



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**CENTRO DE INVESTIGACION DE BIOTECNOLOGÍA
APLICADA**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA RELACIÓN
CARBONO:NITRÓGENO Y CONCENTRACIÓN DE
SÓLIDOS TOTALES EN LA PRODUCCIÓN DE
SURFACTINA A PARTIR DE *Bacillus subtilis*”**

VERONICA ZARATE ZAPATA

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA**

DIRECTORES:

**DR. VICTOR ERIC LÓPEZ Y LÓPEZ
DR. JORGE NOEL GRACIDA RODRIGUEZ**

TEPETITLA DE LARDIZABAL, TLAXCALA

ENERO 2017

COMITÉ TUTORIAL:

Dra. María del Carmen Cruz López (CIBA-IPN)

Dra. Silvia Luna Suárez (CIBA-IPN)

Dr. Mario Alberto Martínez Núñez (PCyTY-UNAM)

Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez (UAQ)

Dr. Víctor Eric López y López (CIBA-IPN)



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tlaxcala siendo las 12 horas del día 29 del mes de Noviembre del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-IPN para examinar la tesis titulada:

Evaluación del efecto de la relación carbono:nitrógeno y concentración de sólidos totales en la producción de surfactina a partir de Bacillus subtilis

Presentada por el alumno:

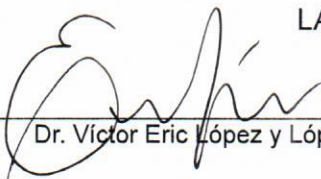
<u> ZÁRATE </u> Apellido paterno	<u> ZAPATA </u> Apellido materno	<u> VERÓNICA </u> Nombre(s)
		Con registro: B 1 4 0 0 9 3


aspirante de:


 MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


LA COMISIÓN REVISORA


_____ Dr. Víctor Eric López y López

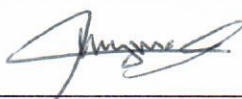

_____ Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez


_____ Dra. María del Carmen Cruz López


_____ Dr. Silvia Luna Suárez


_____ Dr. Mario Alberto Martínez Núñez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


_____ Dra. María Myrna Solís Oba



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada
Unidad Tlaxcala
Dirección



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizábal el día 16 del mes Diciembre del año 2016 el (la) que suscribe Verónica Zárate Zapata alumno (a) del Programa de Maestría en Biotecnología Aplicada con número de registro B140093, adscrito a CIBA-IPN-TLAXCALA, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Victor Eric López y López y cede los derechos del trabajo intitulado Evaluación del efecto de la relación carbono:nitrógeno y concentración de sólidos totales en la producción de surfactina a partir de *Bacillus subtilis*, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección veronicazaratez@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Verónica Zárate Zapata

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por guiarme en mi camino, darme a mi hermosa familia y permitirme conocer a gente maravillosa en mi vida.

A mis padres y hermano que sin ustedes mi vida no estaría completa.

A Carlos Manuel Morales Vazquez por todo tu apoyo y cariño. Te quiero BICHO.

A todos esos nuevos amigos que me recibieron y me dieron su apoyo durante mi estancia en esta maestría. Aide, Ana Luisa, Ana Nava, Adrian, Carlos, Ángel, Alberto y todos mis demás compañeros.

Al Dr. Victor Eric López y López por darme la oportunidad de aprender con él y tenerme mucha paciencia para lograr este trabajo.

Al Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez por su gran apoyo en la realización de este proyecto.

A la Dra. Carmen, Dra. Silvia, Dra. Fabiola, Dr. Mario Alberto, Dr. Abdu, Dr. Francisco y todos los doctores del CIBA por todo su apoyo en la maestría.

A todo el personal del CIBA desde vigilancia, limpieza y seguridad canina, además de todo aquel que se apiado en darnos aventón.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría.

Al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo otorgado en los proyectos SIP.

A la institución CIBA-IPN por permitirme desarrollar mi proyecto de maestría y apoyarme en mi desarrollo profesional.

“La ciencia no suprime nada, sino que busca las cosas que no comprende y las mira cara a cara, sin titubearse. Negar los hechos no los suprime, como cerrar los ojos”

– Tristán Bernard

“Apunta hacia la luna. Si fallas, al menos estarás entre las estrellas.”

–Les Brown

El presente trabajo se llevó a efecto en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de los Dres: Jorge Noel Gracida Rodríguez y Víctor Eric López y López.

INDICE

RESUMEN	13
SUMMARY	14
I. INTRODUCCIÓN	15
II. ANTECEDENTES	20
II. 1. BIOSURFACTANTES	20
II. 1. 1. APLICACIONES POTENCIALES DE LOS BIOSURFACTANTES	21
II. 1. 2. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS BIOSURFACTANTES.....	22
II. 1. 3. LIPOPÉPTIDOS.....	23
II.2. GÉNERO <i>BACILLUS</i>	24
II.2.1 <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	26
II. 2. 2. SURFACTINA.....	27
II. 2. 2. 1. PROPIEDADES FUNCIONALES Y TOXICOLÓGICAS DE LA SURFACTINA.....	29
II. 2. 2. 2. CONTROL GENÉTICO EN LA SÍNTESIS DE SURFACTINA	30
II. 2. 2. 3. PRODUCCIÓN DE SURFACTINA A NIVEL INDUSTRIAL	34
III. JUSTIFICACIÓN	37
IV. OBJETIVOS	38
OBJETIVO GENERAL	38
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
V. MATERIALES Y MÉTODOS	39
V. 1. MICROORGANISMOS	39
V. 1. 1. INÓCULO	39
V. 2. MEDIOS DE CULTIVO	40
V. 3. FERMENTACIONES	41
V. 4. MÉTODOS ANÁLITICOS	41
V. 4. 1. CONTEO CELULAR.....	41
V. 4. 2. VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO (M)	41
V. 4. 3. PRUEBA DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y SURFACTANTE	42
V. 4. 4. ACTIVIDAD SUPERFICIAL (COLAPSO POR GOTA).....	42
V. 4. 5. TENSIÓN SUPERFICIAL	43
V. 4. 6. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE EMULSIFICACIÓN (E_{24}).....	44
V. 4. 7. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE SURFACTINA POR HPLC.....	44
V. 4. 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
VI. 1 PRUEBAS PRELIMINARES DE LA CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE SURFACTINA ..	46
VI. 2. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>BACILLUS SUBTILIS</i> AQ	52
VI. 3. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO CON DIFERENTES RELACIONES DE C:N Y CST CON <i>BACILLUS SUBTILIS</i> AQ A NIVEL MATRAZ.....	58
VI. 3.1 CINÉTICAS CON MEDIO KSAH	58
VI. 3. 1. 1 MEDIO KSAH CON RELACIÓN C:N 11	58
VI. 3. 1. 2 MEDIO KSAH CON RELACIÓN C:N 15	60
VI. 3. 1. 3 MEDIO KSAH CON RELACIÓN C:N 20	63
VI. 3. 1. 4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS TRATAMIENTOS DE KSAH	65
VI. 3. 2 CINÉTICAS CON MEDIO LANDY	66
VI. 3. 2. 1 MEDIO LANDY CON RELACIÓN C:N 11	66
VI. 3. 2. 2 MEDIO LANDY CON RELACIÓN C:N 15	68
VI. 3. 2. 3 MEDIO LANDY CON RELACIÓN C:N 20	70
VI. 3. 2. 4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS TRATAMIENTOS DE LANDY	72
VI. 3. 3 FERMENTACIÓN CON MEDIO LANDY C:N 11, CST 100% , <i>BACILLUS SUBTILIS</i> AQ CON ACEITE DE OLIVA COMO FUENTE DE CARBONO.....	76

