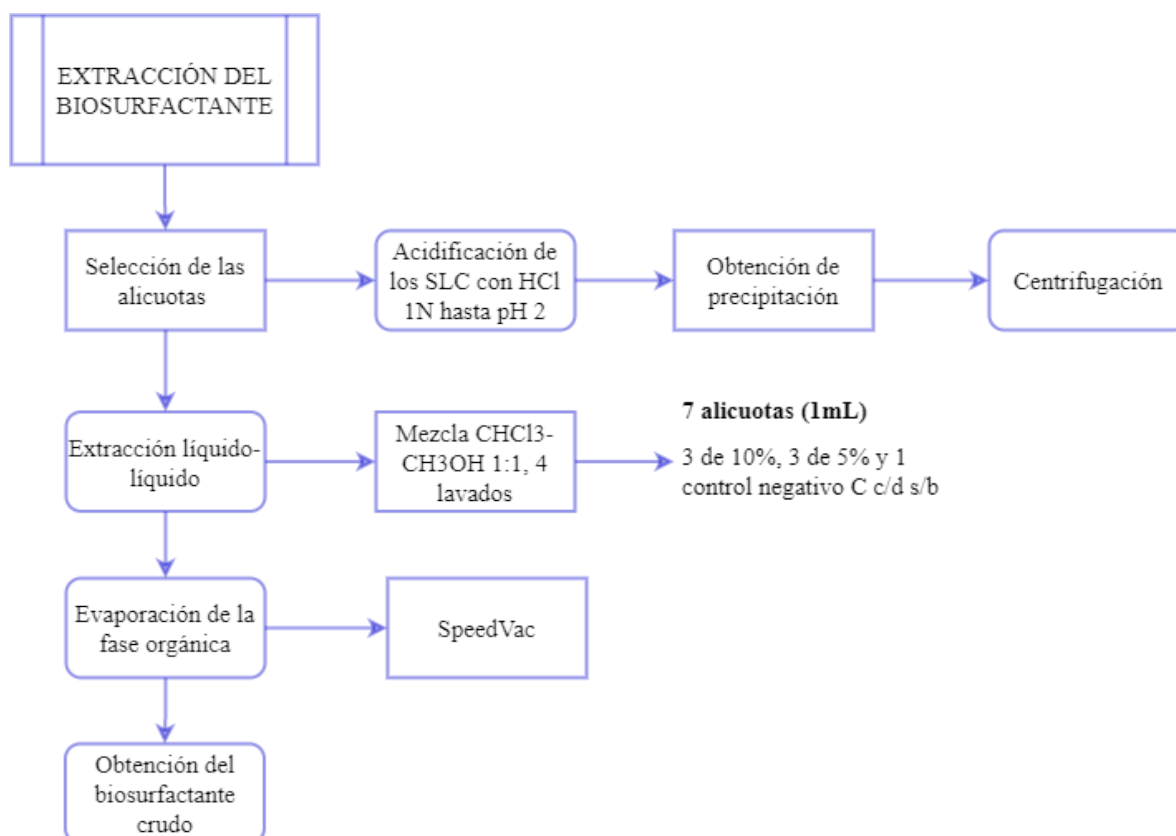


Diagrama 3. Metodología en la extracción del biosurfactante.

#### Detección del biosurfactante

La detección de las muestras de biosurfactante crudo se realizó en cromatografía en capa fina (TLC) donde la fase estacionaria era sílica, el tamaño de las placas fue de 10 x 5 cm. Se prepararon las muestras de biosurfactante bruto diluyéndolas con 500 µL de metanol y se cargaron 10 µL en la placa, así mismo se colocaron 10 µL de metanol como control negativo y 8 µL de 10 µg de glicina disuelta en 500 µL de metanol como control positivo.

Se colocó un papel filtro de la altura de la cámara cromatográfica y de un ancho de 5 cm, como fase móvil se utilizó una mezcla de solventes (cloroformo:metanol) y los solventes individuales. Luego de la elución, las placas se dejaron secar al aire y se revelaron por luz UV, tal como lo muestra el Diagrama 4.



Las placas posteriormente se tiñeron con Vainillina y luego fueron reveladas con calor en una parrilla, inmediatamente que se secaban las placas de la tinción se revelaron con calor a 40°C durante 10 min, luego a 70 °C por 10 min y a 100°C durante 5 min más. Se siguió este procedimiento de calentamiento ya que la formulación de vainillina era de 250 microgramos de vainillina, 50 mL de etanol y 5 mL de ácido sulfúrico. Por las propiedades irritantes del ácido, se manejó con cautela y el líquido de tinción se mantuvo aislado de la luz y en refrigeración.

Posteriormente se calculó su Rf.

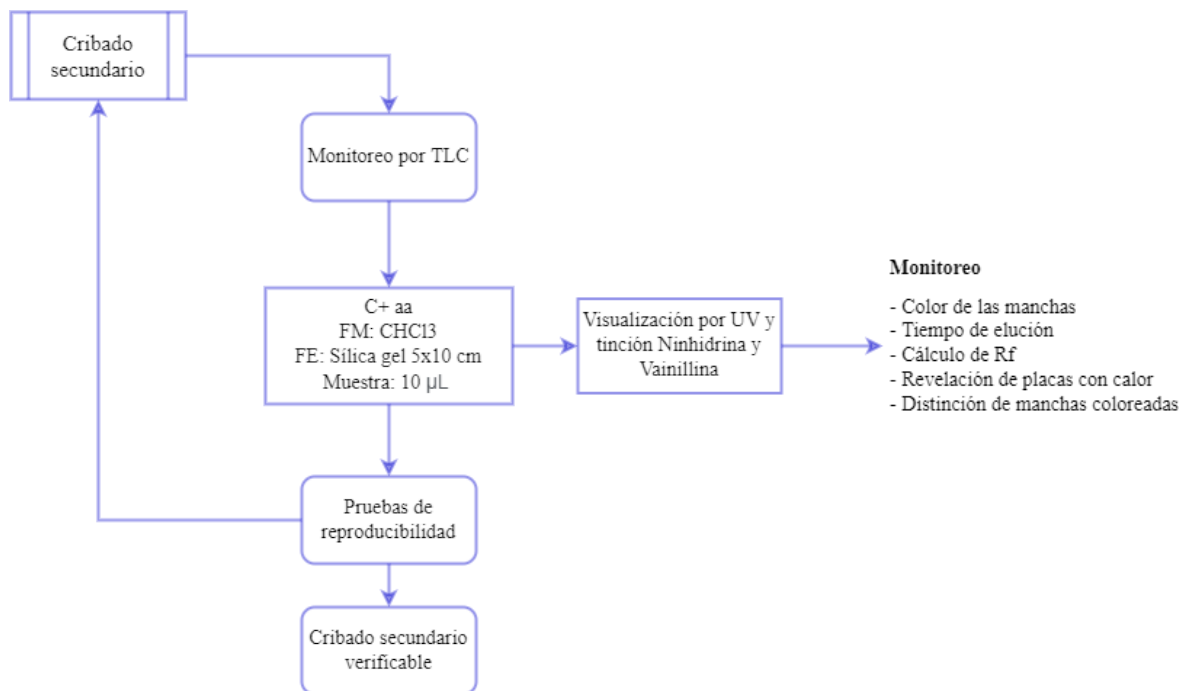


Diagrama 4. Metodología en la extracción del cribado secundario.

#### Purificación del biosurfactante

Una vez elegidas las muestras, se realizó la técnica de cromatografía preparativa, utilizando placas de 10 x 5 cm, para la fase móvil se utilizó cloroformo y para garantizar la producción de vapores en la cámara, se colocó nuevamente una tira de papel filtro. Para realizar el depósito de muestra, se marcó con lápiz una línea divisoria en la placa, midiendo 1 cm de ancho a la izquierda, tal como se muestra en la tabla 5. de los resultados. Con el fin de que esa línea divisoria funcione como un eje para posteriormente cortar la placa. Se cargaron 10 µL en la parte izquierda de la placa, y del lado derecho se colocaron 90 µL de muestra distribuidos en 9 puntos uno junto del otro. De esta manera se eluyeron las muestras a lo largo de la placa, luego de la corrida de las placas, se dejaron secar para verlas bajo luz UV. Se marcaron las bandas con lápiz muy gentilmente.

Se cortó la parte izquierda de cada placa cuando se percibían perfectamente secas, luego, la parte cortada de la placa de un ancho de 1 cm y 10 cm de largo fue teñida con Vainillina y revelada con calor con la misma metodología antes descrita. Más adelante esta parte de la placa teñida serviría como medio para comparar la posición de las manchas en la placa que no se sometió a tinción. Se marcaron las bandas reveladas y se observó si coincidían con las reveladas bajo luz UV, posterior a eso, se calcularon las Rf.

Una vez realizado el procedimiento anterior (Diagrama 5.), se rasparon las bandas que fueron marcadas en UV y señaladas por comparación con la placa teñidas, con ayuda de una espátula pequeña se fue desprendiendo la sílica de la placa de aluminio que la sostenía, se guardó en tubos eppendorf y se rotularon de acuerdo con la posición de la banda en la placa, con base en la altura de elución de cada banda en orden descendente, por ejemplo: Muestra 1-1, Muestra 1-2 etc.

Consecutivamente, se extrajo la sílica por medio de centrifugación; a los tubos con sílica se les añadió 500  $\mu\text{L}$  de metanol cloroformo 1:1, y se centrifugaron dos veces durante 15 min a 16000 rfc, descartando la sílica que había formado un pellet, luego, se dejaron durante 3 horas en la campana de extracción y posteriormente se evaporaron en el equipo de SpeedVac a 65°C durante 20 min. Se comprobó la evaporación de los solventes y se guardaron los biosurfactantes puros agregándoles 500  $\mu\text{L}$  de metanol para posteriormente comprobar su pureza por medio de una cromatografía en capa fina, utilizando las mismas condiciones de elución, a diferencia de que esta vez se utilizó la muestra sin purificar o bien, el biosurfactante en bruto para comparar la calidad de purificación.

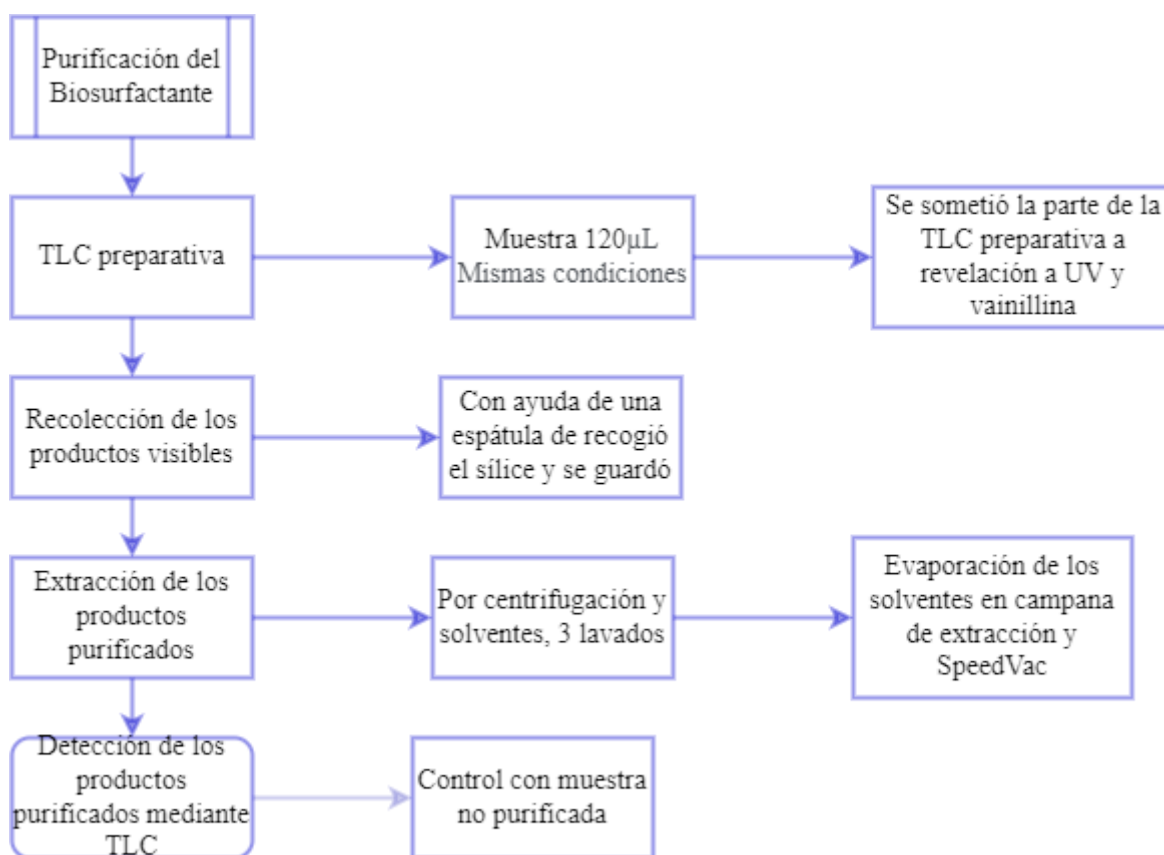


Diagrama 5. Proceso para la purificación del biosurfactante bruto.

#### Identificación del biosurfactante

Para la identificación del biotensoactivo, se realizó un análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y espectroscopia infrarroja (Diagrama 6.).

Las fracciones recogidas de biosurfactante puro fueron filtradas por filtros de 0.22 micras, y puestos en viales para HPLC, y se inyectaron en un modelo HPLC agilent equipado con un detector de

arreglo de diodos y de UV-Vis, a 210, 254, 270 y 380 nm. La columna era una Kromasil 100-5-C18, de 4.6 mm x 250 mm. La fase móvil consistió en metanol acuoso (60% v/v) y un caudal de 1 ml/min. La presión (Bar) fue monitoreada a lo largo de cada corrida y los picos fueron almacenados para su posterior análisis.

Se tomaron 30 microL de los viales M1-1, M1-2, M2-1, M2-2, M4-1, M4-2, M6-2 y M6-4 para ser analizados por IR, se realizó la identificación de los compuestos en un FTIR Agilent 630-IR. Los espectros fueron almacenados para el análisis de sus bandas.

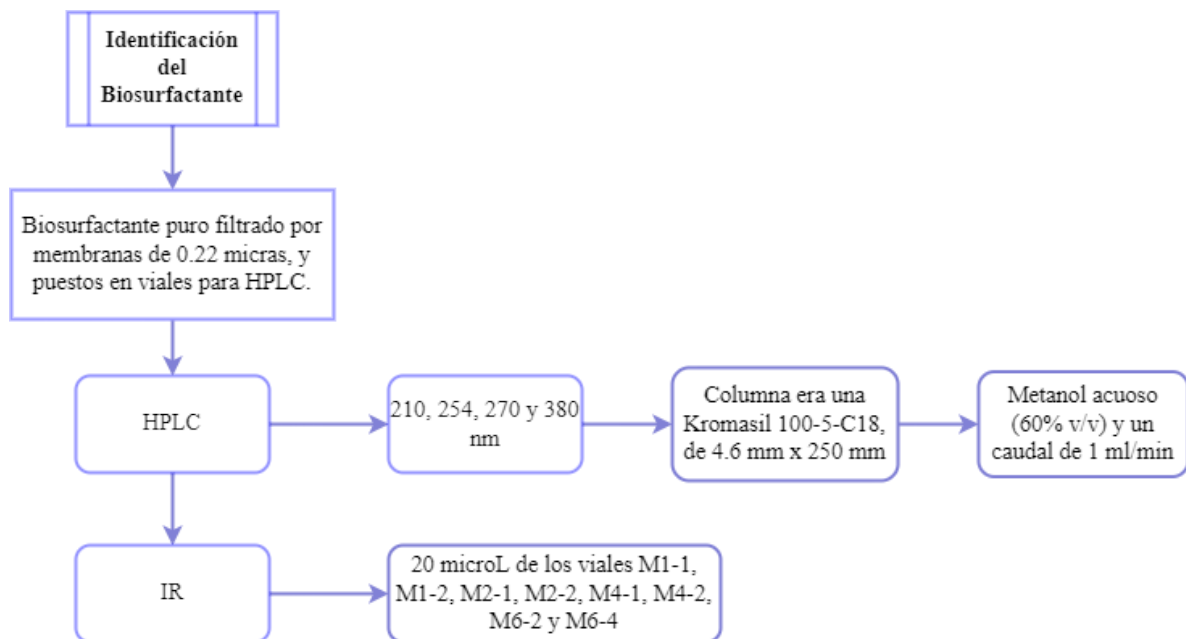






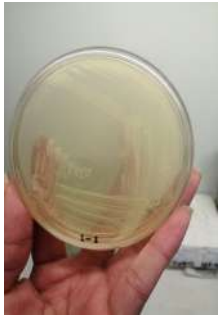



Diagrama 6. Identificación del biosurfactante por HPLC e IR.

## Resultados

### Identificación genética.

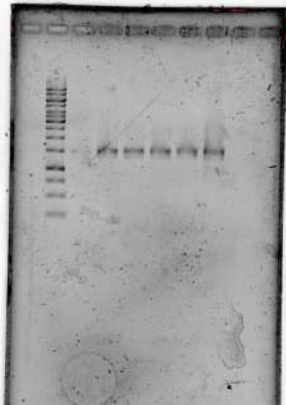

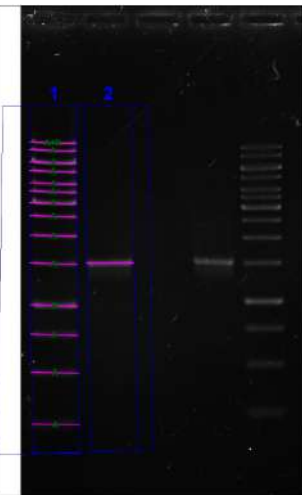
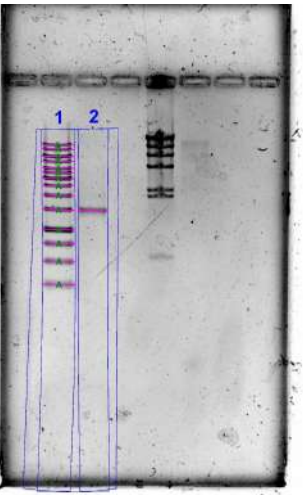
De acuerdo con los resultados de la identificación Morfológica (Tabla 4.) se descartó el uso de los ribotipos 1-1 y 1-2 y se continuó trabajando con los ribotipos 9-1 y 2-2 que poseían características propias de *Pseudomonas protegens*.