VI. 3. 4 PRUEBA E24	78
VI. 4. PRUEBAS DE FERMENTACION A NIVEL REACTOR	80
VI. 4. 1. FERMENTACIONES CON MEDIO KSAH	80
VI. 4. 1. 1 MEDIO KSAH A RELACIÓN C:N 11 Y CST 33.3 %	81
VI. 4. 1. 2 MEDIO KSAH A RELACIÓN C:N 11 Y CST DE 150%	82
VI. 4. 2. FERMENTACIONES CON MEDIO LANDY	83
VI. 4. 2. 1 MEDIO LANDY A RELACIÓN C:N 11 Y CST DE 100%	83
VI. 4. 2. 2 MEDIO LANDY A RELACIÓN C:N 11 Y CST DE 150%	83
VI. 4. 3 MEDIO KSAH A RELACIÓN C:N 11 Y CST DE 33.3% SIN PEPTONA DE SOYA NI EXTRACTO DE LEVADURA	84
VI. 5 PRUEBAS DE HPLC.....	87
VII. CONCLUSIONES	91
VIII. RECOMENDACIONES.....	92
IX. BIBLIOGRAFIA.....	93
X. ANEXOS	96
ANEXO 1.....	96
ANEXO 2.....	98
ANEXO 3.....	100
ANEXO 4.....	107

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación entre diferentes formas moleculares de surfactantes.....	16
Figura 2. Diferentes isoformas de los surfactantes.....	16
Figura 3. Efecto de la tensión superficial sobre la capilaridad.....	17
Figura 4. Intervalos de diferentes valores de HLB y sus aplicaciones.....	18
Figura 5. Biosurfactantes producidos por <i>Bacillus subtilis</i>	26
Figura 6. Estructura de la principal isoforma de la surfactina.....	28
Figura 7. Estructura de surfactina A, B, C y D de <i>Bacillus subtilis</i>	28
Figura 8. Activación de los genes en la producción de surfactina.....	31
Figura 9. Organización general de los NRPS. Mecanismo de la producción de surfactina.....	31
Figura 10. Diseño modular del sistema NRPS.....	32
Figura 11. Mecanismo de activación de un ácido graso.....	33
Figura 12. Integración de la cadena de ácido graso al sistema NRPS.....	34
Figura 13. Asignación arbitraria de actividad superficial ajustando valores por tiempos de colapso en segundos.....	43
Figura 14. Técnica de capilaridad para calcular la tensión superficial.....	44
Figura 15. Diferentes morfologías coloniales de cepas del género <i>Bacillus</i> sp.....	46
Figura 16. Muestras de tinción de Gram y examen en fresco de las diferentes especies de <i>Bacillus</i>	46
Figura 17. Presencia de hemólisis en las cepas CDBB39, CDBB555, TA y AQ sembradas en Caldo Nutritivo a pH de 6.86.....	48
Figura 18. Cinética de germinación de las diferentes cepas de <i>Bacillus subtilis</i> AQ, CDBB555, TA y CDBB39.....	49
Figura 19. Prueba de colapso de gota.....	49
Figura 20. Evaluación de hemólisis en agar sangre carnero de las diferentes cepas bacterianas evaluadas cada hora provenientes de la cinética de matraz en Caldo Nutritivo.....	51
Figura 21. Cinética de crecimiento <i>Bacillus subtilis</i> AQ en Caldo Nutritivo, Landy y KSAH.....	52
Figura 22. Evaluación de hemólisis en agar sangre carnero de la cepa <i>Bacillus subtilis</i> AQ proveniente de diferentes medios de crecimiento.....	53
Figura 23. Comparativo de las actividades superficiales provocadas por <i>Bacillus subtilis</i> AQ en Caldo Nutritivo, KSAH y medio.....	55
Figura 24. Pruebas de inhibición por inoculación directa contra diferentes microorganismos.....	55
Figura 25. Inhibición de las cepas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Phyturn</i> sp. y <i>Fusarium</i> sp. causada por la cepa <i>Bacillus subtilis</i> AQ provenientes de Caldo Nutritivo, medio KSAH y medio Landy.....	56
Figura 26. Prueba de inhibición por inoculación con discos de papel contra <i>S. cerevisiae</i> utilizando el medio KSAH.....	57
Figura 27. Cinética de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en KSAH a C:N 11.....	59
Figura 28. Actividad superficial de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en KSAH a C:N 11 con la técnica de colapso por gota.....	59
Figura 29. Tensión superficial de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en KSAH a C: N 11 por la técnica de capilaridad.....	60
Figura 30. Cinética de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en KSAH a C: N 15.....	61
Figura 31. Cinética de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en KSAH a C: N 15 con CST a 100 y 33.3 %.....	61
Figura 32. Actividad superficial de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en KSAH a C: N 15 con la técnica de colapso por gota.....	62
Figura 33. Tensión superficial de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en KSAH a C: N 15 por la técnica de capilaridad.....	62
Figura 34. Cinética de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en KSAH a C:N 20.....	63
Figura 35. Cinética de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en KSAH a C:N 20 a CST 100 y 50%.....	64
Figura 36. Actividad superficial de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en KSAH a C:N 20 con la técnica de colapso por gota.....	64
Figura 37. Tensión superficial de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en KSAH a C:N 20 por la técnica de capilaridad.....	65
Figura 38. Cinética de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en Landy a C:N 11.....	67
Figura 39. Actividad superficial de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en Landy a C:N 11 con colapso por gota.....	67