Tabla 4. Identificación morfológica de los cuatro ribotipos que se identificaron.

Identificación Morfológica				
	1-1	1-2	9-1	2-2
Tinción de Gram	Bacilos G+ y G- 	Cocos G+ y Bacilos G- 	Bacilos G- 	Bacilos G- 
Frotis	Bacilos cortos	Cocos pequeños y Bacilos pequeños.	Bacilos largos, curvos.	Bacilos largos y no curvos.
Morfología	Blancas Lechosas Irregulares 	Blancas Transparente lechosas Irregulares y grandes 	Blancas Lechosas Circulares 	Blancas Transparente lechosas Circulares 
Condiciones de crecimiento identificadas	Crecen rápido de 20-25°C. Presentan crecimiento lento por encima de los 30°C.	Crecen rápido de 20-25°C. Presentan crecimiento lento por encima de los 30°C.	Crecen rápido por encima de los 35°C. Presentan crecimiento lento por debajo de los 28°C.	Crecen rápido de 20-25°C. Presentan crecimiento lento por encima de los 30°C.

A continuación, se muestran las imágenes de electroforesis comprobatorias, así como los resultados formato FASTA proporcionados externamente (Tabla 5.). No hubo problema alguno con la extracción del DNA, sin embargo, para la electroforesis luego de la purificación, se obtuvo una mejor visualización de la banda cuando la muestra fue diluida 1:10 con agua milliQ debido a la gran concentración de DNA purificado. Al realizar la cuantificación en nanogramos de las bandas, se obtuvo una absorbancia cuantitativa de 29.7 ng para la muestra 9-1 y 76.6 ng para la muestra 2-2.). Una vez que se obtuvieron las secuencias de DNA de ambas cepas, se analizaron con la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) donde se encontró que para la cepa 2-2 había un porcentaje de 98.25% de similitud con los genes de *Pseudomonas protegens* pf-5 Exi5-13 de acuerdo con su secuencia parcial. Por otro lado, la cepa 9-1 se identificó al 99.80% con *Lecrecia adecarboxylata*.

Tabla 5. Imágenes obtenidas de la extracción y purificación de DNA, y su identificación.

Obtención de DNA		
	2-2	9-1
Electroforesis (marcador lambda) para confirmar la extracción de DNA bacteriano.		
Electroforesis (marcador KB) para confirmar la purificación del DNA bacteriano.		

<p>Alineación con BLAST</p>	<p>&gt;H220517-013_N17_22_27F.ab11343 CTGGGGGGGCCCTAACACATGCAGTCGAGCGG CAGCACGGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGG CGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTA GTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCT AATACCGCATACTCCTACGGGAGAAAAGTGGG GGATCTTCGGACCTCACGCTATTAGATGAGCCT AGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCT CACCAAGGCTACGATCCGTAACCTGGTCTGAGA GGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACCG TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA TATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCA TGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTA AAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTAC CTAATACGTGATTGTTTTGACGTTACCGACAGA ATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA ATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTG TTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCT GGGAACTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGT ATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCG GTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAG TGCGGAAGGGCACCCTGGACTGATACTGAC ACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG GATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCGGTAACCG ATGTCAACTAGCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTT AGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCT GGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAAGTCAAGT GAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC ATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCT TACCAGGCCTTGACATCCAATGAACCTTTCTAGA GATAGATTGGTGCCTTCGGGACATTGAGACAGT GCTGCATGGCTGTCTGACCTCCTGTCTGAGA ATGTTGGGTTAATTCGCGTAAACAAGCGCAACCC TTGTCTTAGTACCACCGTTTGGTGGGCCC CTAAGGAGACTGCCGTGACAACCGAGGAAAAG GGGGGGGGGGGGCGCATGTTTTGGGCCCTAT GGGCGGGGTTAAACCGTTTAAAGGGTGGGGC AAAGGGGGGGCCCGCCGGGGGGGGAATCC CCAAAAAAAATTTTTGGGGGGGGGCTTCCC CCTCCCCCGGGGGGGGGGAAAAACCTAA ATTCAAAAAAAGAGAGGGGGGAAAAAA TCCCCGCCCTTGCCCC</p> <p>&gt;H220513-005_M02_22_1492R.ab1 1045 CGCGGATCACCGTGGTACCCTCCCGAAGGT TAGACTAGCTACTTCTGGTGAACCCACTCCA TGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGG AACGTATTCACCGGACATTCTGATTCGCGATT ACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGC AGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGG GATTAGTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCTTT GTACCGACCATGTAGCACGTGTGTAGCCAGG CCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCC ACCTTCTCCGTTTTGTCACCGGCAGTCTCCTT AGAGTGCCACCATAACGTGTGGTAACCTAAG GACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACC CAACATCTACGACACGAGCTGACGACAGCCA TGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACC AATCTATCTTAGAAAGTTCAATGGATGTCAAG GCCTGGTAAAGTTCTTCGCGTTGCTTCGAAAT AACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC GTCAATTCATTTGAGTTTAACTTTCGCGCCGT ACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTG CGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAACGGCTA GTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGT ATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCACC</p>	<p>&gt;H220518-016_C24_91_27F.ab1981 AGGTGCGGCAGCTACACATGCAGTCGAAC GGTAGCACAGAGAGCTTGTCTCGGGTGA CGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGG GAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACT GGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCG CAAGACCAAAGAGGGGACCTTCGGGCCT CTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA GCTAGTAGGTGGGTAATGGCTACCTAGG CGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGA CCAGCCACTGGAAGTGAACACCGTCC AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA TATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATCGAG CCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTCGG GTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAG GTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGAC GTTACCCGAGAAGAAGCACCGGCTAACT CCGTGCCAGCAGCTGGAAGTACCGGAGG GTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGT AAAGCGCACGAGGCGGTCTGTCAAGTCG GATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGA ACTGCATTGAAACTGGCAGGATAGAGTCT TGTAGAGGGGGTGAATTCAGGTTGATG CGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATA CCGGTGGCGAAGGCGGCCCT GGACAAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAG CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCT GGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCGACTT GGAGGTTGTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCG GAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGG GAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACGAAAT GAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGG AGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAA GAACCTTACTACTTTGACA</p> <p>TCCAGAGAACTTACCAGAGATGCTT &gt;H220513-005_A04_91_1492R.ab1 1091 CGTAGGTAATCCTACGTAGGTAGCGCCCTC CCGAAGGTTAAGACTACCTACTTGTGT GCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGG TGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCG TAGCATTCTGATCTACGATTAAGCGATT CGACTTCATGGAGTCCGAGTTCAGACTCCA ATCCGGACTACGACGCACTTTATGAGGTCC GCTTGTCTTCGCGAGGTCGTTCTCTTTGT ATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTA CTCGTAAAGGCCATGATGACTTGACGTCAT CCCCACCTTCTCCAGTTTATCACTGGCAG TCTCCTTTGAGTTCGCGCCTAACCGCTGG CAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGC GGGACTTAACCAACATTTACAAACACGA GCTGACGACAGCTGACGACCTGTCTC AGAGTTCGCAAGGCACCAAGCATCTCT GCTAAGTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTA AGGTTCTTCGCTTGCATCGAATTAACCA CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCATTTGAGTTTAACTTTCGCGCCGTA CTCCCCAGGCGGTGACTTAAACGCGTTAGC TCCGGAAGCCACTCCTCAAGGGAACAACC TCCAAGTGCACACTGTTACGGCGTGGACT ACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCA CGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTC CAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCT CCAGATCTTACGCACTTTCACCGCTACACT TGGAATTCTACCCCTCTACAAGACTTA GCCTGCCAGTTTCAATGCAAGTTCACAGGT TGAGCCCGGGATTTCACATCCGACTTGAC</p>
---------------------------------	---	---

	TCAGTGTTCAGTATCAGTCCAGGTGGTTCGCTTC GCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTTC ACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACC ATACTCTAGCTTGGCAGTTTTGGATGCAGTTCC CAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTTA ACAAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAA TTCCGATTAACGCTTGACCCTCTGTATTACCGC GGCTGCTGGCAGAGGTTAGCCGGTGCTTATTC TGTCGGTAAACGTCAAAAACAATCACGTATTAGGT AACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAG	AGACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCAGTA ATTCCGATTAACGCTTGACCCTCCGTATTA CCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGT GCTTCTTCTGCGGGTAAACGTCAATTGCTGC GGTTATTAACCACACACCTTCCCTCCCGC TGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCT TCATACACGCGGCAT
Bacteria	<i>Pseudomonas protegens</i> 98.25%	<i>Leclercia adecarboxylata</i> 99.80%
<i>P. protegens</i>	<p>&gt;Pseudomonas protegens strain Ex15-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: MK235212.1 Length: 1466 Range 1: 19 to 1156</p> <p>Score:1986 bits(1075), Expect:0.0, Identities:1120/1140(98%), Gaps:10/1140(0%), Strand: Plus/Plus</p> <p>Query 11 CCTAACACATGC-AGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGCGGAC 69       69 Sbjct 19 CCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGCGGAC 78       78</p> <p>Query 70 GGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGATAACGTCGGAAACGGGCGCT 129       129 Sbjct 79 GGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGATAACGTCGGAAACGGGCGCT 138       138</p> <p>Query 130 AATACCGCATACGCTCTACGGGAGAAAGTGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATTAGATG 189       189 Sbjct 139 AATACCGCATACGCTCTACGGGAGAAAGTGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATTAGATG 198       198</p> <p>Query 190 AGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCTACGATCCGTAAC 249       249 Sbjct 199 AGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCTACGATCCGTAAC 258       258</p> <p>Query 250 TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG 309       309 Sbjct 259 TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG 318       318</p> <p>Query 310 GCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTG 369       369 Sbjct 319 GCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTG 378       378</p> <p>Query 370 AAGAAGGTCCTCGGATTGTAAGCAC TTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACG 429       429 Sbjct 379 AAGAAGGTCCTCGGATTGTAAGCAC TTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACG 438       438</p> <p>Query 430 TGATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGG 489       489 Sbjct 439 TGATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGG 498       498</p> <p>Query 490 TAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTT 549       549 Sbjct 499 TAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTT 558       558</p> <p>Query 550 TGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC TGATCCAAAACGGCAAG 609       609 Sbjct 559 TGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC TGATCCAAAACGGCAAG 618       618</p> <p>Query 610 CTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCC TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGG 669       669 Sbjct 619 CTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCC TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGG 678       678</p>	

	<p>Query 670 AAGGAACACCAGTGGCGAAGGCACACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGC 729                             Sbjct 679 AAGGAACACCAGTGGCGAAGGCACACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGC 738</p> <p>Query 730 GTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCACGCCGTAACGATGTCAACTAGC 789                             Sbjct 739 GTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCACGCCGTAACGATGTCAACTAGC 798</p> <p>Query 790 CGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTGAACCGCTGGGGAG 849                             Sbjct 799 CGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTGAACCGCTGGGGAG 858</p> <p>Query 850 TACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAGATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCAT 909                             Sbjct 859 TACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCAT 918</p> <p>Query 910 GTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCCTTGACATCCAAATGAACCTTC 969                             Sbjct 919 GTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCCTTGACATCCAAATGAACCTTC 978</p> <p>Query 970 TAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGA-CATTGAGACA-GTGCTCATGGCTGCTGTCACCT 1027                             Sbjct 979 TAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGCTGTCAGCT 1038</p> <p>Query 1028 CCTGTCTGAGAATGTTGGGTTAATCCCGTAACAAGCGCAACCTTGTCTTAG-TACC 1086                             Sbjct 1039 CGTGTCTGTAG-ATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACAAGCGCAACCTTGTCTTAGTGTACC 1097</p> <p>Query 1087 ACCACGTTTTGGTGGGCC-CTAAGGAGACTGCCG-TGACAA-CCG-AGGAAAagggggg 1142                             Sbjct 1098 AGCACGTTATGGTGGGCACCTAAGGAGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGG 1156</p>
<p><i>Leclercia adecarboxylata</i></p>	<p>&gt;Leclercia sp. strain QH16-30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence            Sequence ID: M1078627.1 Length: 1437            Range 1: 4 to 980</p> <p>Score:1794 bits(971), Expect:0.0,            Identities:975/977(99%), Gaps:0/977(0%), Strand: Plus/Plus</p> <p>Query 5 GCGGCAGCTACACATGCAGTGCAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTG 64                             Sbjct 4 GCGGCAGCTACACATGCAGTGCAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTG 63</p> <p>Query 65 GCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCGTATGGAGGGGATAAATCTGGAAAACG 124                             Sbjct 64 GCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCGTATGGAGGGGATAAATCTGGAAAACG 123</p> <p>Query 125 GTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAGAGAGGGGACCTTCGGGCTCTTGGCAT 184                             Sbjct 124 GTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAGAGAGGGGACCTTCGGGCTCTTGGCAT 183</p> <p>Query 185 CAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGTGGGGTAATGGCTACCTAGGCGACGATC 244                             Sbjct 184 CAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGTGGGGTAATGGCTACCTAGGCGACGATC 243</p> <p>Query 245 CCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACACGCCACACTGGAACAGAGACAGGTCAGACTCCTA 304                             Sbjct 244 CCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACACGCCACACTGGAACAGAGACAGGTCAGACTCCTA 303</p> <p>Query 305 CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCCTGATGACAGCCATGCCGCG 364                             Sbjct 304 CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCCTGATGACAGCCATGCCGCG 363</p> <p>Query 365 TGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTGTGGTT 424                             Sbjct 364 TGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTGTGGTT 423</p> <p>Query 425 AATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAAGAAGACACCGGCTAACCTCCGTGCCAGCAG 484                             Sbjct 424 AATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAAGAAGACACCGGCTAACCTCCGTGCCAGCAG 483</p> <p>Query 485 CCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGACG 544                             Sbjct 484 CCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGACG 543</p> <p>Query 545 GCGGCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCGGGCTCAACTGGGAACTGCATTGCAAACT 604                             Sbjct 544 GCGGCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCGGGCTCAACTGGGAACTGCATTGCAAACT 603</p> <p>Query 605 GGCAGGC TAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA 664                             Sbjct 604 GGCAGGC TAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA 663</p> <p>Query 665 GATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC GGCCCTTGACAAAGACTGACGCTCAGGTCC 724                             Sbjct 664 GATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC GGCCCTTGACAAAGACTGACGCTCAGGTCC 723</p> <p>Query 725 GAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGC 784                             Sbjct 724 GAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGC 783</p> <p>Query 785 ACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTGCACCGCT 844                             Sbjct 784 ACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTGCACCGCT 843</p> <p>Query 845 GGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG 904                             Sbjct 844 GGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG 903</p> <p>Query 905 GAGCATGTGGTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCCTTACTACTCTTGACATCCAGAGA 964                             Sbjct 904 GAGCATGTGGTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCCTTACTACTCTTGACATCCAGAGA 963</p> <p>Query 965 ACTTACCAGAGATGCTT 981                             Sbjct 964 ACTTAGCAGAGATGCTT 980</p>







### Preparación de diésel




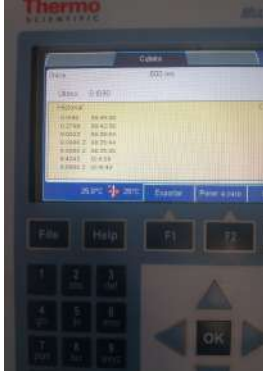
Se obtuvo la densidad del diésel de 0.8394 g/ml, tal como lo muestra la Tabla 6., esto advierte una densidad por debajo de la del agua (0.997 g/ml).

También, se pudo observar que el diésel esterilizado por membrana de 0.22 micras es la mejor forma de hacerlo, ya que durante 5 días no presentó crecimiento alguno, a diferencia del método por luz UV, se comprueba que mediante luz UV únicamente pueden esterilizarse superficies de pocos mm de grosor (Tabla 6.) así mismo, se pone en evidencia que las placas con diésel sin esterilizar presentan lo que parece ser un hongo, mientras que la placa sin diésel permanece sin crecimiento de ningún microorganismo.

Tabla 6. Resultados de la esterilización del diésel mediante diferentes técnicas.

PROPIEDADES DIÉSEL							
Tiempo (min)	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	Promedio
Peso (g/ml)	0.8354	0.8279	0.8340	0.8198	0.8672	0.8399	0.8394
ESTERILIZACIÓN DIÉSEL							
Placas sin diésel	Placas sin esterilizar	Placas bajo luz UV	Placas por membrana				
							

### Preparación de la cinética de crecimiento microbiano

			
Preinóculo	Overnight	Celdas de cuarzo	Espectrofotómetro

### Cinética

La cinética se monitoreó durante 295 horas, se calculó el promedio de cada una de las mediciones, y se obtuvo el logaritmo natural del promedio, a continuación se muestran los resultados experimentales de las cinéticas corregidas, estos datos son el resultado final del promedio corregido

de las absorbancias (Tabla 7.), ya que algunas mediciones en los triplicados eran muy diferentes entre sí, los datos fueron sometidos a pruebas de error experimental de Dixon, Fischer, mediante el Criterio de desviación estándar y por el Criterio respecto a la media.