Figura 40. Tensión superficial de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en Landy a C:N 11 por la técnica de capilaridad.....	68
Figura 41. Cinética de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en Landy a C:N 15.	69
Figura 42. Actividad superficial de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en Landy a C:N 15 con la técnica de colapso por gota.	69
Figura 43. Tensión superficial de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en Landy a C:N 15 por la técnica de capilaridad.....	70
Figura 44. Cinética de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en Landy a C:N 15.	71
Figura 45. Actividad superficial de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en Landy a C:N 15 con la técnica de colapso por gota.	71
Figura 46. Tensión superficial de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en Landy a C:N 15 por la técnica de capilaridad.....	71
Figura 47. Cinética de crecimiento, actividad superficial y tensión superficial de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en medio Landy C:N 11 CST 100% con aceite de oliva como fuente de carbono.	76
Figura 48. Cinéticas de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en medio Landy.....	77
Figura 49. Actividad superficial de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en medio Landy	77
Figura 50. Tensión superficial de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en medio Landy	78
Figura 51. Prueba E ₂₄	79
Figura 52. Fermentación de medio KSAH a C:N 11 y CST 100%.....	80
Figura 53. Fermentación de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en medio KSAH a C:N 11 y CST 33.3 %.	81
Figura 54. Tensiómetro de precisión con anillo de DuNouy.	82
Figura 55. Fermentación de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en medio KSAH a C:N 11 y CST 150 %.	82
Figura 56. Fermentación de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en medio Landy a C:N 11 y CST 100%.	83
Figura 57. Fermentación de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en medio Landy a C:N 11 y CST 150%.	84
Figura 58. Fermentación de <i>Bacillus subtilis</i> AQ en medio KSAH a C:N 11, CST 33.3% sin peptona de soya ni extracto de levadura.....	84
Figura 59. Estándar de surfactina a 205.4 nm.	87
Figura 60. Cromatogramas de muestras de medio KSAH a C:N 11 y CST 33.3%.....	88
Figura 61. Cromatogramas de muestras de medio KSAH a C:N 11 y CST 150%.....	88
Figura 62. Cromatogramas de muestras de medio Landy a C: N 11 y CST 100%.....	89
Figura 63. Cromatogramas de muestras de medio Landy a C:N 11 y CST 150%.....	89
Figura 64. Cromatogramas de muestras de medio KSAH a C: N 11 y CST 33.3% sin peptona de soya ni extracto de levadura.....	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales microorganismos productores de biosurfactantes de aislamientos ambientales	21
Tabla 2. Aplicaciones industriales potenciales de los biosurfactantes.....	22
Tabla 3. Estructura primaria de lipopéptidos del género <i>Bacillus</i>	25
Tabla 4. Producción industrial de surfactina por <i>Bacillus subtilis</i>	35
Tabla 5. Cepas utilizadas de <i>Bacillus subtilis</i>	39
Tabla 6. Medio KSAH	40
Tabla 7. Medio Landy.....	40
Tabla 8. Resultados de la caracterización de las cepas cultivadas en Caldo Nutritivo a pH 6.86. .	47
Tabla 9. Resultados de la cinética de germinación de las cepas de <i>B. subtilis</i> CDBB39, CDBB555, TA y AQ en Caldo Nutritivo a pH de 7.2.....	50
Tabla 10. Relación de las diferentes variaciones de CST del medio KSAH a C:N 11	58
Tabla 11. Relación de las diferentes variaciones de CST del medio KSAH a C:N 15	61
Tabla 12. Relación de las diferentes variaciones de CST del medio KSAH a C:N 20	63
Tabla 13. Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TensionS.....	65
Tabla 14. Resumen de la comparación de medias de Tukey de los valores de tensión superficial de los tratamientos de KSAH a las diferentes CST en fase exponencial.	66
Tabla 15. Relación de las diferentes variaciones de CST del medio Landy a C:N 11	67
Tabla 16. Relación de las diferentes variaciones de CST del medio Landy a C:N 15	68
Tabla 17. Relación de las diferentes variaciones de CST del medio Landy a C:N 20	70
Tabla 18. Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TensionS.....	72
Tabla 19. Resumen de la comparación de medias de Tukey de los valores de tensión superficial de los tratamientos de Landy a las diferentes CST en fase exponencial.	72
Tabla 20. Comparación de los parámetros usados en <i>Bacillus subtilis</i> AQ a diferentes relaciones de C:N y CST a nivel matraz.	74
Tabla 21. Relación de las diferentes variaciones de CST del medio Landy a C:N 11 CST 100% con aceite de oliva como fuente de carbono.....	76
Tabla 22. Comparación de los parámetros usados en <i>Bacillus subtilis</i> AQ a diferentes relaciones de C:N y CST a nivel matraz y fermentador.....	86

RESUMEN

En respuesta al aumento de la contaminación a nivel mundial se han buscado alternativas más favorables para el medio ambiente, una de estas es el uso de biosurfactantes los cuales tienen propiedades anfílicas que son usadas por diversas industrias. La bacteria *Bacillus subtilis* tiene la capacidad de producir estos compuestos y en especial surfactina, conocido como uno de los mejores biosurfactantes por sus diversas propiedades debido a su composición química. Se han buscado diversos métodos para aumentar la producción de este biosurfactante, que incluyen bacterias modificadas, mejoramiento de medios, uso de diferentes fuentes de carbono, recolección de espuma, etc. Por lo que en este trabajo se usaron diversas estrategias para aumentar la fase de crecimiento exponencial de *Bacillus subtilis* AQ y ver su comportamiento con los medios KSAH y Landy a relaciones de C:N de 11,15 y 20 y concentraciones de sólidos totales (CST) de 33.3, 50 y 100 % a nivel matraz obteniendo que los mejores medios fueron los medios KSAH C:N 11 CST 33.3% y Landy C:N 11 CST 100%. A partir de estos se hicieron pruebas en el fermentador aumentando las CST a 150% obteniendo que el mejor medio fue el KSAH C:N 11 CST 33.3% en un análisis de HPLC, sin embargo al realizar un experimento alternativo con este medio sin peptona de soya ni extracto de levadura se encontró que se mejoraba su producción al realizar análisis sobre la espuma obtenida.

SUMMARY

In response to increased pollution worldwide, it was necessary to design more favorable alternatives for the environment, one of these is the use of biosurfactants which have amphiphilic properties that are used by various industries. The bacterium *Bacillus subtilis* has the capacity to produce these compounds and especially the one of surfactin that is known like one of the best biosurfactants by its diverse properties due to its structure. Various methods have been sought to increase the production of this biosurfactant including modified bacteria, media enhancement, use of different carbon sources, foam collection, etc. Therefore, in this work we looked for several strategies to increase the exponential growth phase of *Bacillus subtilis strain AQ* and to see its behavior with KSAH and Landy media at C:N ratios of 11, 15 and 20 and total solids concentrations (CST) of 33.3, 50 and 100% at flask level. The best media were KSAH media C:N 11 CST 33.3% and Landy C: N 11 CST 100%. From these were tested in the fermented increased the CST to 150% obtaining that the best medium was the KSAH C:N 11 CST 33.3% in an HPLC analysis, however when performing an alternative experiment with this medium without soy peptone and yeast extract, it was found that their production was improved.

I. INTRODUCCIÓN

Desde que el hombre apareció siempre se ha preguntado la forma de hacer su vida más fácil, por lo que inició una búsqueda incansable de información sobre cómo podría emplear los recursos que le brindaba la naturaleza. Al principio sólo se enfocó en el uso de plantas, animales y minerales pero luego se encaminó al estudio de los microorganismos, debido a que conferían una nueva ventana de posibilidades en la creación de productos para su beneficio.

Gracias a esta búsqueda, se encontró que existían sustancias que podían ser utilizadas para diversos fines, tal es el caso de los surfactantes, palabra derivada de la expresión *surface active agents* (agentes de superficie activa), los cuales son compuestos anfipáticos con la capacidad de interactuar con sustancias hidrofóbicas e hidrofílicas provocando una disminución de su tensión superficial e interfacial. Estas sustancias se clasifican de diferentes formas, según su composición química pueden ser aniónicas, catiónicas, anfotéricas y no iónicas; por su peso molecular de alto y bajo; y por su forma de producción en sintéticos y biosurfactantes. La diferencia entre estos últimos radica en su forma de obtención, pues mientras los surfactantes sintéticos se producen a nivel laboratorio, los biosurfactantes son sintetizados por procesos biológicos de bacterias, hongos, levaduras y plantas, causándoles a su vez importantes inconvenientes ya que mientras algunos de los surfactantes sintéticos presentan toxicidad ambiental, los biosurfactantes son más amigables con el ambiente pero con rendimientos de producción bajos (Al-Araji *et al.* 2007, Pornsunthorntaweew *et al.* 2008, Yañez-Ocampo y Wong-Villarreal 2013).