Con base en la gráfica de crecimiento bacteriano (Figura 4.) podemos notar que la turbidez de los controles se mantuvo estable durante el tiempo en que se realizó la corrida, por lo tanto, se puede asegurar que dentro de los cultivos no creció algún microorganismo que contaminara el medio, así mismo, nos reafirma la esterilidad del diésel, de esta manera, los cultivos no presentaban color diferente al del tiempo cero, caracterizándose solamente por el color amarillo verdoso del diésel estéril.

Se aprecia en la Figura 5. que la bacteria de los cultivos del 5% con diésel, le toma casi 75 h adaptarse al medio, para posteriormente crecer exponencialmente entre las 75 h y las 170 h, esto hace que la fase exponencial dure casi cien horas, se presume que la fase estacionaria dura 173 horas en el cultivo de 5%, además, no se visualiza claramente la fase de muerte, por lo que podría extenderse por más en el tiempo. Se observa también que hubo momentos donde se observaron crecimientos altos variados, de tal manera que a las 251 h fue donde se presentó el punto máximo de densidad óptica (0.7357), y al final de la cinética también se presentó una medición alta de 0.7286, cabe destacar que a ese momento de la cinética los cultivos se encontraban casi a un 50% de contenido, por lo que dicho resultado se debe tomar con cautela.

Por otra parte, en la curva correspondiente al 10% de diésel, se observan claramente las fases de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte, durando así, aproximadamente 74 h en la fase de adaptación, 71.5 h en crecer exponencialmente, de esta manera, la bacteria se mantuvo estable durante aprox. 81 horas y su muerte en las últimas 20 horas de la cinética. Por su parte, en la cinética del 10% c/d c/b se registró su mayor crecimiento con una DO de 0.8970 a las 251 h tal como los cultivos del 5%, a diferencia de esta última se nota una clara fase de muerte que inicia a las 275 horas y crecimiento exponencial se mantiene durante más tiempo, demostrando que a esta concentración de diésel les permite a las bacterias duplicarse de una mejor manera.

Así mismo, se calculó el coeficiente de correlación R de cada una de las fases exponenciales de cada cinética, resultando una  $R=0.9872$  para el 10% y  $R=0.9956$  para los cultivos de 5%, por lo tanto, existe una mejor correlación para los cultivos al 5%, no obstante, para las dos cinéticas se demuestra que existe una buena correlación entre el crecimiento en la biomasa y los nutrientes del medio de cultivo, ya que ambas están cerca del parámetro  $R=1$ .

Se calcularon los parámetros cinéticos de crecimiento ( $m$ ), tiempo de duplicación ( $t_d$ ) y número de generaciones ( $n$ ), se observa que el crecimiento en los cultivos al 10% crecen por encima del 5%, no obstante, al tener dos veces mayor concentración que el 5% podría pensarse que su crecimiento sería dos veces más rápido, o que el número de generaciones podría ser mucho mayor, esto demuestra que una concentración mayor de diésel no asegura un crecimiento elevado de biomasa, a pesar de su relación directamente proporcional, no se exhiben cambios drásticos en el crecimiento. Sin embargo, se observa como la fase estacionaria de los cultivos al 5% de diésel logran una mayor estabilidad que la del 10%, de hecho, es notoria la muerte abrupta de las bacterias a las 275 horas en los cultivos con 10% de diésel, aunque se logra apreciar un ligero crecimiento, puede ser característico de la fase de muerte, mientras que de forma *a priori* se podría pensar que solo mirando la fase estacionaria del 5% de diésel se percibe una estabilidad más duradera, aunado a ello, la fase exponencial de la cinética al 5% inicia casi 24.5 horas antes que la del 10%, esto indica

que los cultivos con 5% de diésel se presentan como aquellos con una concentración idónea de diésel para el crecimiento rápido de la bacteria pero no llega al crecimiento máximo de la cinética al 10%, esto significa que una concentración al 5% de diésel representa una fuente suficiente de carbono para que *Pseudomonas protegens* pueda sobrevivir y crecer al mismo tiempo que genera metabolitos biosurfactantes, en cambio, una concentración al 10% favorece la duplicación bacteriana durante tiempos más prolongados de tal manera que el diésel se aprovecha mejor como fuente de carbono, al mismo tiempo que estas producen metabolitos surfactantes para poder asimilarlo.

#### Ajuste a modelos matemáticos

Tanto la cinética del 5% como la cinética del 10% fueron sometidas a tres modelos de crecimiento bacteriano; Verhulst-Pearl, Gompertz y al modelo Logístico.

Como se observa en la Figura 6. la cinética al 5% se distingue por encajar de una mejor manera con el modelo Logístico, teniendo así un valor de 0.9900 en correlación de datos, de acuerdo con McKellar & Xuewen (2003), los datos experimentales se incrementan de forma exponencial a través del tiempo, un comportamiento que encaja en un modelo logístico se caracteriza por ser una curva donde existe un momento de inflexión a partir del cual la tasa de crecimiento disminuye, posteriormente el número de bacterias no cambia en el tiempo, este punto de inflexión se ha utilizado para modelar las fases individuales de algunos microorganismos. Lo anterior hace referencia a que los recursos en el medio son limitados, el efecto depresivo de la densidad sobre la población es de tipo lineal y las condiciones ambientales son constantes (Chiappa et al., 2009).

Podemos observar que a las 122 h el punto de inflexión es drástico y esto se puede deber a la producción de biosurfactantes que se estaba generando, ya que como lo veremos más adelante en la prueba de E24, es en este punto donde se observa mayor cantidad de emulsión y una constante producción de biotensoactivo.

Así mismo, es necesario destacar que la microbiología predictiva es una herramienta útil para describir y predecir el crecimiento bacteriano bajo diferentes condiciones, sin embargo, no existen bases claras para la selección del modelo a utilizar, algunos de los principios generales son elegirlo con base en la simplicidad, parametrización, rango de aplicabilidad, especificación estocástica e interpretabilidad, por lo que es recomendable interpretar los resultados con base en comparación con otros microorganismos y tomarlos con cautela (Castro et al., 2008).

En cuanto a la prueba del 10% (Figura 7.), se observa que la cinética toma un crecimiento más pronunciado y de hecho, consigue dos correlaciones altas con dos modelos diferentes; obteniendo así 0.9973 de correlación para el modelo Logístico y 0.9107 en los datos del modelo de Gompertz, mientras que para el modelo de Verhulst-Pearl mostró la misma correlación que el 5% (0.4027). De acuerdo con McKellar & Xuewen (2003), la ecuación de Gompertz se utiliza ampliamente para adaptarse a una gran variedad de curvas de diferentes microorganismos, así como a su crecimiento basado en pruebas de crecimiento secundarias como la turbidez, pese a ello, existen algunas limitaciones en su uso, concretamente el tiempo de generación puede ser subestimado por hasta un 13%, sus asíntotas llegan a ser más bajas así que para tener un buen ajuste se requieren gran cantidad de datos en la fase exponencial.

Tabla 7. Resultados de las mediciones de turbidez DO<sub>600</sub>.

TIEMPO	CONTROL S/B C/D					5% C/B C/D					10%		
	A	B	C	Prome dio	LN	A	B	C	Prome dio	LN	A	B	C
0	0.1323	0.1297	0.1287	0.1302	-2.0384	0.2240	0.2092	0.1934	0.2089	-1.5661	0.1347	0.1072	0.1299
14.5	0.1539	0.1531	0.1602	0.1557	-1.8596	0.2057	0.2447	0.2353	0.2286	-1.4759	0.2246	0.1926	0.1913
27	0.1800	0.1240	0.2204	0.1748	-1.7441	0.3241	0.2930	0.2310	0.2827	-1.2634	0.2601	0.2100	0.2328
51	0.1178	0.1822	0.1824	0.1608	-1.8276	0.2564	0.2761	0.3076	0.2800	-1.2728	0.3270	0.2300	0.3478
74	0.1986	0.1594	0.1707	0.1762	-1.7359	0.2722	0.2557	0.3523	0.2934	-1.2262	0.2685	0.2659	0.2396
98.5	0.2102	0.2562	0.2036	0.2233	-1.4991		0.3768	0.3622	0.3695	-0.9956	0.3488	0.2296	0.2713
122	0.2031	0.2018	0.3208	0.2419	-1.4192	0.4576		0.5693	<b>0.5135</b>	-0.6666		0.3436	0.3931
145.5	0.3290	0.1860	0.2731	<b>0.2627</b>	-1.3367	0.5130	0.5096	0.5690	<b>0.5305</b>	<b>-0.6339</b>	0.5333	0.5426	0.5370
170	0.1970	0.1890	0.2046	0.1969	-1.6252	0.5703	0.5530	0.5643	0.5625	-0.5753	0.7163	0.8056	0.6620
194	0.2106	0.1390	0.1316	0.1604	-1.8301	0.6340	0.5940	0.5970	<b>0.6083</b>	-0.4970	0.7578	0.7070	0.7615
218	0.1846	0.2086	0.2346	<b>0.2093</b>	-1.5641	0.5740	0.6123	0.5206	0.5690	-0.5639	0.8300		0.8583
251	0.1470	0.1940	0.1060	0.1490	-1.9038	0.7020	0.7693		<b>0.7357</b>	-0.3070	0.8836	0.9103	
275	0.1316	0.2136	0.1700	0.1717	-1.7618	0.5773	0.6616		0.6195	-0.4789	0.6136	0.6846	
295	0.1716	0.161	0.119	0.1505	-1.8936	0.7203	0.7166	0.749	<b>0.7286</b>	<b>-0.3166</b>	0.7876	0.4985	0.6213

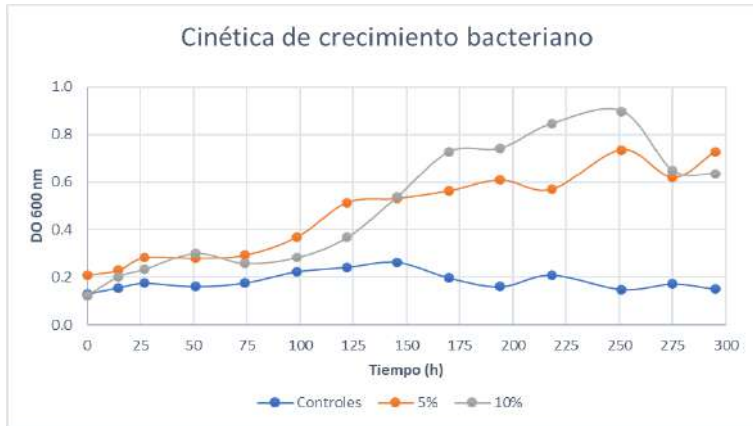


Figura 4. Cinética de crecimiento

	5%	10%
$\mu$ =	0.0116	0.0135 h <sup>-1</sup>
td=	59.7541	51.3442 h
n=	4.9369	5.7455 generaciones

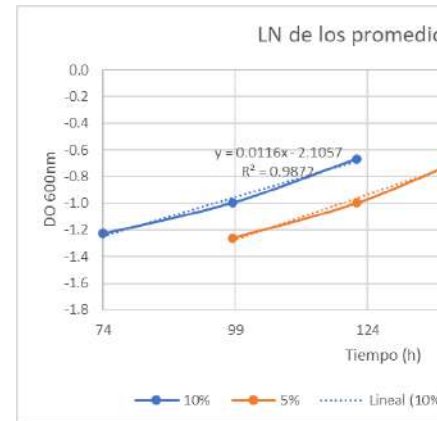


Figura 5. Correlación lineal de la fase exponencial de las cinéticas.



Figura 6. Cinética del 5% ajustada a los modelos cinéticos.

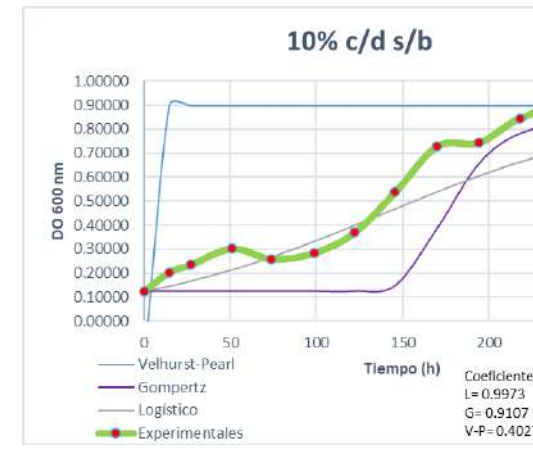


Figura 7. Cinética del 10% ajustada a los modelos cinéticos.

Estos resultados indican que la cinética de crecimiento se ve sumamente afectada dependiendo de la concentración de diésel, y esto repercute tanto en la duración de las fases como en el crecimiento de cada una de ellas, por lo tanto, su ajuste a un modelo específico es diferente pues no se comporta con base en suposiciones fundamentadas en una cinética con menor concentración de diésel. Adicionalmente se deduce que la generación de biosurfactante puede producir cierto sesgo en la medición en la turbidez.

Con esta información se infiere que con una mayor cantidad de datos en la fase exponencial el ajuste pudo llegar a igualar la correlación con el modelo logístico, puesto que los datos adquieren justamente la tendencia curva del modelo de Gompertz y es razonable pensar que el modelo se desfase en el crecimiento exponencial de la cinética debido a su error del 13% antes mencionado, no obstante, se presentan mejores resultados en correlación con el modelo logístico, lo que empata con los resultados obtenidos de la cinética del 5%, por ello es necesario recordar que los modelos son una representación ideal simplificada de la realidad que permite comprender la estructura y función de un sistema complejo y real, por lo que se recomienda generar un conjunto de hipótesis acerca de los mecanismos causales de las relaciones entre datos experimentales y modelos matemáticos con el fin de proponer una estrategia para elegir un modelo que represente la realidad (Chiappa, 2009; Bazin & Prozer, 2018).

#### **Cribado primario y secundario**

Las pruebas de cribado primario que se realizaron fueron la prueba de colapso de la gota, dispersión de aceite y la prueba de emulsificación (E24) como cribado secundario, esta última se realizó cada 24 h, durante toda la cinética de crecimiento bacteriano, mientras que las de cribado primario se realizaron a las 200 h de iniciada la cinética. La prueba de E24 presentó los siguientes resultados sometidos a corrección de error mediante la prueba de Dixon, Fischer, mediante el criterio de desviación y promedio (Tabla 8.).

Tabla 8. Resultados de la prueba de emulsificación entre el sobrenadante y el diésel.

		INTERFASE (mm)									
Tiempo		CONTROLES CON AGUA			CONTROLES C/D SB			PRUEBA 5%			PRU
(h)		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A
T0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0
T1	14.5	3	0	3	0	0	0	0	1	1	0
T2	27	1	0	1	1	0	0	1	2	2	
T3	51	4	4	4		0	1		2	2	1
T4	74	2		3	0			2	1		1
T5	98.5	2		1	1		1	2	2	1	1
T6	122	1	2		0	0	1	1	2	2	1
T7	145.5	2	1	1	0	0	1	3		2	2
T8	170		0	1	0	0	1	2	3	2	
T9	194	0	0	0	0	0	0	3		2	3
T10	218		2	3	0	1	1	3	3		2
T11	251	0	0		0		1	4	4	4	
T12	275	0	0	0	1	0	0				
T13	295	1	2	1	0	2		3		3	2

ALTURA TOTAL DE LA MEZCLA (mm)

T0	0	41	42	42	42	41	42	42	41	41	42
T1	145.5	40	41	42	42	42	42	40	41	41	41
T2	27	41	41	41	41	41	41	41	41	41	
T3	51	41	41	40		42	43		42	42	42
T4	74	42		42	40		40	40	40		40
T5	98.5	42		42	41		41	40	40	40	42
T6	122	42	43		43	43	43	43	43	43	42
T7	145.5	42	43	42	42	43	42	44		44	43
T8	170		44	44	43	42	43	42	43	42	
T9	194	43	42	42	44	44	44	43		43	42
T10	218		42	42	41	41	41	42	42		42
T11	251	40	40		42		42	42	41	41	
T12	275	41	41	41	42	42	42				
T13	295	44	44	42	41	41		42		42	42

E24 %

T0	0	0.0000	2.3810	4.7619	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
T1	145.5	7.5000	0.0000	7.1429	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.4390	2.4390	0.0000



T2	27	2.4390	0.0000	2.4390	2.4390	0.0000	0.0000	2.4390	4.8780	4.8780		
T3	51	9.7561	9.7561	10.000		0.0000	2.3256		4.7619	4.7619	2.3810	
T4	74	4.7619		7.1429	2.0000		0.0000	5.0000	2.5000		2.5000	
T5	98.5	4.7619		2.3810	2.4390		2.4390	5.0000	5.0000	2.5000	2.3810	
T6	122	2.3810	4.6512		0.0000	0.0000	2.3256	2.3256	4.6512	4.6512	2.3810	
T7	145.5	4.7619	2.3256	2.3810	0.0000	0.0000	2.3810	6.8182		4.5455	4.6512	
T8	170		0.0000	2.2727	0.0000	0.0000	2.3256	4.7619	6.9767	4.7619		
T9	194	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	6.9767		4.6512	7.1429	
T10	218		4.7619	7.1429	0.0000	2.4390	2.4390	7.1429	7.1429		4.7619	
T11	251	0.0000	0.0000		0.0000		2.3810	9.5238	9.7561	9.7561		
T12	275	0.0000	0.0000	0.0000	2.3810	0.0000	0.0000					
T13	290	2.2727	4.5455	2.3810	0.0000	4.8780		7.1429		0.0000	4.7619	

PROMEDIOS E24

TIEMPO	CONTROLES CON AGUA	CONTROLES CD SB	PRUEBA 5%
T0	0	2.3810	0.0000
T1	14.5	4.8810	0.0000
T2	27	1.6260	0.8130
T3	51	9.8374	1.1628

T4	74
T5	98.5
T6	122
T7	145.5
T8	170
T9	194
T10	218
T11	251
T12	275
T13	

		5.9524
X=	3.2197	3.5714
s=	2.77919	3.5161
		3.1561
V=	7.72391	1.1364
		0.0000
		5.9524
		0.0000
		0.0000
		0.0000
		3.0664

		1.0000
X=	0.9863	2.4390
s=	0.77533	0.7752
		0.7937
V=	0.60114	0.7752
		0.0000
		1.6260
		1.1905
		0.7937
		2.4390

		3.7500
X=	5.2060	4.1667
s=	2.6973	3.8760
		5.6818
V=	7.2755	5.5002
		5.8140
		7.1429
		9.6787
		9.6787
		7.1429

X=	4
s=	2
V=	6

Se realizó un gráfico tomando al tiempo como eje de las X y los resultados en porcentaje de la prueba de emulsificación (E24%) en el eje de las Y (ver Fig. 8).