De forma general, estos son constituidos de una porción hidrofóbica y otra hidrofílica (Figura 1), donde la parte hidrofóbica es una cadena lineal o ramificada de hidrocarburos o fluorocarbonos de 8 a 18 átomos de carbono, mientras que la hidrofílica es una sección polar que puede ser iónica, no iónica o zwitteriónica. Debido a lo cual presentan la facilidad de migrar hacia una interfase con diferentes grados de polaridad y/o puentes de hidrógeno como es la interfase aire/agua o aceite/agua (Roongsawang *et al.* 2010, Tadros 2005).

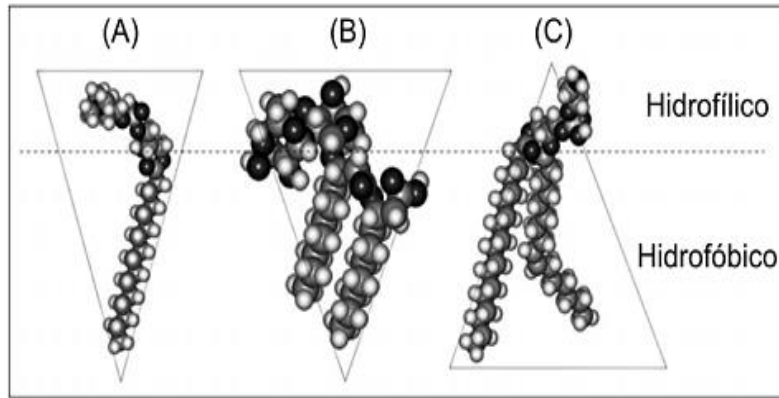


Figura 1. Comparación entre diferentes formas moleculares de surfactantes. (A) 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (lisopc), (B) rha-rha-c10-c10 (dir1) y (C) 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (PE) (Ramkrishna 2010).

En soluciones acuosas se auto-asocian en orden para reducir el contacto entre su porción hidrofóbica y el agua, y maximizar el contacto con la porción hidrofílica. Esta autoasociación es cooperativa y empieza a cierta concentración, que es llamada concentración micelar crítica (CMC), que es la característica más importante de un surfactante ya que en esta comienza la formación de micelas, las cuales son agregados donde la misma porción hidrofóbica se encuentra en contacto formando un núcleo aceitoso, cuya superficie está cubierta por los grupos de cabezas polares. Las micelas presentan diversas formas según el medio y la concentración en que se encuentren (Figura 2), así pues la forma tradicional o normal se basa en la unión de la porción hidrofóbica en el centro mientras la hidrofílica se localiza al exterior cuando se encuentran en un medio polar, en el caso de que fuera apolar se formaría una micela reversa con su porción hidrofílica en el centro. (Holmberg *et al.* 2003, Mukherjee *et al.* 2008, Zana 2005).

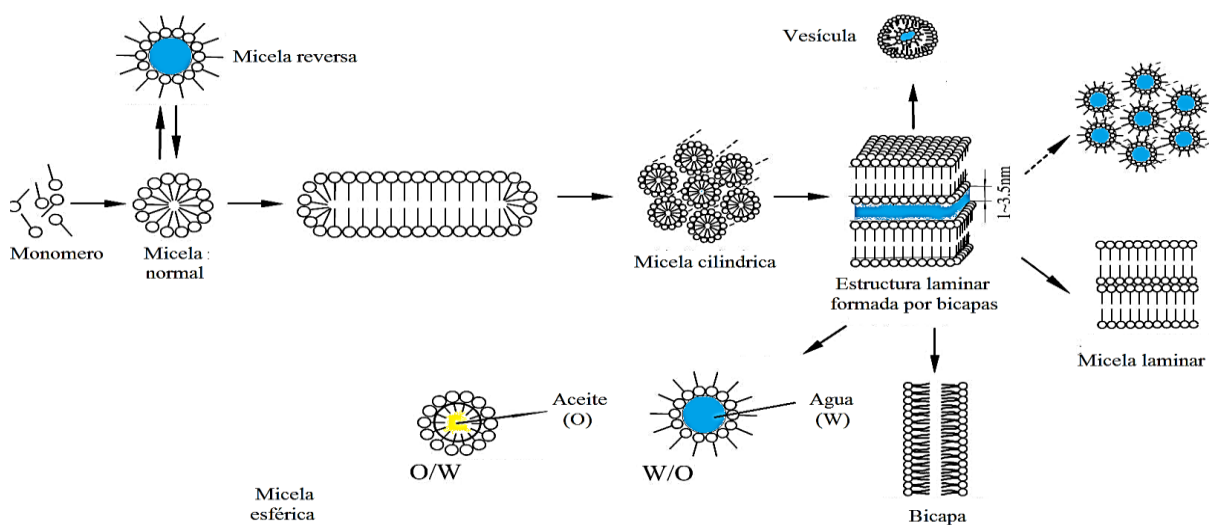


Figura 2. Diferentes isoformas de los surfactantes.

Por tal motivo la principal propiedad de los surfactantes es la alteración de la interfase y de las propiedades interfaciales de un líquido, mediante la disminución de la tensión superficial (Figura 3), la cual es la cantidad de energía necesaria para aumentar la superficie por unidad de área, o en otras palabras, la resistencia que tiene un líquido para aumentar su superficie provocando un comportamiento parecido al de una finísima membrana elástica. Esto es causado tanto por la manifestación de las fuerzas intermoleculares, de dentro como fuera de los líquidos, como por la interacción con las moléculas del recipiente que contiene al líquido provocando el efecto conocido como capilaridad. Entre los diferentes valores experimentales que existen de tensión superficial se pueden mencionar las siguientes (din/cm): aceite de oliva 32, etanol 22.3, glicerina 63.1 y agua 72.8 a 20 ° C. Cabe mencionar que la temperatura tiene un efecto importante en los valores de tensión superficial pues a temperaturas de 0, 60 y 100 ° C el agua presenta valores de 75.6, 66.2 y 58.9 din/cm respectivamente (Jiménez 2012, Torres-Papaqui 2010).

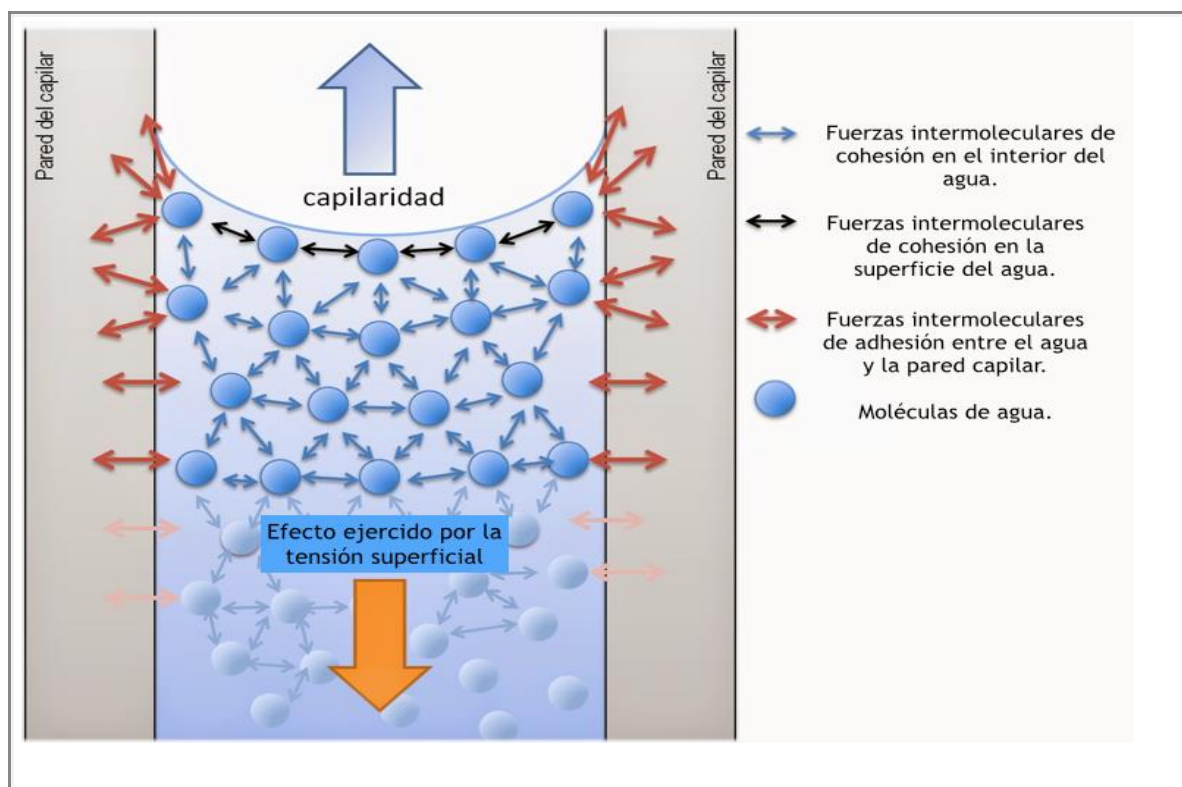


Figura 3. Efecto de la tensión superficial sobre la capilaridad.

Gracias a la capacidad de disminuir la tensión superficial, la industria ha utilizado a los surfactantes como emulsionantes, espumantes, detergentes, humectantes, solubilizantes, etc. lo cual dependerá del balance que exista entre las porciones lipofílicas

e hidrofílicas, es decir según su intervalo de HLB (Balance hidrofílico-lipofílico por sus siglas en inglés) el cual se puede observar en la Figura 4 (Tadros 2005).

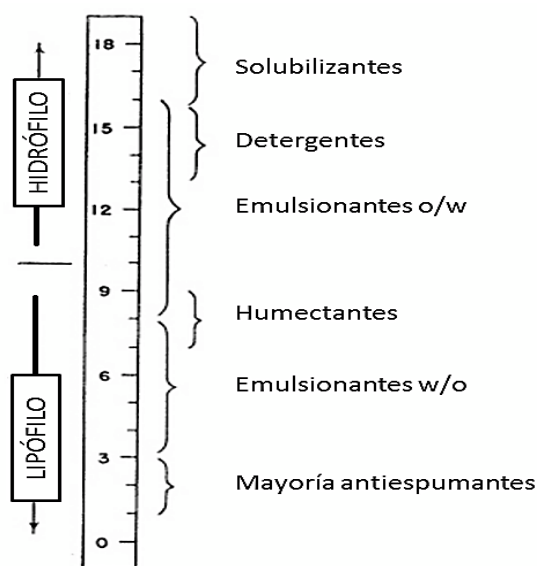


Figura 4. Intervalos de diferentes valores de HLB y sus aplicaciones (Tadros 2005).

En cuanto a la clasificación de los surfactantes esta es según el origen de producción, composición química, y su peso molecular pudiendo ser de alto y bajo peso. Los biosurfactantes de alto peso molecular son mayores a 1 MDa y se subdividen a su vez en lipopolisacáridos, lipoproteínas, proteínas y poliméricos. Los surfactantes de bajo peso molecular están en el rango de 1-2 KDa y se pueden subclasificar en ácidos grasos, glicolípidos y lipopéptidos los cuales son más efectivos para bajar la tensión interfacial y superficial de líquidos (Ramkrishna 2010, Yañez-Ocampo y Wong-Villarreal 2013).

Los surfactantes tienen una posición única entre los compuestos químicos pues presentan un amplio espectro de aplicaciones como es en el medio ambiente, la producción y procesamiento de alimentos, los productos de salud, la agricultura, el cuidado personal, la farmacéutica, la recuperación del petróleo, entre otras. Así pues, según el instituto de investigaciones de mercado Ceresana, las ventas de surfactantes en 2014 llegaron a 33.2 millones de dólares y se estima que existirá un incremento anual del 2.5% llegando en 2022 a los 40.4 mil millones de dólares, de los cuales la principal producción será de surfactantes sintéticos derivados del petróleo, sin embargo debido a los diversos problemas que ha causado el cambio climático las nuevas legislaciones ambientales están buscando incrementar la producción de los biosurfactantes donde los resultados de las investigaciones parecen prometedoras (Cavalcante *et al.* 2007, Ceresana 2015).

Por lo tanto a causa del aumento de la conciencia ambiental y a las diferentes aplicaciones industriales que se les pueden dar a los surfactantes se han acrecentado las investigaciones para mejorar la producción de los biosurfactantes para que puedan ser más comerciables industrialmente (Al-Araji *et al.* 2007, Ramkrishna 2010, Yañez-Ocampo y Wong-Villarreal 2013).

II. ANTECEDENTES

II. 1. BIOSURFACTANTES

Los biosurfactantes o tensoactivos son sustancias producidas que pueden ser encontrados de forma intra y extracelular. Generalmente se componen en su parte hidrofílica de carbohidratos como ramnosa, trealosa, manosa, etc. o grupos de aminoácidos, mientras que en la parte hidrofóbica se observa una cadena hidrocarbonada de longitud variable de ácidos grasos saturados e insaturados (Cavalcante *et al.* 2007, Ramkrishna 2010, Yañez-Ocampo y Wong-Villarreal 2013).

Según Ron y Rosenberg (2001) los biosurfactantes cumplen diferentes roles fisiológicos que ayudan a sus cepas productoras a adaptarse a ambientes hostiles y principalmente cuando existen compuestos orgánicos hidrofóbicos. Entre algunas de estas funciones se encuentran:

- Incrementar del área superficial de substratos insolubles en agua para su emulsificación.
- Incrementar de la biodisponibilidad de substratos hidrofóbicos.
- Enlazarse con metales pesados.
- Actuar en la patogénesis.
- Poseer actividad antimicrobiana.
- Regular la conexión/desconexión de los microorganismos hacia y desde las superficies.
- Producir biofilms.

Algunos ejemplos de estos microorganismos y de sus correspondientes biosurfactantes se pueden observar en la Tabla 1 (Cavalcante *et al.* 2007, Ramkrishna 2010, Yañez-Ocampo y Wong-Villarreal 2013).

Tabla 1. Principales microorganismos productores de biosurfactantes de aislamientos ambientales Yañez-Ocampo y Wong-Villarreal 2013.