Figura 8. Gráficas obtenidas de la emulsificación producida por los cultivos de 5% y 10%

Claramente se aprecia en la gráfica, la producción de biosurfactante tanto del 5% como del 10% de diésel no difiere en gran escala una de otra, se aprecia como de las 25 a las 125 h la producción de biosurfactante permanece relativamente constante, mientras que luego de las 125 h hay una alza en la producción durante las 250 y 276 h con un pico máximo donde ambas producciones se encuentran y luego desciende, esto nos indica que a las 250 h es donde encontramos el mayor porcentaje de emulsificación independientemente de la concentración de diésel, esto concuerda con el mayor punto de crecimiento bacteriano en la cinética que se presentó anteriormente, además, se observa que la alza en la emulsificación en los datos del 5%, se presenta al final de la fase exponencial y se extiende durante toda la fase estacionaria, finalizando al igual que la cinética de crecimiento bacteriano, con un resultado poco concluyente en la fase estacionaria, es decir, no se visualiza un descenso sino una continuidad en la producción de biosurfactante.

Por otra parte, el comportamiento de la emulsificación en los cultivos del 10%, aunque presentan resultados similares a los del 5%, muestran diferencias significativas en el momento que se predispone como el punto de producción exponencial de biosurfactante en el medio, ya que éste se genera de manera temprana en la fase exponencial de su cinética de crecimiento (122 h), luego se mantiene durante 48 horas hasta tener después tener un pico máximo a las 250 h que se mantiene por poco tiempo en contraposición con la cinética de 5% que mantiene su emulsificación por más de 24 h. En ambos casos, se presenta una notoria baja en la emulsificación al final de la prueba, anteponiéndose la del 10% que inicia la baja a las 275, esto concuerda con los datos obtenidos en la cinética de crecimiento.

Los datos son concluyentes y nos muestran que no hay una diferencia significativa en la prueba de cribado secundario, por lo tanto, no hay diferencia destacable en los cultivos con concentración diferente de diésel, ya que ambas cultivos (5% y 10%) muestran que las propiedades tensoactivas de sus metabolitos emulsifican hasta un 10% de diésel en esta prueba, en otras palabras, emulsifica hasta casi 200  $\mu\text{L}$  de diésel en 24 h. (Ver ecuación 1.) y en promedio emulsifica 5.2060% de diésel en los cultivos al 5% y 4.2453% de diésel en los cultivos del 10%, es decir, emulsifica en 24 horas

104 y 85 microlitros de diésel respectivamente (Ver Ecuación 2. y 3.). Esto demuestra un importante poder de emulsificación por parte de los metabolitos biosurfactantes presentes en los medios de cultivo.

$$2 \text{ ml de diésel [9.6787\% (máx emulsificación)]} / 100\% = 0.1935 \text{ ml} = 194 \text{ micro L} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$2 \text{ ml de diésel [5.2060\% (prom. emulsificación)]} / 100\% = 0.1041 \text{ ml} = 104 \text{ micro L} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$2 \text{ ml de diésel [4.2453\% (prom. emulsificación)]} / 100\% = 0.0849 \text{ ml} = 85 \text{ micro L} \quad \text{Ecuación 3}$$

Por otra parte, los controles mostraron poca emulsificación en las pruebas, con un promedio de 0.98%, por lo que, este promedio puede ser restado de las ecuaciones anteriores para mayor precisión en los resultados. Mientras que la gráfica de E24 de los tubos control con agua y diésel (Figura 9.) presentaron datos poco precisos, pues a lo largo de la gráfica no se presenta un comportamiento claro, sino que el porcentaje de emulsificación asciende y desciende sin patrón alguno, esto podría deberse a que las pizetas tuvieran algún rastro de jabón cuando se lavaron.

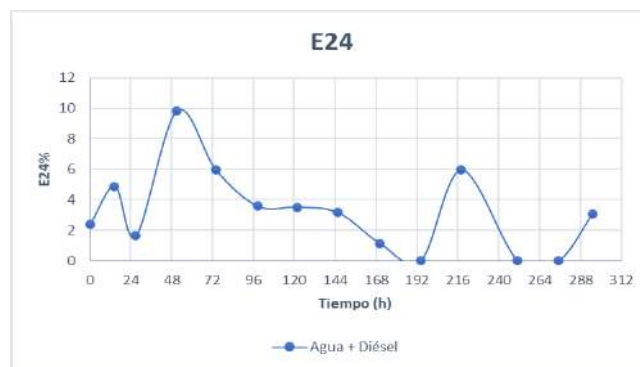


Figura 9. Gráfico obtenida del control con agua.

Por otra parte, las pruebas de cribado primario que se realizaron casi al finalizar la cinética de crecimiento bacteriano, fungieron como pruebas confirmatorias de la presencia de metabolitos biosurfactantes en los medios (Tabla 9.).

Tabla 9. Cribado primario al sobrenadante libre de células.

Prueba	Fotos	Descripción de la imagen
Colapso de la gota		Se observa cómo las gotas de 2 miL de agua y control permanecen esféricas dando así la prueba negativa, mientras que las demás gotas, tomaron una forma más plana porque disminuyó la tensión superficial en ellas, por lo tanto, la prueba resultó positiva. Se tomó al detergente tritón como referencia.
Esparcimiento de aceite	*No se tomaron fotos* 41 mm de dispersión en aceite.	La prueba resultó positiva respecto a su control.

### Resultados extracción L/L

Luego de que se eligieron las alícuotas tomadas en el momento de mayor emulsificación (250 h) de acuerdo con las gráficas, y una vez que se llevó a cabo la metodología de extracción l/l con una mezcla de cloroformo metanol 1:1 se logró extraer el biosurfactante en bruto (BS) con las características cuantitativas y cualitativas que se presentan en la tabla 10. Algunos tubos no se lograron evaporar perfectamente y se llevaron a evaporación una vez más con las mismas condiciones, se infiere que la dificultad en la evaporación se debió a residuos de agua.

No se logró obtener biosurfactante en las muestras controles más que residuos de agua que no se pudieron evaporar completamente.

Tabla 10. Tabla comparativa de los biosurfactantes puros.

Tubo correspondiente al cultivo	Peso del biosurfactante bruto (BS)	Propiedades organolépticas del biosurfactante bruto	Foto
Control A c/d s/b	No se obtuvo BS	Residuos de agua	-
Control C c/d s/b	No se obtuvo BS	Residuos de agua	-
5% A	29.3 mg	Color difícil de percibir Aceitoso	
5% C	23.4 mg	Verdoso Sin olor Aceitoso	
10% A	26.9 mg	Verdoso Sin olor Aceitoso	
10% B	28.1 mg	Verdoso Sin olor Aceitoso	
10% C	25.6 mg	Verdoso Sin olor	
5% B	20.3 mg	Residuo rosáceo Sin olor Aceitoso	

### Detección por TLC

Durante la realización de la cromatografía en capa fina se efectuaron varias corridas (Tabla 11.) con el fin de identificar la mejor mezcla de disolventes o el solvente ideal para detectar claramente las manchas en la placa. Para cada placa se calcularon las Rf y se detectaron bajo luz UV y por tinción de Vainillina, tal como se menciona en la metodología.





Los productos de biosurfactante bruto se denominaron de la siguiente manera:







10% A - M1    10% B - M2    10% C - M3    5% A - M4    5% B - M5    5% C - M6

Lo anterior, con el fin de simplificar la escritura de cada muestra en las placas, así mismo, se eligió al producto obtenido por el Control A c/d s/b como control negativo para eluir las placas, mismo que se identificó como "C". Para todas las placas se utilizó el aminoácido Glicina como control positivo.

Como se puede visualizar en las imágenes, se obtuvo una mejor separación de manchas mediante la utilización de cloroformo como fase móvil, se realizaron varias placas hasta llegar a la visualización clara de una mejor separación en las manchas.

Tabla 11. Detección de cromatogramas por luz UV y Vainillina.

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PARA LAS MUESTRAS AL 10% (M1, M2 Y M3)					
Prueba	Tiempo de elución (min)	Fase móvil	Manchas a luz UV	Manchas por tinción de Vainillina	Rf**
1	17	2:1 CH <sub>3</sub> OH-CHCl <sub>3</sub>		 *	M1= 0.76 M2=0.76 M3=0.82
2	15	1:1 CH <sub>3</sub> OH-CHCl <sub>3</sub>			M1=0.8 M2=0.82 M3=0.83





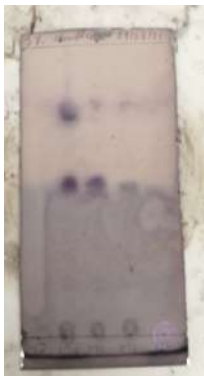
3	17	1.25:1 CH <sub>3</sub> OH-CHCl <sub>3</sub>			M1=0.75 M2=0.75 M3=0.8
4	15	1:0 CH <sub>3</sub> OH			M1=0.72 M2=0.74 M3=0.76 C+=0.61
5	17	1:0 CHCl <sub>3</sub>			M1-1=0.74 M1-2=0.88  M2-1=0.73 M2-2=0.87  M3-1=0.72 M3-2=0.89  C+=0.73

\* La primera placa se reveló con Ninhidrina para visualizar aminoácidos, fue la única placa con esta tinción, ya que como se muestra en la imagen, no reveló las manchas que se apreciaban bajo luz UV.

\*\* Factor de retención (Rf): Distancia recorrida por el compuesto/distancia recorrida por el eluyente.

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PARA LAS MUESTRAS AL 5% (M4, M5 Y M6)

Prueba	Tiempo de elución (min)	Fase móvil	Manchas a luz UV	Manchas por tinción de Vainillina	Rf
--------	-------------------------	------------	------------------	-----------------------------------	----

1	25	1:1 CH <sub>3</sub> OH-CHCl <sub>3</sub>			M4=0.75 M5=0.76 M6=0.72
2	23	1.25:1 CH <sub>3</sub> OH-CHCl <sub>3</sub>			M4=0.75 M5=0.74 M6=0.76
3	16	1:0 CHCl <sub>3</sub>			M4-1=0.52 M4-2=0.76 M4-3=0.82  M5-1=0.47 M5-2=0.52 M5-3=0.82  M6-1=0.52 M6-2=0.82  C+ = 0.5

Al concluir con las pruebas de detección, se logró una separación más completa para las placas que se eluyeron con cloroformo como único solvente, incluso, se lograron percibir manchas tenues que estaban muy cerca de las manchas más fácilmente apreciables. Por ello, se comprueba que las moléculas que integran el biosurfactante bruto presentan diferentes polaridades, en el caso de aquellas que quedan más retenidas a lo largo de la placa se les atribuye una polaridad más elevada, en cambio, las que eluyen fácilmente con el cloroformo se caracterizan por ser poco polares (UAM, 2007). A pesar de que las manchas pudieran estar bien separadas, éstas se concentran en la parte alta de la placa, lo que sugiere que todos los compuestos en general poseen mediana a poca polaridad.

Cabe destacar que todas las manchas se visualizaron bajo luz UV, esto significa que los compuestos de interés absorben a 254 nm y que al ser tan oscuros indican la presencia de moléculas altamente conjugadas, además, al teñirse con Vainillina, confirman la presencia de nucleófilos fuertes y







débiles, tal como los alcoholes y las aminas (Nichols, 2020), mismos que se encuentran en la molécula de Orfamida A. Así mismo, las manchas azules violáceas por vainillina, revelan que en la muestra hay presencia de grupos funcionales R-NH<sub>2</sub>, C=O (Allen, 1981).

En cuanto a la tinción con Ninhidrina, debido a que solo reacciona con aminas primarias y aunque existe información acerca de su tinción a aminas secundarias, no hay evidencia clara de que tiña amidas secundarias que se encuentran presentes en la molécula de la orfamida A. No obstante, en vista de que el biosurfactante bruto presenta otras moléculas como impurezas, es probable que la solución de ninhidrina haya dado un falso negativo (Shih-Wen, 2006)

Por otra parte, estos resultados mostraban que era necesaria la purificación de los productos brutos y también una prueba confirmatoria de que las manchas se separaban completamente con cloroformo, por lo que se realizaron pruebas de verificabilidad (Tabla 12.), efectuando por segunda vez la corrida de las muestras con cloroformo, con la misma cantidad de muestra y bajo el mismo esquema de elución.

Tabla 12. Pruebas de verificación realizadas para reproducibilidad.

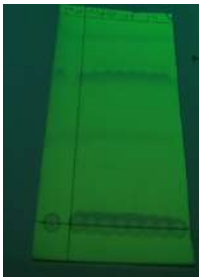

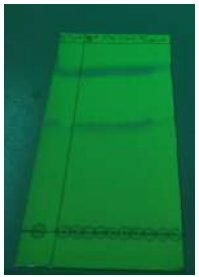





PRUEBAS DE VERIFICACIÓN					
	Tiempo de elución	Fase móvil	Manchas a UV	Tinción con Vainillina	Rf
10% M1 M2 M3	15 min	Cloroformo			M1-1=0.87 M1-2=0.53 M1-3=0.23  M2-1=0.86 M2-2=0.53 M2-3=0.23  M3-1=0.86 M3-2=0.52 M3-3=0.18 C+=0.7
5% M4 M5 M6	17 min				M4-1=0.83 M4-2=0.48 M4-3=0.24  M5-1=0.83 M5-2=0.48 M5-3=0.24  M6-1=0.83 M6-2=0.46 M6-3=0.24 C+=0.6

Una vez que se comprobó que los resultados eran reproducibles y al no tener diferencias notorias en los Rf, se llevó a cabo la purificación del biosurfactante bruto.

### Purificación

Se seleccionaron las muestras M1, M2, M4 y M6 para desarrollar la purificación del biosurfactante mediante cromatografía preparativa, ya que presentaron la mejor separación y visualización de componentes en la cromatografía en capa fina. Las bandas que se lograron visualizar en las placas (Tabla 13.) fueron desprendidas, luego fueron sometidas a un proceso de extracción como se detalló en la metodología, los compuestos purificados se pesaron en sus tubos eppendorf previamente tarados para conocer su peso en gramos.

Tabla 13. Purificación de las muestras de biosurfactante bruto.




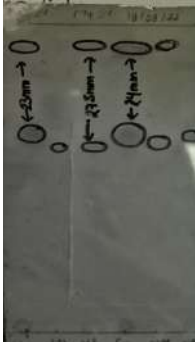
	M1	M2	M4	M6
Placa preparativa bajo luz UV				
Porción de la placa teñida con Vainillina				
Rf	M1-1 = 0.90 M1-2= 0.68 M1-3= 0.47	M2-1 = 0.82 M2-2= 0.71	M4-1 = 0.83 M4-2= 0.49	M6-1 = 0.95 M6-2= 0.94 M6-3= 0.88 M6-4= 0.70 M6-5= 0.35
Peso de cada producto purificado	M1-1 = 26.2 mg M1-2= 48.6 mg M1-2= 37.2 mg	M2-1 = 26 mg M2-1= 31.3 mg	M4 -1 = 32.7 mg M4-2 = 25.5 mg	M6-1 = 28.8 mg M6-2= 7.9 mg M6-3= 23.7 mg M6-4= 39.5 mg M6-5= 34.8 mg

Es interesante comparar los dos tipos de revelado, ya que bajo la luz UV se visualizan manchas que no se tiñen con Vainillina, esto nos da un claro indicio de que las impurezas presentes cuentan con grupos funcionales tales como compuestos aromáticos, ésteres o alquenos o bien, son compuestos

que no pueden formar enoles y/o reacciones de acetilación por lo que la tinción no es reactiva (Allen, 1981).

Luego de haber purificado los compuestos, se realizó una TLC a manera de comprobación, para verificar la calidad de la purificación (Tabla 14.). Se realizó con las mismas condiciones; cloroformo como fase móvil, con 10  $\mu$ L de muestra y añadiendo una muestra de biosurfactante bruto.

Tabla 14. Pruebas de verificación por TLC preparativa.