Microorganismos	Biosurfactantes
Alcanivorax borkumensis, Tsukamurella spp.	Glicolípidos
Pseudomonas aeruginosa, Serratia rubidea	Ramnolípidos
Torulopsis bombicola, Candida apicola	Soforolípidos
<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium</i> spp.	Trehalolípidos
Bacillus licheniformis, Myroides spp.	Péptido-lipídico
Pseudomonas fluorescens	Viscosina
Serratia marcescens	Serrawetina
Bacillus subtilis	Surfactina
Bacillus subtilis	Subtilisina
Bacillus brevis	Gramicidina
Bacillus polymyxa	Polimixina
Acinetobacter radioresistens	Alasán
Acinetobacter calcoaceticus	Emulsán
<i>Candida lipolytica</i>	Liposán
<i>Candida tropicalis</i>	Lipoproteína
Arthrobacter spp.	Arthrofactina
Streptomyces tendae	Streptofactina

II. 1. 1. Aplicaciones potenciales de los biosurfactantes

Al igual que los surfactantes sintéticos, los biosurfactantes se usan en diversas aplicaciones como en la agricultura donde son usados para facilitar la aplicación, formulación y biodegradación de fertilizantes y pesticidas. En la industria farmacéutica para la inhibición de la formación de fibrina, lisis de eritrocitos y de esferoblastos bacterianos. En cuanto a la industria de extracción y transformación del petróleo se emplean en la limpieza de los tanques de almacenamiento para incrementar la solubilidad de hidrocarburos no miscibles en fases acuosas, tales como pentano, hexano, ciclohexano, octano, dodecano, hexadecano, tolueno y naftaleno principalmente a continuación en la Tabla 2 se muestra

un resumen de las diversas aplicaciones industriales que se les ha dado a los biosurfactantes (Jiménez *et al.* 2010, Mejía 2008).

Tabla 2. Aplicaciones industriales potenciales de los biosurfactantes.

INDUSTRIA	APLICACIÓN Y FUNCIÓN DEL BIOSURFACTANTE
Minería	<ul style="list-style-type: none"> • Agentes secuestrantes, espumantes y flotantes de metales.
Alimenticia	<ul style="list-style-type: none"> • Emulsionantes, solubilizantes, desemulsionantes. • Agentes humectantes espumosos, lubricantes y espesantes. • Ingredientes funcionales, agentes protectores que interactúan con lípidos, proteínas y carbohidratos.
Petrolera	<ul style="list-style-type: none"> • Recuperación mejorada del petróleo. • Mejoran el drenaje de aceite en pozo. • Estimulación la liberación de petróleo atrapado. • Reducción de la viscosidad del aceite.
Agrícola	<ul style="list-style-type: none"> • Biocontrol de parásitos, plagas.
Cosmética	<ul style="list-style-type: none"> • Productos de salud y belleza. • Emulsionantes, agentes espumosos, solubilizantes, humectantes, antimicrobianos y productos de limpieza.
Ambiental	<ul style="list-style-type: none"> • Biorremediación. Emulsificación de hidrocarburos; disminución de la tensión interfacial; dispersantes y espumantes; proceso de lavado de suelo. • Tratamiento de lodos de aguas residuales con residuos aceitosos.
Farmacéutica	<ul style="list-style-type: none"> • Antibacteriales, antifúngicos, antivirales. • Agentes adhesivos; moléculas inmunomoduladoras; vacunas.
Bioprocesamiento	<ul style="list-style-type: none"> • Elaboración secundaria. Biocatálisis en sistemas acuosos de dos fases y microemulsiones, biotransformaciones, recuperación de productos intracelulares. • Mayor producción de enzimas extracelulares y productos de fermentación.

II. 1. 2. Ventajas y desventajas de los biosurfactantes

Las principales ventajas de los biosurfactantes sobre los surfactantes sintéticos son su baja toxicidad e irritabilidad, alta biodegradabilidad, mejor compatibilidad con el medio ambiente y con la piel humana, excelente capacidad emulsificante, detergente, espumante y dispersante; estabilidad bajo condiciones extremas de salinidad, temperatura (40-70 ° C) y pH (7-12) reteniendo el 100% de su actividad; además de que agregan una interfase entre fluidos con diferentes polaridades. Sin embargo a pesar de todos estos beneficios no ha

sido posible realizar su comercialización a nivel industrial para disminuir a los surfactantes sintéticos del mercado, debido principalmente a una escasa comprensión de la regulación de síntesis en los microorganismos, bajos rendimientos producidos por estos microorganismos y a una laboriosa y costosa purificación. Por este motivo se han incrementado las investigaciones de los biosurfactantes principalmente de los glicolípidos y lipopéptidos (Gong *et al.* 2009, Pornsunthorntawee *et al.* 2008, Ramnani *et al.* 2005, Yañez-Ocampo y Wong-Villarreal 2013).

II. 1. 3. Lipopéptidos

Los lipopéptidos son unos de los biosurfactantes más estudiados debido a que además de bajar la tensión superficial pueden ser usados como antimicrobianos, anticelulares, antivirales, antienzimáticos, etc. Por lo general son sintetizados de una manera independiente de ribosomas con megaenzimas llamados péptido sintetasas norribosomales (NRPSs). La mayoría se compone de un heptapéptido cíclico unido a una cadena de ácido graso hidroxilada mediante un enlace entre la parte β -hidroxi del ácido graso con el C-terminal o el grupo hidroxilo del péptido. Por lo general contienen en su porción polar aminoácidos y sus derivados junto con ácidos carboxílicos o alcoholes, mientras que en la no polar se observan hidroxil ácidos grasos y α -alquil- β -hidroxil ácidos grasos (Roongsawang *et al.* 2010, Tadros 2005, Pornsunthorntawee *et al.* 200, Ramkrishna 2010).

Su producción se realizó por primera vez en la bacteria *Bacillus subtilis* IAM1213 en 1968 por Arima *et al.* Desde entonces, se han aislado varios tipos de lipopéptidos con actividad de superficial y/o actividad antimicrobiana como son surfactina, iturina, fengicina y liquenisina que son producidas por la misma bacteria. Actualmente, a causa de diversas investigaciones se han podido emplear otros microorganismos para la producción de biosurfactantes como lo son hongos filamentosos y bacterias del género *Bacillus* y *Pseudomonas* (Roongsawang *et al.* 2010).

II.2. Género *Bacillus*

Taxonómicamente, de acuerdo al Manual Bergey's, el género *Bacillus* pertenece a la familia I *Bacillaceae*, del orden I *Bacilares* de clase tres *Bacilo*, del fillum BXIII *firmicutes* del Dominio *bacteria*. Está formado por microorganismos bacilares Gram positivos, formadores de endosporas, quimiheterótrofos, móviles por flagelos peritricos, anaerobios o aerobios facultativos, catalasa, xilosa, hemólisis y citrato positivos, lecitinasa negativo, de 1.2-10 µm, comúnmente encontrados en suelos y plantas donde ejercen un papel importante en el ciclo del carbono y nitrógeno (Cuervo 2010, Hernández 2003, Roongsawang *et al.* 2010).

Las especies pertenecientes a este dominio son diversos desde el punto de vista fenotípico y genotípico, por lo que la diferenciación entre las especies del género se basa en los resultados de la fermentación de lactosa, sorbitol, manitol, melobiosis, hidrólisis de la urea y descarboxilación de la lisina. Recientemente, se han usado secuencias de RNA para dividir el género en al menos cinco líneas diferentes, que se subdividen en más de 60 especies siendo las más representativas *B. alkalophilus*, *B. anthracis*, *B. azotoformans*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. insolitus*, *B. licheniformis*, *B. polimyxa* y *B. turingiensis* (Cuervo 2010).

La mayoría de los lipopéptidos producidos por este género se clasifican en tres familias: surfactina, fengicina e iturina, las cuales también pueden ser obtenidos en una sola especie, como es el caso de *Bacillus subtilis*. Entre los lipopéptidos más comunes que produce este género están los representados en la Tabla 3 (Cuervo 2010, Roongsawang *et al.* 2010).

Tabla 3. Estructura primaria de lipopéptidos del género Bacillus (Roongsawang 2010).

NOMBRE	ESTRUCTURA
Familia surfactina	
Surfactina	FA-β-OH-L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu
Liquenisina A/D	FA-β-OH-L-Gln-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Ile
(Liquenisina B)	FA-β-OH-L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu
(Liquenisina C)	FA-β-OH-L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Ile
Liquenisina G	FA-β-OH-L-Gln-L-[A ₂]-D-Leu-L-[A ₄]-L-Asp-D-Leu-L-[A ₇] A ₂ =Leu/Ile, A ₄ =Val/Ile, A ₇ =Ile/Val
Surfactante BL86	FA-β-OH-L-Glx-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-[A ₇] A ₇ =Ile/Val
Pumilacidina	FA-β-OH-L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Leu-L-Asp-D-Leu-L-[A ₇] A ₇ =Ile/Val
Familia fengicina	
Fengicina	FA-β-OH-L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-aThr-L-Glu-D-[A ₆]-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile A ₆ = Ala/Val
Plipastatina	FA-β-OH-L-Glu-D-Orn-L-Tyr-D-aThr-L-Glu-D-[A ₆]-L-Pro-L-Gln-D-Tyr-L-Ile A ₆ = Ala/Val
Familia Iturina	
Iturina A	FA-β-NH ₂ -L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser
Iturina C	FA-β-NH ₂ -L-Asp-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser
Bacilomicina L	FA-β-NH ₂ -L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Ser-L-Glu-D-Ser-L-Thr
Bacilomicina D	FA-β-NH ₂ -L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Pro-L-Glu-D-Ser-L-Thr
Bacilomicina F	FA-β-NH ₂ -L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Thr
Micosubtilina	FA-β-NH ₂ -L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Ser-L-Asn
Otros	
Antiadhesina	FA-β-OH-L-Asp-L-Leu-L-Leu-L-Val-L-Val-L-Glu-L-Leu
Bamilocina A	FA-β-OH-X-Glu-X-Leu-X-Met-X-Leu-X-Pro-X-Leu-X-Leu
Circulocina 1	gFA-β-OH-X-Thr-X-Phe-X-Ile-X-DBA-X-Asp
Circulocina 3	gFA-β-OH-X-Thr-X-Leu-X-Ile-X-Thr-X-Asn-X-Ala
Fusaricidina	gFA-β-OH-L-Thr-D-Val-L-Tyr-D-aThr-D-Asn-D-Ala
Kurstaquinas	FA-X-Thr-X-Gly-X-Ala-X-Ser-X-His-X-Gln-X-Gln

II.2.1 *Bacillus subtilis*

Esta especie bacteriana crece en un amplio intervalo de temperatura (15 a 55 ° C) y diversos factores perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químico. Es capaz de fermentar la caseína y el almidón para producir antibióticos como bacitracina, polimixina, gramicidina y circulina, tiene altas velocidades de crecimiento y sobrevive a concentraciones salinas (NaCl) de hasta 7%. Su identificación es de forma sencilla pues es catalasa y Voges-Proskauer positivo, reduce nitratos a nitritos, en medios complejos con glucosa o nitrato, produce un crecimiento anaeróbico restringido y forma esporas termoresistentes, además de que es buena productora de biosurfactantes como la surfactina, iturina, fengicina y micosubtilina (Figura 5) (Cuervo 2010, Mejia 2008).

SURFACTINA

Antifúngico, antiviral, antibiótico y detergente.

ITURINA

Antifúngico y antibiótico

FENGICINA

Antifúngico y antibiótico.

MICOSUBTILINA

Antifúngico y antibiótico.

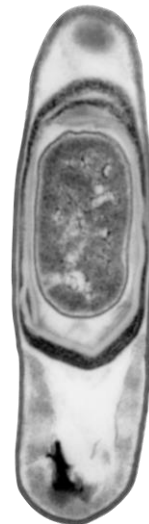


Figura 5. Biosurfactantes producidos por *Bacillus subtilis*. (Kempe 2016)

Estos biosurfactantes presentan diferentes propiedades dependiendo de la fuente de carbono y de los nutrientes disponibles en el medio en que se encuentren, debido a que causan diferentes isoformas, longitudes de cadena, uniones al ácido graso y diversidad en los aminoácidos que componen al biosurfactante. De los distintos biosurfactantes producidos por *Bacillus subtilis* la surfactina es considerada como la más importante debido a su estructura que le brinda múltiples propiedades que se mencionaran más adelante (Espinosa 2005, Mercado-Flores *et al.* 2014, Ramnani *et al.* 2005, Mejia 2008)

II. 2. 2. SURFACTINA

La surfactina es producida por *Bacillus subtilis* cuando las células presentan crecimiento activo por la progresión a la fase post exponencial. Debido a su excepcional actividad superficial es considerado uno de los más efectivos surfactantes lipopéptidicos, incluso al ser comparado con otros biosurfactantes como iturina, liquenisina o fengicina, o con surfactantes sintéticos como el dodecil sulfato de sodio (SDS) o el bromuro de trimetil amonio (BTA), a causa de que reduce tanto la tensión superficial del agua, a 20 °C a 27 din/cm, como la tensión interfacial de otros sistemas como el de agua/hexadecano de 43 a 1 din/cm. En cuanto a su actividad biológica, tiene actividad sobre la membrana celular mediante diferentes mecanismos según la concentración en que se encuentren pudiendo hacer una solubilización por perturbación heterogénea o formando poros en la membrana celular mediante interacción electrostática con los fosfolípidos y esteroides de membrana o como parte del movimiento flip-flop con estos, además presenta antifúngica, antibacterial, antiviral, antitumoral y anti VIH, inhibe la formación de fibrina, presenta valores de concentración micelar crítica (CMC) de 25-220 mg/L (dependiendo de la concentración y temperatura en la que se encuentren) e inhibe la formación de *biofilms* de otras bacterias. Además de que mantiene un efecto inhibitorio contra patógenos como *Listeria monocytogenes* a temperaturas extremas en tratamientos de 10 min en ebullición y autoclaveado a 121 ° C por 15 min sin que el surfactante se vea afectado (Cavalcante *et al.* 2007, Ghribi y Ellouze-Chaabouni 2011, Gong *et al.* 2009, Kragh-Hansen *et al.* 1998, Mutaz *et al.* 2007, Ostroumova *et al.* 2010, Sabaté y Audisio 2013, Sen y Swaminathan 2005).

Tiene en su estructura un péptido cíclico de 7 aminoácidos (Ácido glutámico, Leucina, D- Leucina, Valina, Ácido aspártico, D-Leucina y Leucina) ligados en la parte β -hidroxi a un ácido graso que tiene una cadena variable de 13 a 15 átomos de carbono (Figura 6), que por lo general es un 3 hidroxil-13-metil-tetradecanoico (Cavalcante *et al.* 2007).