PRUEBA DE VERIFICACIÓN DE LA PURIFICACIÓN DEL BIOSURFACTANTE					
	Tiempo de elución	Fase móvil	Manchas a luz UV	Manchas por tinción de Vainillina	Rf
Placa M1 M2 M3	20 min	Cloroformo			Muestra 1 sin purificar = 0.65 M1-1 = 0.93 M1-2 = 0.67 M1-3 = 0.58
Placa M2 M2 M4 M4	18 min				Muestra 2 sin purificar = 0.92 Muestra 2a sin purificar = 0.66 M2-1 = 0.94 M2-2 = 0.63 M2-2a = 0.63  Muestra 4 sin purificar = 0.92 Muestra 4a sin purificar = 0.67 M4-1 = 0.66 M4-1a = 0.93 M4-2 = 0.64

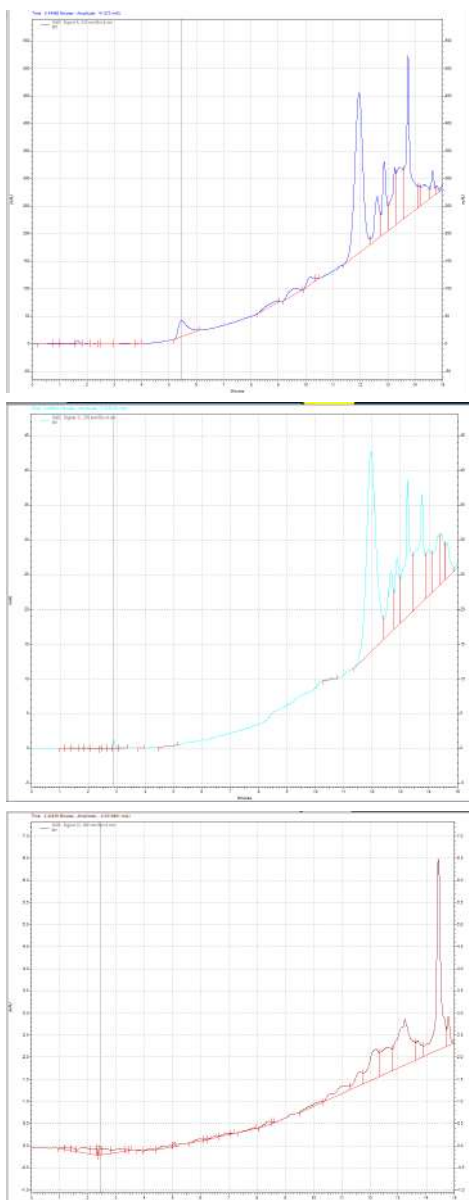
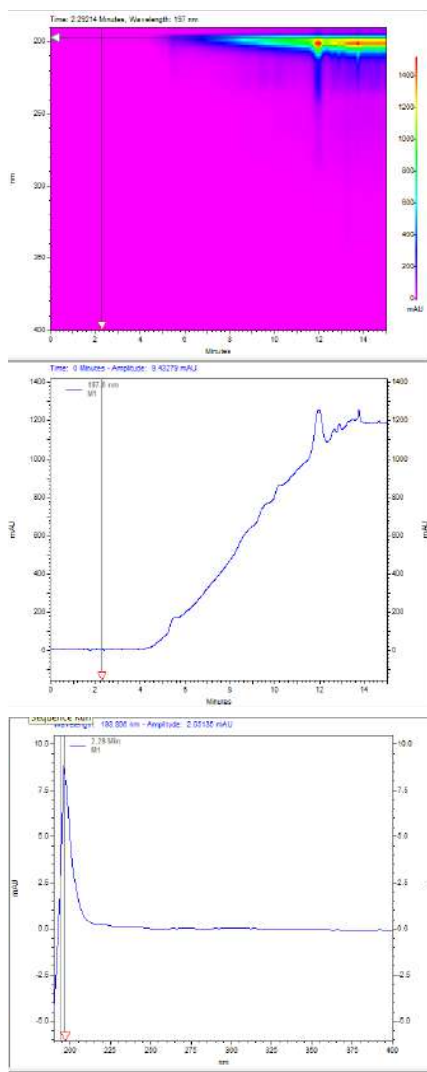
Las placas de comprobación de pureza demostraron una buena purificación en la M1a, M1b e insuficiente para la M1c, ya que para esta última se logran apreciar dos manchas, una muy tenue por debajo de la más fácilmente observable, por otro lado, como se observa en la placa de las muestras 2 y 4, la mayoría de las muestras presentan 2 manchas, lo que implica que las muestras están parcialmente puras.

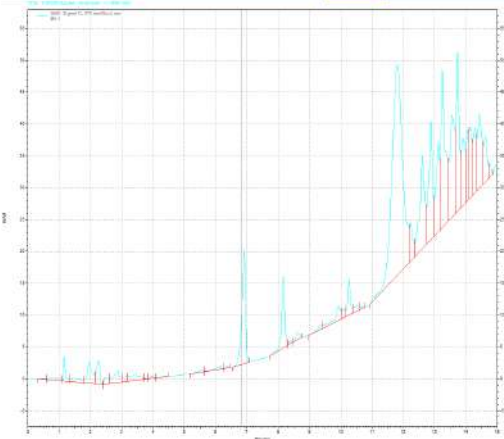
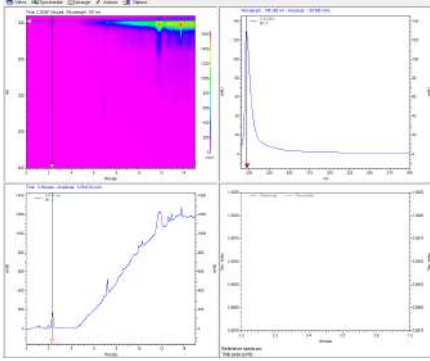
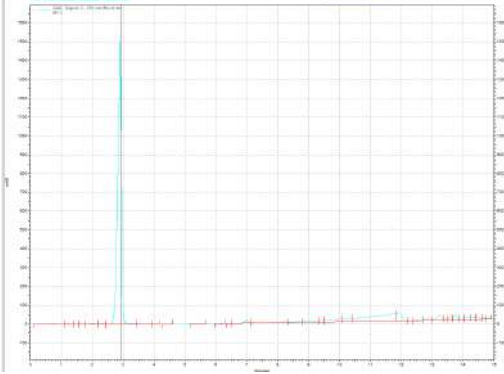
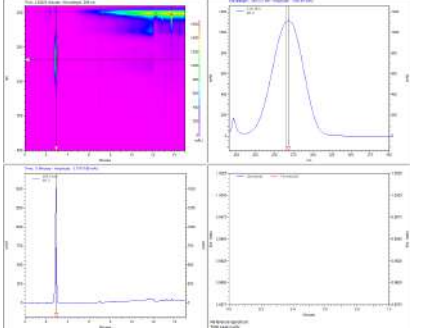
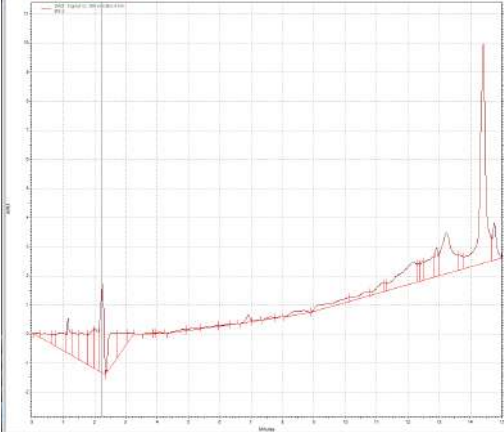
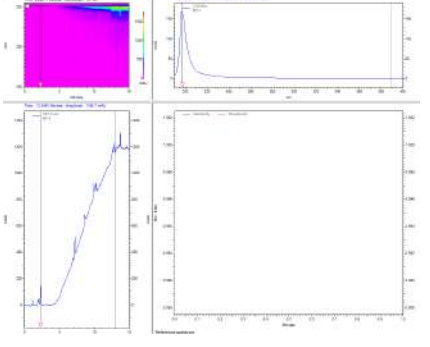
### Separación por HPLC

La separación por HPLC se realizó bajo las mismas condiciones para todas las muestras, tal como se observa en la Tabla 15. Primero se obtuvieron los cromatogramas de cada muestra que no se sometió a purificación para después compararla contra sus compuestos parcialmente purificados.

Como se observa el cromatograma de la M1 la concentración de sus compuestos es proporcional al área de los picos, mismos que logran apreciarse a diferente longitud de onda, como se tenía previsto, la Muestra 1 alberga analitos sin purificar que se reflejan en el espectro UV.

Tabla 15. Resultados arrojados por el HPLC de los analitos M1 y sus residuos purificados.

Muestra	Cromatograma específico	Cromatograma espectro UV.
<p>M1</p> <p>210 nm Rt=5.453 min Área=1444730 A%=4.04</p> <p>270 nm Rt=2.907 min Área=12042 A%=0.33 Height= 2579 Height%= 1.10</p> <p>380 nm Rt= 1.867 Área= 6484 A%=1.99 Height=285 H%=1.40</p>		

<p>M1-1</p> <p>270 nm Rt=6.913 Height= 36934 Área=295600 H%=6.37 A%=5</p> <p>Rt= 8.167 min Height=23491 Área= 158445 H%= 4.05 A%=2.68</p>		
<p>M1-2</p> <p>270 nm Rt=2.90 min Height=3163028 Área=25427014 H%=81.62 A%=0.18</p>		
<p>M1-3</p> <p>380 nm Rt=2.247 Height=6417 Área= 51104 H%=11.03 A%=6.52</p>		

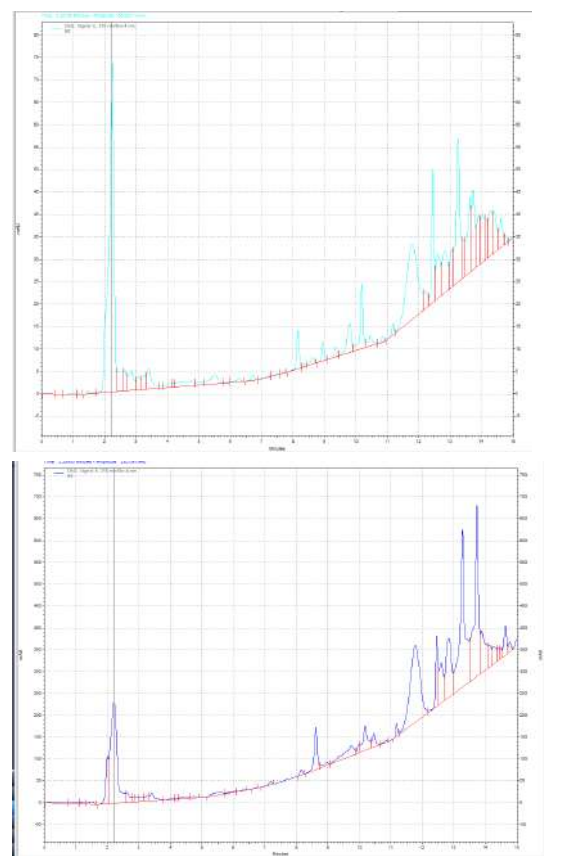
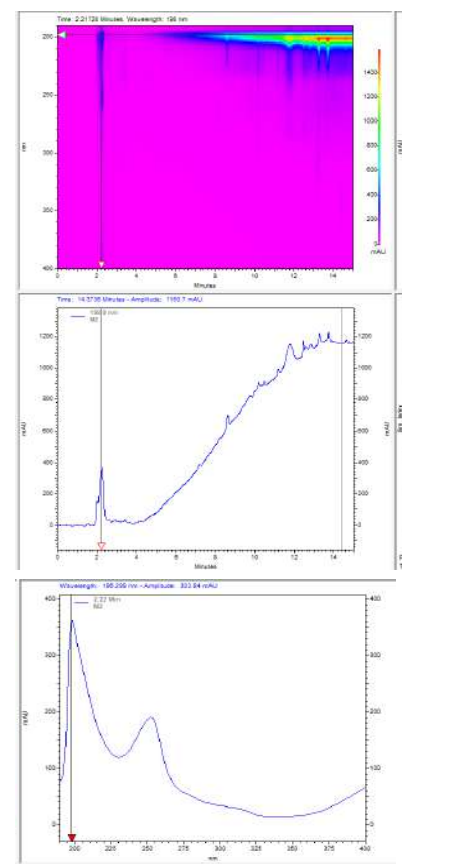
Con base en los cromatogramas y los datos que arrojan, el analito M1-2 fue aquel que muestra ser el analito con mayor pureza, ya que no figuran otros picos alrededor de él ni a lo largo del cromatograma, así mismo, los datos de tiempos de retención arrojados en los cromatogramas son

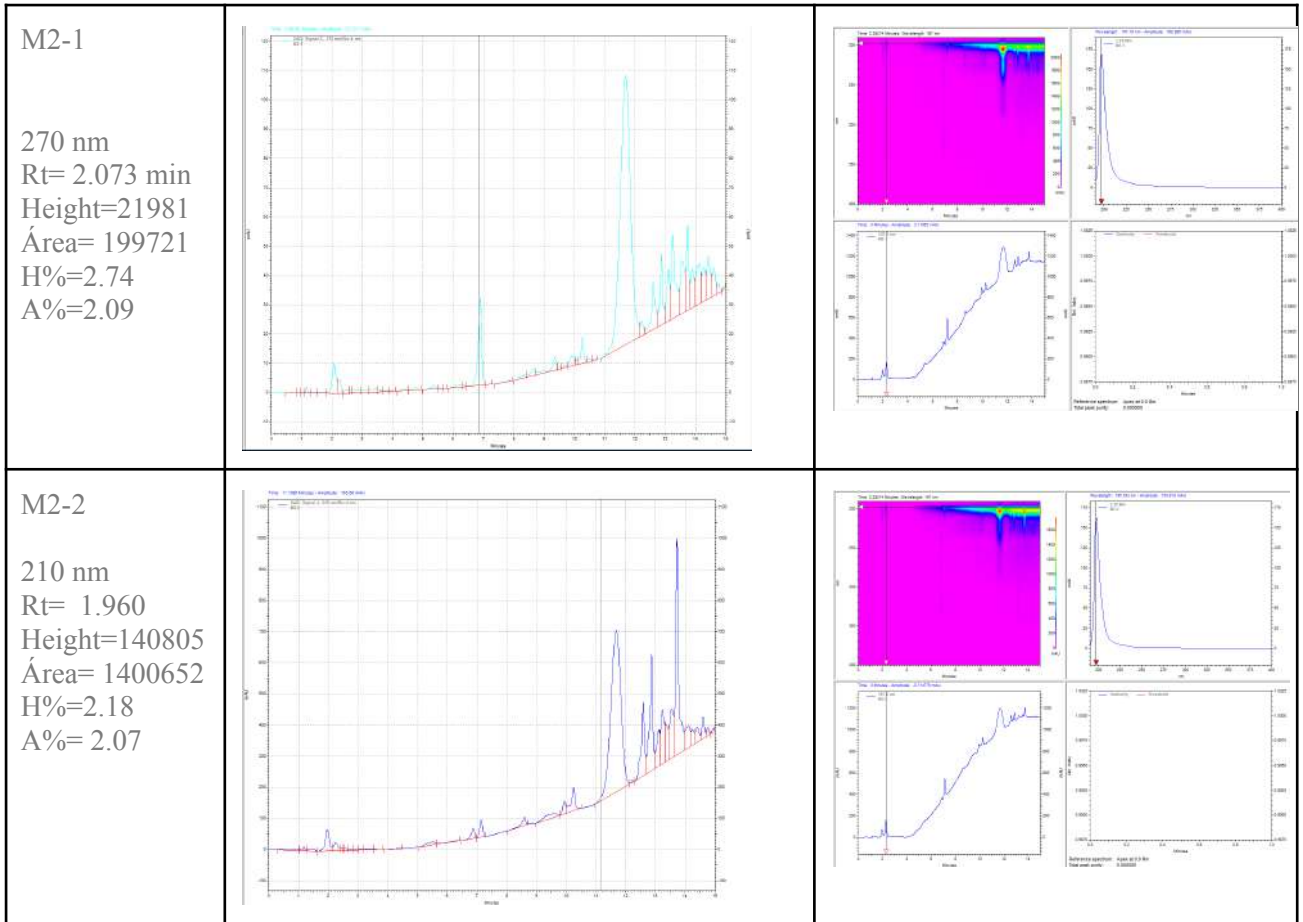
comparables a los tiempos de retención registrados por Yanes (2014) que van de los 2 min a los 6 min y con un pico cúspide a los 35 min, además, comparándolo con el estándar de referencia publicado por Gross y colab. (2007) los picos de M1-1 que van de 7 a 10 min son comparables a los picos correspondientes a los aminoácidos Treonina y Serina, en adición, lo primeros picos, que aparecen en el cromatograma podrían ser residuos de aspartato y asparagina (asx).

Las señales registradas en los cromatogramas a 210 nm, 254 nm, 270 nm y 380 nm son un claro indicio de la presencia de Orfamida A producida por *Pseudomonas protegens* (Yeong et al. 2013), así como la visualización de picos alrededor de los 206 nm, indican la presencia inequívoca de lipopéptidos producidos por la cepa de *Pseudomonas fluorescens*, familia a la que pertenece *P. protegens* (NCBI, 2022). Esto nos indica la presencia del Biosurfactante Orfamida A producido por la cepa *Pseudomonas protegens* pf-5 en las Muestra 1, del cultivo con diésel al 10%.

En la Tabla 16 se muestran los cromatogramas de la M2, en los cuales se obtienen resultados similares a los de la muestra 1, mismas que no se sometieron a un proceso de purificación, pues es notoria la presencia de picos a lo largo de cada cromatograma. No obstante, la concentración de analito es mucho mayor que la concentración en M1, dando picos con áreas y alturas mayores, caracterizándose también por sus picos con simetría Gaussiana.

Tabla 16. Resultados arrojados por el HPLC de los analitos M2 y sus residuos purificados.

Muestra	Cromatograma específico	Cromatograma espectro UV.
<p>M2</p> <p>270 nm</p> <p>Rt= 2.247 min</p> <p>Height=153565</p> <p>Área= 1755728</p> <p>H%= 20.06</p> <p>A%= 24.50</p> <p>Rt=2.847</p> <p>Height=9257</p> <p>Área=107917</p> <p>H%=1.21</p> <p>A%=1.51</p> <p>Rt= 3.407</p> <p>Height=9574</p> <p>Área= 112094</p> <p>H%=1.25</p> <p>A%= 1.56</p>		



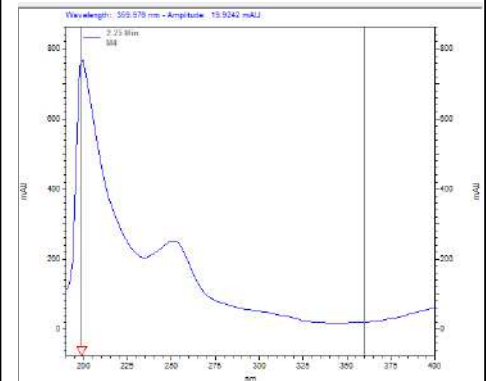
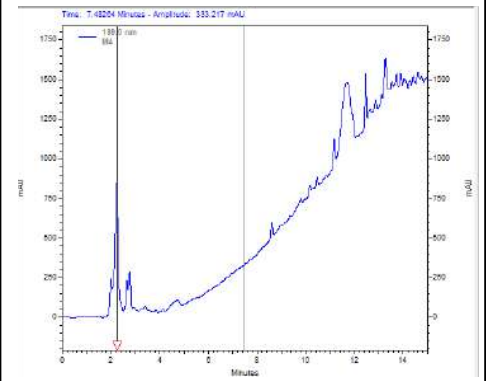
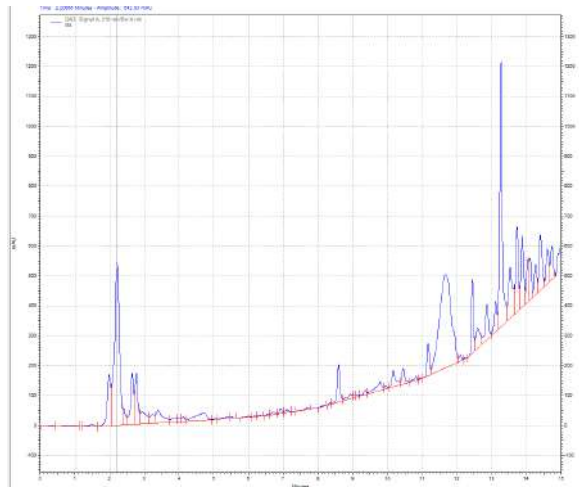
En cuanto a la M2-1 y la M2-2 se puede observar que esta última presenta un mayor grado de purificación y concentración que M2-1 con base en su área y su altura.

A continuación, se muestran en la Tabla 17. Los resultados de la separación por HPLC de la M4, M4-1 y M4-2 que se obtuvieron de los cultivos al 5% de diésel.

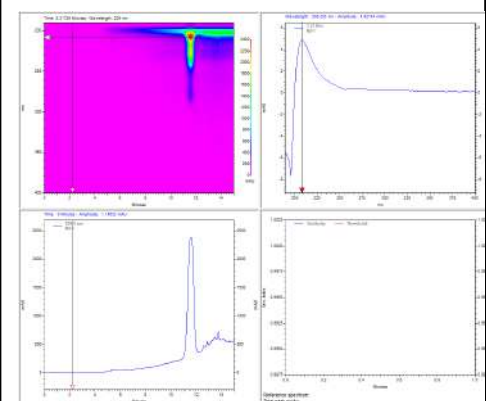
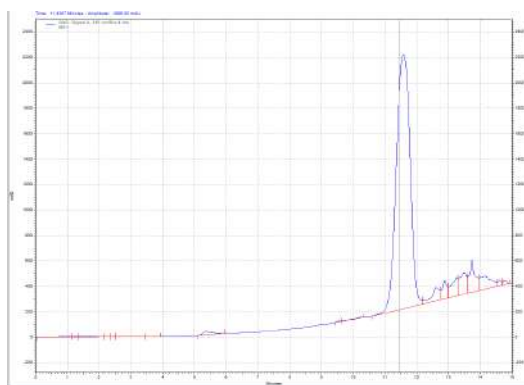
Tabla 17. Resultados arrojados por el HPLC de los analitos M4 y sus residuos purificados.

Muestra	Cromatograma específico	Cromatograma espectro UV.
<p>M4</p> <p>380 nm</p> <p>Rt= 713416                      Height= 75869                      Área= 39.61                      H%=27.93                      A%=75869</p> <p>Rt= 2.413                      Height= 26282                      Área= 120826</p>		

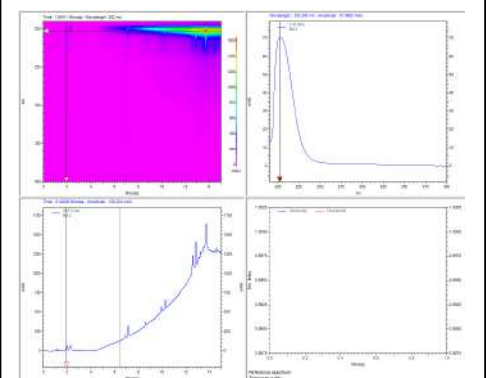
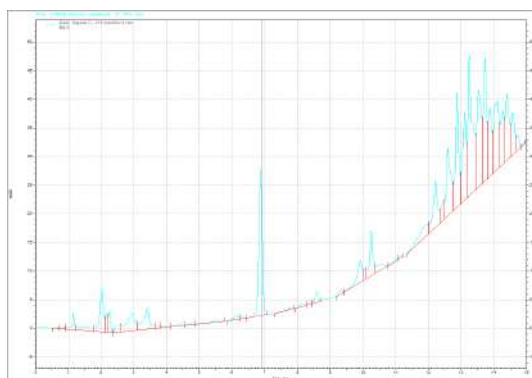
H%=9.67  
 A%= 6.71  
  
 Rt= 2.640  
 Height=89168  
 Área= 289734  
 H%=32.82  
 A%=16.08



M4-1  
  
 210 nm  
 Rt= 11.58  
 Height=  
 4186739  
 Área=  
 125572010  
 H%= 65.79  
 A%=79.50



M4-2  
  
 270 nm  
 Rt= 6.880  
 Height= 53652  
 Área= 377197  
 H%= 10.12  
 A%=8.5

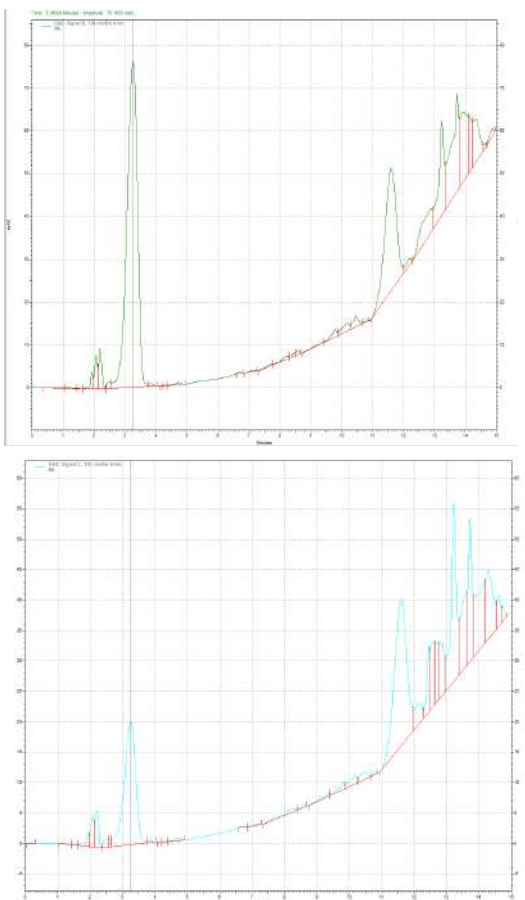
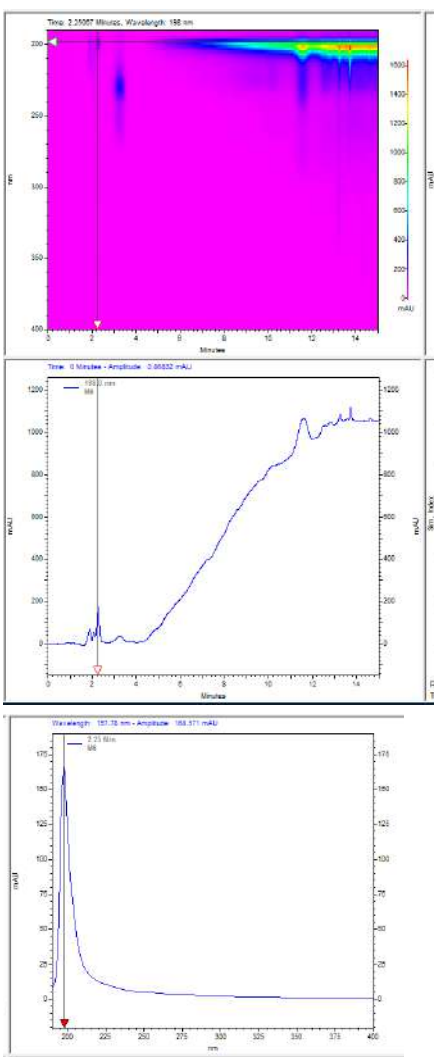


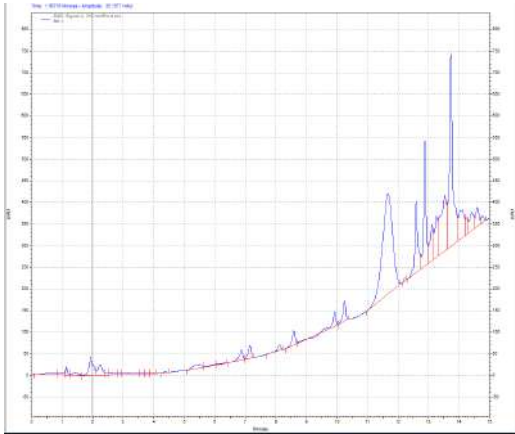
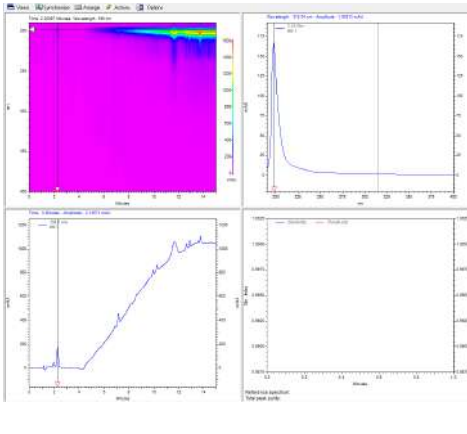
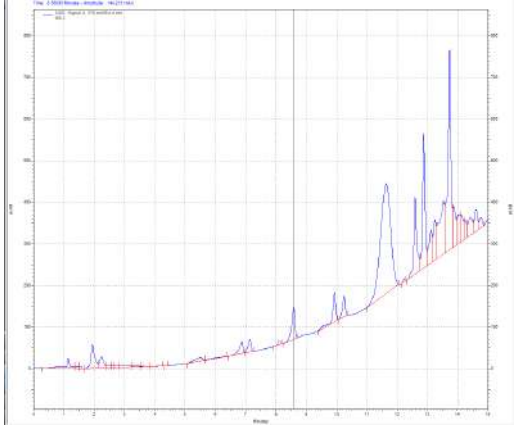
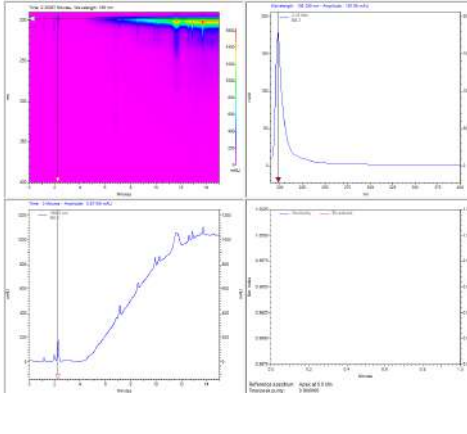
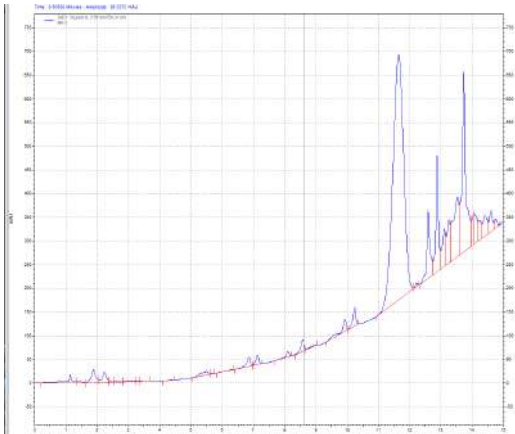
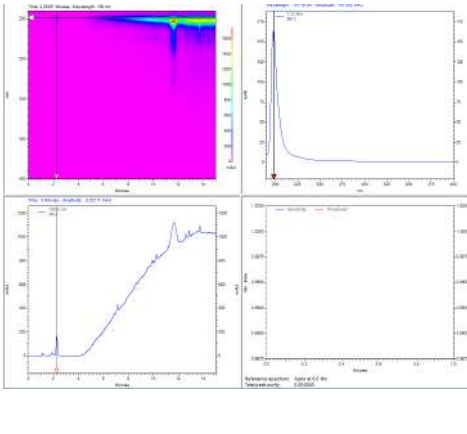



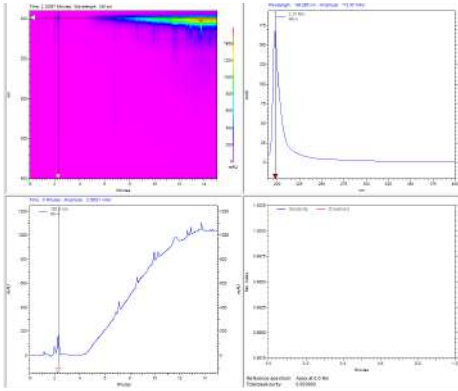

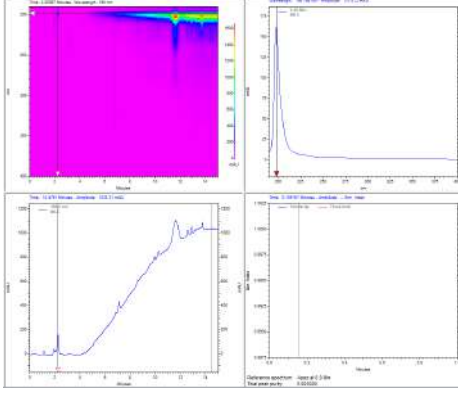
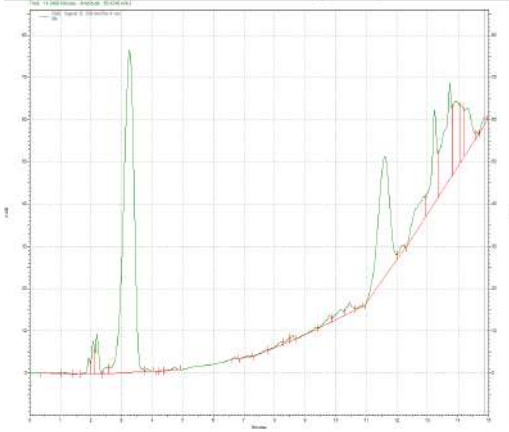
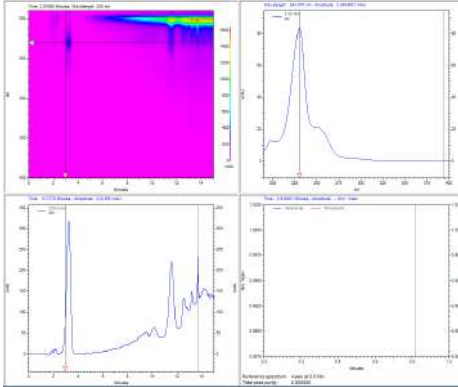
Por su parte M4-1 refleja alta pureza al mostrar solo un pico sobresaliente en el min 11.58 mismo que puede visualizarse en M2-1, a diferencia de esta anterior, el pico de M4-1 exhibe mayor pureza y área, por lo tanto, mayor concentración. De acuerdo con el estándar de orfamida A (Anexo 1.), este pico puede representar residuos de glutamina o ácido glutámico (glx).

Por último, se presentan los cromatogramas y datos arrojados para M6 (Tabla 18.) y sus correspondientes purificados. Como se observa en los cromatogramas de la muestra no pura (M6) el pico está rodeado por una serie de picos poco pronunciados, unos alejados y otros cerca de la línea base, y se confirma la presencia de varios compuestos en la muestra en el cromatograma de espectro UV, donde en la parte superior izquierda se encuentran 2 manchas una cerca de la otra. Al igual que en los últimos casos, los picos son claramente observables a las longitudes de onda 210 nm, 254, 270 y 380 antes mencionadas.

Tabla 18. Resultados arrojados por el HPLC de los analitos M6 y sus residuos purificados.

Muestra	Cromatograma específico	Cromatograma espectro UV.
<p>M6</p> <p>254 nm Rt= 3.260 Height=159921 Área= 3769788 H%= 32.55 A%= 42.73</p> <p>270 nm Rt= 2.213 Height= 12531 Área= 94211 H%= 2.92 A%= 1.57</p>		

<p>M6-1</p> <p>210 nm Rt= 1.940 Height= 88991 Área= 865262 H%= 2.15 A%= 2.11</p> <p>Rt= 2.233 Height= 52370 Área= 515633 H%= 1.26 A%= 1.26</p>		
<p>M6-2</p> <p>210 nm Rt= 1.940 min Height= 11.9888 Área= 1086399 H%=2.40 A%=2.40</p>		
<p>M6-3</p> <p>210 nm Rt= 1.887 Height= 58696 Área= 594338 H%= 1.34 A%= 1.13</p>		

<p>M6-4</p> <p>210 nm</p> <p>Rt= 1.953</p> <p>Height= 139477</p> <p>Área= 1284048</p> <p>H%= 2.98</p> <p>A%= 3.47</p>		
<p>M6-5</p> <p>254 nm</p> <p>Rt= 2.027</p> <p>Height= 10044</p> <p>Área= 110851</p> <p>H%= 1.82</p> <p>A%= 1.67</p> <p>Rt= 3.240</p> <p>Height= 13131</p> <p>Área= 388355</p> <p>H%= 2.38</p> <p>A%= 5.84</p>		
<p>M6-6</p> <p>254 nm</p> <p>Rt= 3.260</p> <p>Height= 159921</p> <p>Área= 3769788</p> <p>H%= 32.55</p> <p>A%= 42.73</p>		

Para M6-1, M6-2, M6-3 se registraron picos muy similares, resultados esperados ya que al realizar la purificación estas bandas se veían muy cerca de la otra y contaban con Rf no muy diferentes, sabiendo lo anterior, era posible que sin una purificación más rigurosa, estas bandas arrastraran

residuos una de la otra, a pesar de que la purificación para estas muestras resultara insuficiente, M6-3 refleja una mejor pureza entre estas tres, sin embargo, la concentración es pequeña como para hacer conclusiones debido a que su área puede verse afectada por el ruido de la línea base.

Por otra parte, se encuentran M6-4, M6-5 que, de acuerdo con los cromatogramas, presentan una mejor separación. En M6-4, a partir del minuto 6 se observa una serie de picos que se extienden hasta los 12 min, sugiriendo una pureza pobre para esta muestra, se considera que durante la purificación del analito M6-4 y M6-5, residuos de aminoácidos u otros metabolitos pudieron filtrarse en el proceso o incluso residuos de una muestra a otra.

Para finalizar la metodología con HPLC, se muestra el último analito M6-6, donde se obtiene la mejor pureza y concentración del grupo M6, el pico sobresale de entre todas las señales del cromatograma M6-6, a su costado se observan pequeñas señales que restan a su pureza, pero su separación y purificación, aun con lo anterior, son satisfactorias.

Esta información es indicativa de que las muestras obtenidas de los cultivos al 5% con diésel, al igual que las del 10%, contienen el biosurfactante objetivo y que, además, se logró una pureza alta para las muestras M1-2, M1-3, M4-1, una pureza media para las muestras M2-1, M6-6, mientras que para las demás muestras su purificación fue insuficiente por la cantidad de picos presentes en sus cromatogramas.

### Identificación IR

Se colocaron 20 microL de las muestras M1-1, M1-2, M2-1, M2-2, M4-1, M4-2, M6-2, M6-4 y una muestra de Metanol grado HPLC (Anexo 2.) en un espectro Agilent 630-IR, se obtuvieron espectros muy similares entre sí (Figura 10.) mismos que se compararon con un espectro de Orfamida B (Anexo 3.), obtenido de la base de datos de spectrabase.com. Las bandas más importantes que son comparables con el espectro de Orfamida B, fueron las bandas que se transmiten de 1540 a 1640 que corresponden a una flexión NH, la señal 1050-1100 corresponde al enlace C-O y C-N, mientras que anterior a las bandas en 1000  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a la huella digital del compuesto, mismos que son comparables con el espectro de Orfamida B, donde este último se diferencia únicamente en un solo aminoácido (Colabora, 2020; Zongwang, 2016).

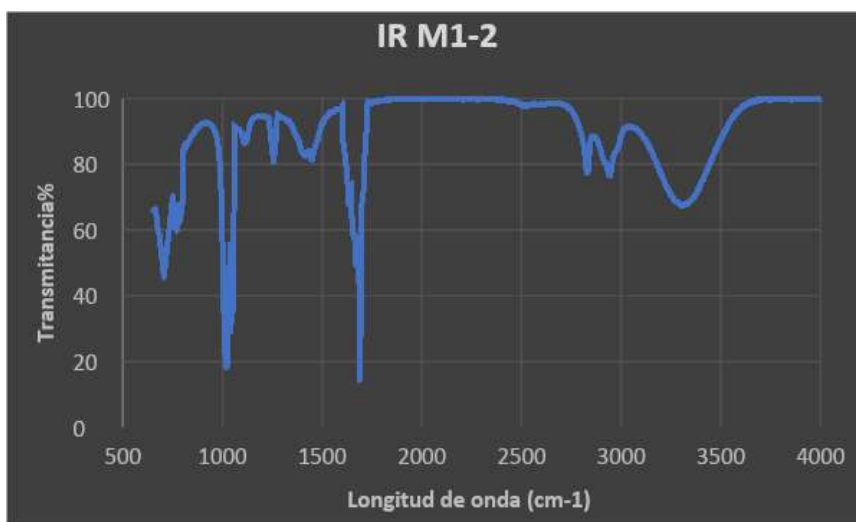


Figura 10. Espectro IR de M1-2

## Discusión

Durante la identificación de las cepas se encontró que la cepa 2-2 cumplía con todas las características señaladas por Ronnie (2017), donde la bacteria respondió muy bien a la concentración de diésel, pues se esperaba que al porvenir de un consorcio que se guardaba en ultracongelación, pudiera no degradar los hidrocarburos, así mismo, *Pseudomonas protegens* fue identificada por BLAST en un porcentaje de similitud de un 98.25% con características específicas como un crecimiento rápido de los 20 a los 25°C, lo que le confiere una gran capacidad de trabajar a temperatura ambiente reduciendo costos de muchos procesos que necesitan mayor cantidad de calor, y además, muchas otras ventajas que ya se mencionaron anteriormente; la biodegradabilidad, la biocompatibilidad etc., lo que supone un gran beneficio por encima de los biosurfactantes químicos, así como sus capacidades antimicrobianas lo que permite mejorar las propiedades de ciertas nanopartículas en la industria farmacéutica y cosmética (Vecino, 2018).

Por otra parte, los resultados de densidad de diésel, y de esterilización son comparables con García (2009) donde obtuvo 0.8504 g/ml en densidad, mientras que la esterilización de diésel con membrana 0.22 micras fue satisfactoria al igual que lo reporta Wuyang et al. (2018), sin embargo, la esterilización por membrana en nuestra investigación se realizó con trampa de vacío para obtener el diésel más rápida y eficazmente ya que se esterilizaron aproximadamente 500 ml para guardar en stock.

En cuanto a la cinética de crecimiento, la cinética del 5%, de acuerdo con X, el crecimiento fue alto ya que se obtuvo un rango de 0.61 a 0.80 (DO 600) para la degradación de hidrocarburos, mientras que la cinética del 10% se clasifica como un crecimiento excelente (0.81 a 1.0) resultados comparables con estos autores donde realizaron pruebas de degradación de hidrocarburos con *Pseudomonas*.

Tal como lo reportó Talaiekhosani (2015) mayores crecimientos para *Pseudomonas protegens*, además coincide con el crecimiento alto a los 25°C inducen un metabolismo diferencial que da como resultado una partición diferente de la energía de los nutrientes en el mantenimiento celular y la formación de biomasa. En tal caso, además del análisis que ya se describió anteriormente en los modelos matemáticos, se observa en los modelos matemáticos que la fase exponencial de la cinética con el 10% se extiende por más tiempo y con un crecimiento por encima de los comportamientos predictivos del modelo Logístico y de Gompertz, sin embargo al tener poca cantidad de datos y al no haber cambiado las condiciones de crecimiento con el fin de determinar su comportamiento bajo diferentes tratamientos, según Castro et al. (2018) el ajuste podría presentar dificultades.

Por otra parte, los resultados cuantitativos del cribado primario con E24% resultaron interesantes comparándolos con Wuyang (2018), pues muestra un comportamiento similar en la prueba de emulsificación con *Pseudomonas* spp. que presentó una fase exponencial larga y su capacidad de emulsificación permaneció estable durante la fase estacionaria, al igual que los resultados obtenidos en la presente investigación.

Así mismo, se registró en los cromatogramas arrojados por HPLC una rápida visualización de la elución de los productos purificados de acuerdo con las condiciones que propuso Jang et al. (2013), pese a realizarse en tiempos cortos (15 min), fue suficiente para comprobar la pureza de las muestras, de tal manera que los espectros IR sirven como mera comparación entre la transmitancia de las bandas y otras obtenidas bibliográficamente.

## CONCLUSIONES

Se alcanzaron los objetivos planteados desde el inicio de la investigación, pues se completó el estudio de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de la orfamida A, tanto de manera práctica como de manera bibliográfica, así mismo, se realizaron cada uno de los objetivos específicos empezando por el aislamiento y la purificación parcial del metabolito, además, la identificación de la naturaleza anfifílica fue evidente en todas y cada una de las pruebas que se realizaron durante la caracterización, por último, se determinaron las condiciones de cultivo más favorables para generar la mayor cantidad de surfactante, es decir, a las 251 h durante el crecimiento microbiano.

También, el metabolito presenta buenas capacidades biotensoactivas, de acuerdo con la prueba de E24, y con base en la bibliografía consultada. En adición, la cepa *Pseudomonas protegens*, o bien, la cepa nombrada 2-2, mostró un gran potencial para realizar un estudio robusto de los metabolitos, y de la bacteria en sí, al no poseer características patógenas su manipulación se llevó a cabo de manera sencilla.

Por último, en este estudio la producción de metabolitos secundarios no fue directamente proporcional a la biomasa, de modo que el crecimiento de la bacteria se veía totalmente influenciado al cambiar la concentración de diésel.

De esta manera, se concluye sugiriendo en próximas investigaciones el análisis estructural del metabolito y los genes asociados a las enzimas péptidosintasas no ribosómicas para dilucidar información más específica de la producción de biosurfactante.

## RESUMEN

La degradación del diésel es un proceso que puede ocurrir de forma natural por medio de la acción de las distintas rutas metabólicas de microorganismos que sobreviven en zonas contaminadas. La identificación de bacterias capaces de degradar derivados del petróleo, tal como el diésel, es una propuesta con un gran interés y aplicación en la actualidad. En el presente trabajo se estudió la capacidad de degradación del diésel por medio de la acción del biosurfactante Orfamida A producido por *Pseudomonas protegens*.

## Bibliografía

1. Aguilar A., Segovia V., García K., Herrera E. (2018). Evaluación de la producción de biosurfactante por *dietzi* sp. Revista latinoamericana el ambiente y las ciencias. Instituto Politécnico Nacional, México. Pp. 335- 348.
2. Akhbarizadeh,R.; Moore, F.; Keshavarzi, B.; Moeinpour, A.(2016). Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons risk assessment in coastal water and sediments of Khark Island, SW Iran. Bull. Pp. 33–45
3. Allen G. (1981). Chapter 5 Methods for the detection of peptides. Elsevier, Vol 09. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Pp 135-160. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0075-7535\(08\)70244-4](https://doi.org/10.1016/S0075-7535(08)70244-4)
4. Álvarez M. (2004). La industria de los surfactantes: Tendencias mundiales y perspectivas para Colombia. Palmas, Vol. 25. Universidad Industrial de Santander, Colombia. Pp. 340 – 352.
5. Amani, H., Haghghi, M., & Keshtkar, M. (2013). Production and Optimization of Microbial Surfactin by *Bacillus subtilis* for Ex Situ Enhanced Oil Recovery. Petroleum and Science Technology, Babol, Irán. Pp. 1249-1258. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10916466.2010.542416>
6. Aparicio J. (2001). Hidrología de la cuenca Lerma-Chapala. En : Hansen, AM & M. van Afferden. La Cuenca Lerma-Chapala: evaluación y manejo. Ed. Kluwer/Plenum. Londres. Pp. 3-31.
7. Bando Y., Hou Y., Seyfarth L., Probst J., Gotze S.,mARTA b., Hellmich A., Stallfoth P, Mittag M., Dieter H. (2022). Total synthesis and structure correction of the cyclic lipodepsipeptide orfamide A.Eropean Journal Chemistry, Vol 28. DOI: <https://doi.org/10.1002/chem.202104417>
8. Bojórquez R. (2010). Aislamiento e identificación de bacterias resistentes a sustancias tóxicas en sedimentos del Río Lerma. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias del Agua. UAEMex, Facultad de Ingeniería. Toluca, Edo. De México.
9. Bhuvaneswar C., Bhaskar B., Gunduluru S., Munichandra T. (2012). Effective Synergetic Biodegradation of diesel oil by Bacteria. International Journal of Environmental Biology. Division of molecular biology, India. DOI: [https://www.researchgate.net/publication/235898849\\_Effective\\_Synergetic\\_Biodegradation\\_of\\_Diesel\\_oil\\_by\\_Bacteria](https://www.researchgate.net/publication/235898849_Effective_Synergetic_Biodegradation_of_Diesel_oil_by_Bacteria)
10. Capdevielle F., Ottati C., Lopretti M. (2010). Bioinfo\_eXtrema: un enfoque bioinformático para integrar información ambiental, bioquímica y genómica, enfocado en bioprospección y selección de consorcios de microorganismos con aplicaciones en biorremediación. Revista del laboratorio tecnológico del Uruguay. No. 5. Unidad de Biotecnología. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA. Universidad de la República, Uruguay.
11. Carreño C., Zarzúa G., Fall C., Ávila P., Tejeda S. (2017). Evaluación de la toxicidad de los sedimentos del curso alto del Río Lerma, México. División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Toluca. Estado de México. DOI: <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.01.10>
12. Castro G. Valbuena E., Sánchez E., Briñez W., Vera H., Leal M. (2008). Comparación de modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Revista científica, . Vol. XVIII. Maracaibo, Venezuela. Pp. 582-588.

13. Cayman Chemical Company (2021). Product information Orfamide A. Cayman Chemical. [Sitio web]. Disponible en: <https://www.caymanchem.com/product/28131>
14. Chiappa X., Gallindo M., Cervates A. (2009). Introducción a los modelos matemáticos de crecimiento con aplicaciones en sistemas biológicos. Unidad Multidisciplinaria de docencia e investigación Sisal. UNAM. Yucatán. Pp. 69-93.
15. Clough E. (2020). The potential of Pseudomonas bacteria as biocontrol agents against multiple plant pathogens. University of York. Pp. 22-49.
16. Colabora (2020). Espectro infrarrojo, Capítulo II. Ciencia y educación sin fronteras. Ministerio de economía y competitividad, España. Pp. 19 – 26. Disponible en: <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/21684/Capitulo2.pdf>
17. Comisión del Agua del Estado de México (2020). Atlas de inundaciones. Secretaría de Desarrollo Urbano y Obra. Estado de México [Sitio web]. Disponible en: [https://caem.edomex.gob.mx/cuenca\\_del\\_rio\\_lerma](https://caem.edomex.gob.mx/cuenca_del_rio_lerma)
18. Comisión Nacional para el Uso Eficiente de la Energía (2022). Derivados del petróleo. Dirección de Movilidad y Transporte. Ciudad de México, México.
19. Diario Oficial de la Federación (1996). Declaratoria de clasificación del Río Lerma que establece su capacidad de asimilación y dilución, las metas de calidad del agua, los plazos para alcanzarlos y los parámetros que deberán considerarse para el cumplimiento de las descargas de aguas residuales. Secretaría de Gobernación [Sitio web]. Ciudad de México, México. Disponible en: [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4878064&fecha=01/04/1996](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4878064&fecha=01/04/1996)
20. Farah E., Zheng S., Sabri S., Gómez C., Zulkharman A., Aqlima S. (2021). Bioremediation of diesel contaminated Marine Water by Bacteria: A review and bibliometric Analysis. Journal of marine science and engineering. J. Mar. Sci. Eng. DOI: <https://doi.org/10.3390/jmse9020155>
21. Flores A. (2013). Análisis de la composición química del diésel y del biodiésel, y aplicación de técnicas multivariantes para determinar su origen. Tesis de grado. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. Pp. 20 – 24.
22. Fracchia L., Cavallo M., Martinotti M., Banat I. (2012). Biosurfactants and bioemulsifiers biomedical related applications present status and future potentials. Biomedical Science, Engineering and Technology. Universidad de Ulster, Irlanda. DOI: [10.5772/23821](https://doi.org/10.5772/23821)
23. Gallo G., Puopolo R., Carbonaro M., Maresca E., Florentino G. (2021). Extremophiles, a nifty tool to face environmental pollution from exploitation of metabolism to genoma engineering. Int. J. Environmental. Res. Public Health. Pp. 18. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph18105228>
24. Gobierno del Estado de México (2018). Comisión de la cuenca del Río Lerma. Estado de México [sitio web]. Disponible en: <http://cuencalerma.edomex.gob.mx/diagnostico>
25. Gómez A., Huamán L., Guzmán C., Meza D., Guerra C. (2000). Los hidrocarburos. Ministerio de educación, Universidad Peruana Cayetano Heredia. San Borja, Lima. Pp. 2 – 5.
26. Gross H., Virginia O. Stockwell, Marcella D. Henkels, Brian Nowak-Thompson, Joyce E. Loper, William H. Gerwick. (2007). The Genom isotopic Approach: A Systematic Method to Isolate Products of Orphan Biosynthetic Gene Clusters. Chemistry & Biology. Volume. Pp. 53-63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.11.007>.
27. Henkels M., Kidarsa T., Shaffer T., Goebel N., Burlinson P., Mavrodi D., Bentley M., Rangel L., Davis E., Tomashow L., Zabriskle T., Preston G., Loper J. (2014). Pseudomonas protegens Pf-5 causes discoloration and pitting of mushroom caps due to the production of antifungal



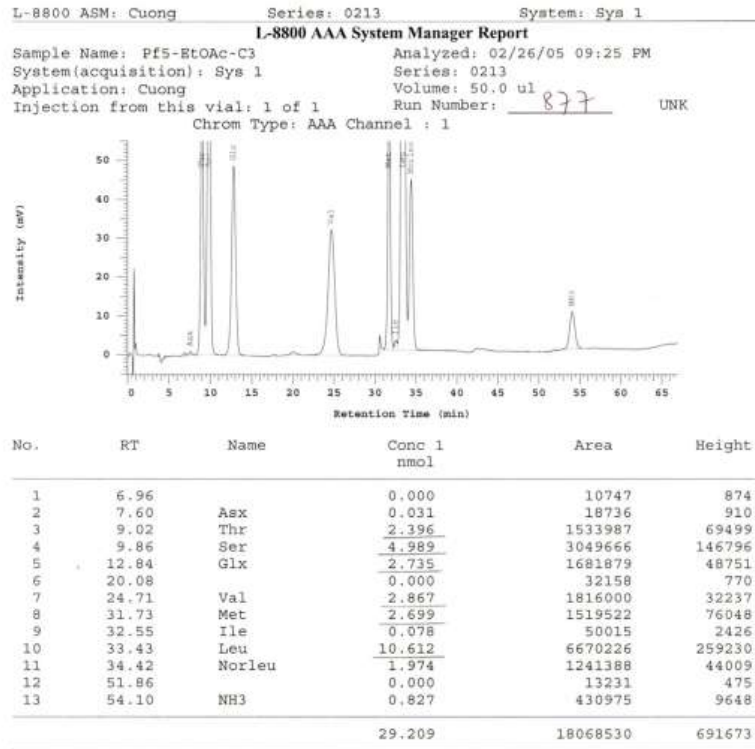
- metabolites. MPMI Vol. 2, No.7. Pp. 733 - 746 . DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-10-13-0311-R>
28. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (2009). Estrategia general para el rescate ambiental y sustentabilidad de la cuenca Lerma-Chapala. Informe final; Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Pp. 19 – 95.
  29. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2019). Cuenca Hidrológica Río Lerma 1: Humedales. Informe técnico, México.
  30. Jang Y., Ynahg Y., Kim C., Lee W., Park M., Kim J., Kim S. (2013). Identification of Orfamide A as a Insecticidal Metabolite Produced by *Pseudomonas protegens* F6. *Journal of Agricultural and food chemistry*. Vol 61. Chonnam National University, Gwangju, Corea del Sur. Pp. 6786-6791.
  31. Jousset A, Schuldes J, Keel C, Maurhofer M, Daniel R, Scheu S, Thuermer A. (2014). Full-genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas protegens* CHA0. *Genome Announc*. 2(2):e00322-14. doi:10.1128/genomeA.00322-14.
  32. Khalid F., Lim Z., Sabri S., Gómez C., Zulkharnian, Ahmand S. (2021). Biorremediation of diesel contaminated marine water by bacteria: a review and bibliometric analysis.
  33. Kayode T., Eniola K., Olayemi A., Igunnugbemi O. (2008). Response of resident bacteria of crude oil – polluted river to diesel oil. *American – Eurasian Journal of Agronomy*. Department of microbiology, University of Ilorin, Nigeria. Pp. 6 – 9.
  34. Khire, J. M. (2010). Bacterial surfactants and their role in Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). Ed R. Sen. *Biosurfactants. Advances in experimental medicine and biology series*. Pp. 146 – 157.
  35. King L., Roberts I., Tinel L., Carpenter L. (2019). The dtermination of surfactants at the sea surface. *Ocean sciencie*. Wolfson atmospheric chemistry laboratories, University of York. Reino Unido. Disponible en: <https://doi.org/10.5194/os-2019-87>
  36. Kumar A, Kumar S., Kant C., Verma H., Kumar D., Pratap P., Modi A., Droby S., Singh M., Alavilli H., Kant S., Dattatraya M., Ganesh R., Chung S., Kumar M. (2021). Microbial Biosurfactant: a new frontier for sustainable agriculture and pharmaceutical industries. *National Center for Biotechnology Information. PubMed Central*. DOI: [10.3390/antiox10091472](https://doi.org/10.3390/antiox10091472). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8469275/>
  37. Kunal D., Sergey S., Ibrahim K. (2021). New trends in bioremediation technologies toward environment-friendly society: A mini review. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. Vol. 9. DOI: 10.3389/fbioe.2021.666858 [Sitio web]: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2021.666858>
  38. Langille, M.G.I., Zaneveld, J., Caporaso, J.G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J.A., *et al.* (2013) Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol* 31. Pp. 814– 821.
  39. Litchfield C. (2005). Thirty Years and Counting: Bioremediation in Its Prime?, *BioScience*. American Institute of Biological Sciences, Vol.55 Número 3. Pp. 273–279, [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[0273:TYACBI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[0273:TYACBI]2.0.CO;2)
  40. López, Nancy I., & Raiger Iustman, Laura J. (2009). Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Química Viva*, 8(3),146-161.[fecha de Consulta 27 de Agosto de 2022]. ISSN: . Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86320633002>

41. Lorenzo G. (2016) Norma ASTM D86 o método de ensayo estándar para destilación de productos de petróleo a presión atmosférica. Destilación a fracciones de crudo de petróleo. [Sitio web] Disponible en: <https://www.scribd.com/doc/305970356/Norma-Astm-d86>
42. Madhumitha R., Eden S., Michell K., Witte B. (2013). Contaminants of emerging concern in water. Arroyo, Water Resources Research Center, The University of Arizona, Tucson. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10150/325905>
43. McKellar R., Xuewen L. (2004). Modelling microbial responses in food. CRC Series in Contemporary food science. Department of agriculture and agri-food, Government of Canada. Canada. Pp. 34-55.
44. Morais L., Grummt T., Heinze R., Sehr A., Skerswetat M., Rodrigues R., Canto M., Palma D., Marin M. (2011). Cytotoxicity of water – soluble fraction from biodiesel and its biodiesel blends to human cell lines. Elsevier and environmental safety. Biology Department, University Estadual Paulista (UNESP) Germany. Pp. 2148 – 2155.
45. Muthukumar M. (2022) Advances in bioremediation of nonaqueous phase liquid pollution in soil and water. Ed. Sunil Kumar, Muhammad Zaffar Hashmi. In Advances in Pollution Research, Biological Approaches to Controlling Pollutants, Woodhead Publishing. Pp. 191 – 231. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824316-9.00006-9>
46. National Center of Biotechnology Information (2022). Basic Local Alignment Search Tool. [Sitio web]: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
47. Nichols L. (2020). Visualizing TLC plates. Chemistry LibreTexts. Butte College. [Sitio web]. Disponible en: [https://chem.libretexts.org/Courses/SUNY\\_Oneonta/Chem\\_221%3A\\_Organic\\_Chemistry\\_I\\_\(Bennett\)/2%3ALab\\_Textbook\\_\(Nichols\)/02%3A\\_Chromatography/2.03%3A\\_Thin\\_Layer\\_Chromatography\\_\(TLC\)/2.3F%3A\\_Visualizing\\_TLC\\_Plates](https://chem.libretexts.org/Courses/SUNY_Oneonta/Chem_221%3A_Organic_Chemistry_I_(Bennett)/2%3ALab_Textbook_(Nichols)/02%3A_Chromatography/2.03%3A_Thin_Layer_Chromatography_(TLC)/2.3F%3A_Visualizing_TLC_Plates)
48. Oliart R., Manresa A., Sánchez M. (2014). Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. Instituto Tecnológico de Veracruz, Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos. Veracruz México.
49. Owsianiak M., Chrzanowski L., Szulc A., Staniewski J., Olszanowski A., Agnieszka K., Schmidt O., Heipieper H. (2008). Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect on the type of blends and the addition of biosurfactants. ELSEVIER. Bioresource Technology, Polonia. DOI: <https://www.caymanchem.com/product/28131>
50. PEMEX (2015). Hoja de datos de seguridad: Diésel. Núm. Versión 1.0. México.
51. Pitz W y Charles J. Recent progress in the development of diesel surrogate fuels, Progress in energy and combustion science. Pp. 1-21.
52. Raiger L., López N. (2009). Los biosurfactantes y la industria petrolera. Revista Química Viva, Vol. 8, Número 3. Universidad de Buenos Aires, Argentina. Pp. 146-161. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86320633002>
53. Refinería la Palmilla (2007). Ficha de datos de seguridad del Petróleo Diesel No. 2. Lima, Perú.
54. Ronnie G., Márquez O., Hernández A., de la Fe Y., Martínez B. (2017). Actividad antagónica de Pseudomonas spp. fluorescentes ante Alternaria solani Sorauer, patógeno de la papa (Solanum tuberosum L.) Rev. Protección Veg., Vol. 32, No 3. La Habana, Cuba. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522017000300002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522017000300002)

55. Sajna, K.V., Sukumaran, R.K., Gottumukkala, L.D., Pandey, A., Crude Oil Biodegradation Aided by Biosurfactants from *Pseudozyma* sp NII 08165 or Its Culture Broth, *Bioresource Technology* (2015), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.126>
56. Saransode D., Sangeeta S. (2018). Biosurfactant: classification, properties and recent application cosmetic. *Journal of Emerging Technologies and Innovation Research*, Volume 5, Maharashtra, India. Pp. 160-167.
57. Satpute, S. K., Zinjarde, S. S., & Banat, I. M. (2018). Recent updates on biosurfactants in the food industry. *Microbial Cell Factories*, 1-20.
58. Scientific Foundations of Bioremediation Current Status and Future Needs: This report is based on an American Academy of Microbiology colloquium held April 10-12, 1992 in Iowa City, Iowa. The colloquium was supported by the Department of Energy, the Environmental Protection Agency, and General Electric Corporation. Washington (DC): American Society for Microbiology; 1992. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK561280/> DOI: 10.1128/AAMCol.10Apr.1992
59. Secretaría de Energía (2003). Conceptos sobre hidrocarburos. República Argentina. Pp. 3 – 27.
60. Shamiyan R., Nirmal K., Nirmal R., Jingnasha P. (2015). Enzymatic Evaluation During Biodegradation of Kerosene and Diesel by Locally Isolated Fungi from Petroleum-Contaminated Soils of Westerns India. Taylor & Francis Group. India. Pp: 514-525.. DOI: 10.1080/15320383.2015.985783
61. Shih-Wen S., Cheng Y., Weng Y., Min C. (2006). Mejoras en la eficiencia del método de ninhidrina para cuantificación de aminoácidos. Elsevier. Departamento de ciencias de la alimentación, Universidad Nacional de Chiayi, China. Pp. 112-117. DOI:10.1016/j.jfca.2005.04.006
62. Singh P., Singh K., Singh R. Borthakur, Sughosh Madhav, Arif Ahamad, Ajay Kumar, Dan Bahadur Pal, Dhanesh Tiwary, P.K. Mishra. (2021). Bioremediation: a sustainable approach for management of environmental contaminants. Ed. Pardeep Singh, Ajay Kumar, Anwasha Borthakur, Abatement of Environmental Pollutants, Elsevier. Pp. 1 – 23. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818095-2.00001-1>.
63. Smith L. Bazin M., Prosser J. (2018). Physiological Models in Microbiology. CRC revivals. Volume II. Taylor & Francis Group. Pp. 25-75.
64. Talaiekhosani, A., Jafarzadeh, N., Fulazzaky, MA et al. (2015). Cinética de utilización de sustrato y crecimiento bacteriano del petróleo crudo degradado por *Pseudomonas aeruginosa* J Environ Health Sci Engineer 13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40201-015-0221-z>
65. Twigg M., Baccile N., Banath I., Déziel E., Manchant R., Roelants S., Van Bogaert I. (2021). Microbial Biosurfactant research: time to improve the rigour on the reporting synthesis, functional characterization and process development. *Microbial Biotechnology, Society for applied Microbiology*. Pp. 147-170. DOI: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13704>

66. Universidad Autónoma de Madrid (2007). Manual de prácticas de laboratorio. Página de Docencia Química Física Teórica. Departamento de Química Física teórica. [Sitio web]. Disponible en: <http://www.qfa.uam.es/>
67. Wuyang S., Wenrui Cao., Mingyu J., Gaowa S., Jiwei L., Jiangfei C., Imran A., Xinke Y., Changsheng P., Iffat N. (2018). Isolation and characterization of biosurfactant producing and diesel oil degrading *Pseudomonas* sp. CQ2 from Changqing oil field, China. Royal society of chemistry. China. Pp. 39710 – 39720. DOI: <https://doi.org/10.1039/C8RA07721E>
68. Xinni Xiong, Yuying Zhang, Lei Wang, Daniel C.W. Tsang. (2022). Overview of hazardous waste treatment and stabilization/solidification technology. Ed. W. Tsang, Lei Wang, Low Carbon Stabilization and Solidification of Hazardous Wastes. Elsevier Pp. 1-14. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824004-5.00031-1>.
69. Yanes L. (2014). Caracterización de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* promotora del crecimiento vegetal. Tesis de doctorado. Área de biología sub área de microbiología. Laboratorio de Ecología Microbiana, Uruguay. Pp. 62 - 91, 122 - 130.
70. Yu F., Jing X., Li X., Wang H., Chen H., Lin Z., Yin J., Pan D., Yin Y., Fu J., Xia L., Bian X., Tu Q., Zhang Y. (2019). Recombineering *Pseudomonas protegens* CHAO: An innovative approach that improves nitrogen fixation with impressive bactericidal potency. Elsevier, Microbial Research. Shandong Republic of China. Pp. 58 - 65. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.09.009>
71. Zarazúa G., Ávila-Pérez P., Tejeda S., Valdivia-Barrientos M., Zepeda-Gómez C. y Macedo-Miranda G. (2013). Evaluación de los metales pesados Cr, Mn, Fe, Cu, Zn y Pb en sombrerillo de agua (*Hydrocotyle ranunculoides*) del curso alto del río Lerma, México. Rev. Int. Contam. Pp. 217-24.
72. Zongwang M., Geudens N., Kieu N., Sinnaeve D., Ongena M., Martins J., Hofte M. (2016). Biosynthesis, chemical structure and structure activity relationship of orfamide lipopeptides produced by *Pseudomonas protegens* and related species. Frontiers. Microbial Research, Frontiers. Sec, PLnat Pathogens Interactions. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00382>

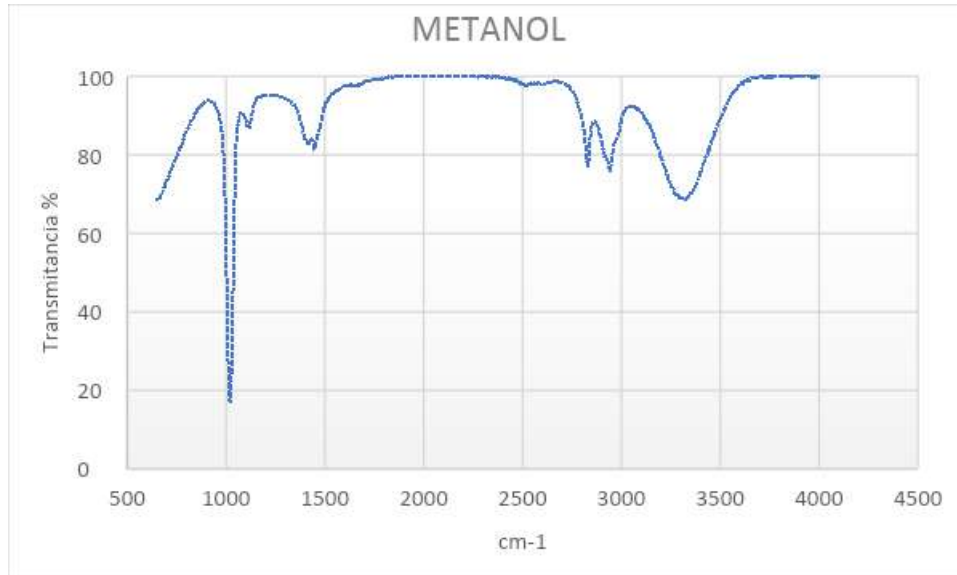
ANEXO



Peak rejection level: 10000

*PKO (-)*

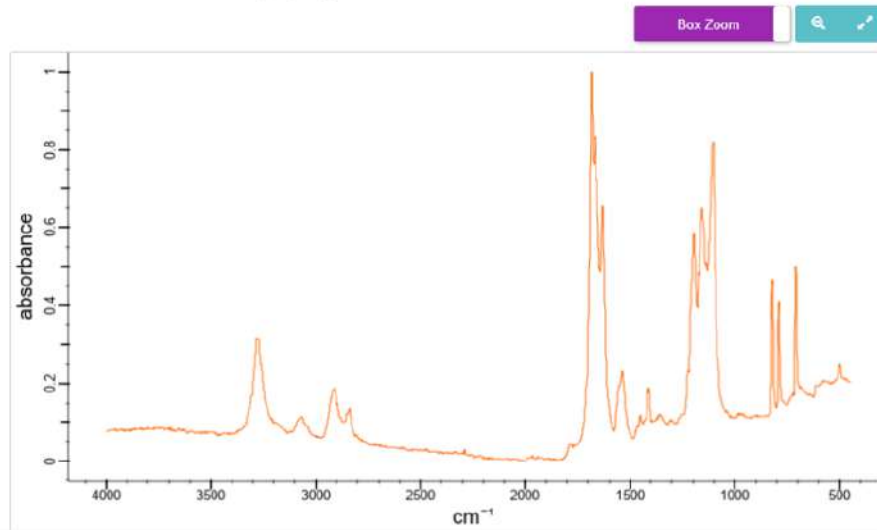
Anexo 1. Picos característicos de orfamida A arrojados por HPLC.



Anexo 2. Espectro IR del metanol grado HPLC.

## ORFAMIDA B

Transmission Infrared (IR) Spectrum



Anexo 3. Espectro IR de orfamida B en absorbancia.