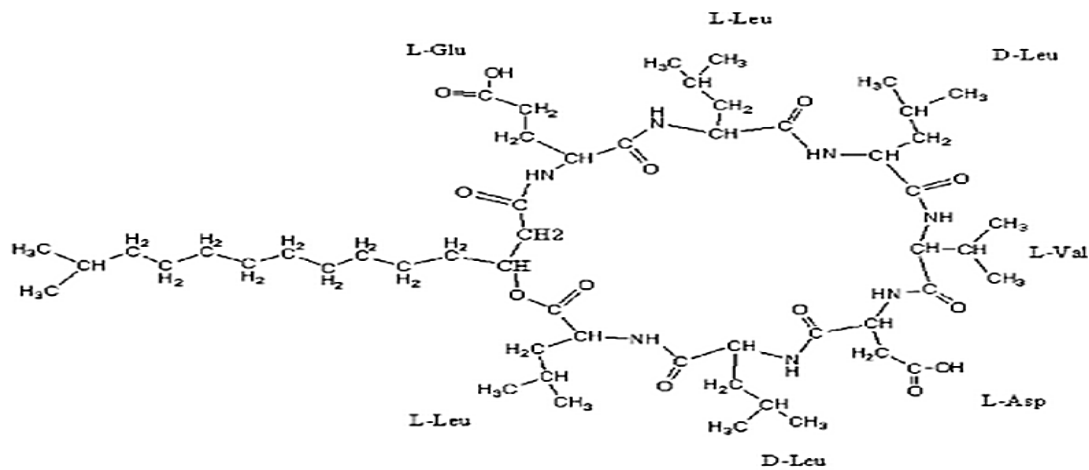


Figura 6. Estructura de la principal isoforma de la surfactina (Mejia 2008).

Dependiendo del tipo de cepa, de sus condiciones nutricionales y ambientales, es posible encontrar diferentes compuestos homólogos e isómeros de la surfactina (Tabla 4 y Figura 7). Estos presentan diferentes propiedades fisicoquímicas y biológicas debido a las variaciones existentes en el tamaño de la cadena, los aminoácidos que componen su anillo, la conexión de sus sustitutos grasos, la secuencia de los péptidos, la naturaleza de la parte lipídica, las distribuciones polar/apolar de los aminoácidos y a la accesibilidad de sus cationes y grupos carboxílicos (Cavalcante *et al.* 2007).

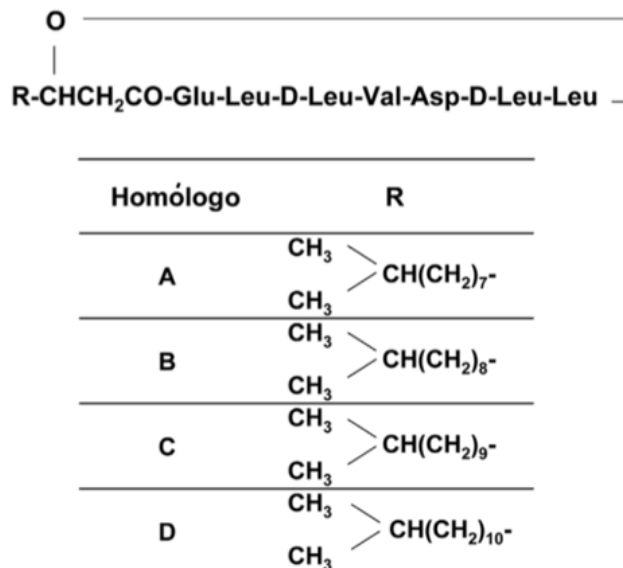


Figura 7. Estructura de surfactina A, B, C y D de *Bacillus subtilis* (Dae *et al.* 2006)

Varios experimentos han demostrado que la surfactina es estable cuando es sometida a diversas condiciones; por ejemplo, la producida por la cepa *Bacillus subtilis* C9, mostró una amplia perdurabilidad de sus propiedades emulsionantes a diferentes intervalos

de temperatura de 20 a 100 °C durante 1 h, pH de 5.0 a 9.5 y concentraciones de sal de 1 mM de NaCl y 10 mM de CaCl₂. También al hacer un comparativo de surfactinas de cepas diferentes con distintos pH (1-6), enzimas proteolíticas (bromelina, ficina, papaína y tripsina), temperaturas y tiempos (100 °C por 2 h, 121 °C por 0.5 h, 135°C por 1 h) y concentración salina de 15% NaCl se observó que aún mantenían estas propiedades en aceites vegetales e hidrocarburos (Cavalcante *et al.* 2007, Morán *et al.* 2002).

En otro experimento al colocar surfactina en una solución ácida de pH 2 con HCl concentrado, se observó una variación de la tensión superficial a 62 din/cm que luego regresó a 27 din/cm en un pH neutro, con lo que se demostró que las propiedades tensoactivas de la surfactina dependen del pH al que se encuentren. Con lo que se puede concluir que a condiciones extremas de pH la surfactina sigue manteniendo su estructura, lo cual le confiere una ventaja muy importante a nivel industrial (Cavalcante *et al.* 2007).

II. 2. 2. 1. Propiedades funcionales y toxicológicas de la surfactina

Aunque el modo de acción de la surfactina no se ha aclarado en detalle, se presume que es debido a las fuertes interacciones de ésta con los fosfolípidos de la membrana celular, causando una alteración en la bicapa y por lo tanto un cambio en su integridad celular (Cavalcante *et al.* 2007).

Estudios sobre los mecanismos moleculares de permeabilización de la membrana, a través de la incorporación de la surfactina, demostraron que la pérdida del contenido vesicular a través de la desestabilización lipídica da lugar a la formación de poros intramembranales y sistemas tubulares en los lípidos de membrana, lo que explica las diversas propiedades que tiene contra células bacterianas y animales (Cavalcante *et al.* 2007).

Para comprobar la actividad antitumoral, antiproliferativa, citostática y citotóxica se usaron diferentes líneas celulares cancerígenas y se encontró que surfactina actúa en el interior de la célula causando una ruptura en la membrana plasmática. En cuanto a la actividad antiviral, se demostró que inactiva eficazmente el virus del herpes, retrovirus y otros virus de ARN y ADN comprimidos por la interacción físico-química del biosurfactante con la membrana viral lipídica, con lo cual, surfactina puede ayudar a aumentar la seguridad

de productos biotecnológicos y farmacéuticos, tales como los derivados de sangre y los obtenidos de cultivos de celulares, que corren el riesgo de transmitir enfermedades como el virus de la hepatitis B, el VIH o herpes simplex (Cavalcante *et al.* 2007).

II. 2. 2. Control genético en la síntesis de surfactina

Para la síntesis de surfactina se ven involucrados diferentes genes que son activados en presencia del quorum sensing, el cual es una respuesta a la densidad celular mediante la detección y secreción de moléculas de señalización con el propósito de cooperar con la población bacteriana y así poder explotar el medio ambiente circundante (Rojas 2011).

En el caso de *Bacillus subtilis*, esto ocurre por medio de dos péptido señales extracelulares ComX y CSF (factor estimulante de la competencia por sus siglas en inglés), que regulan la actividad del factor ComA (Figura 8). ComX es secretada en el medio e interactúa en la membrana celular con un sistema de transducción de señal activando a la proteína de sensor de membrana histidina quinasa ComP, que luego dona un fosfato a ComA provocando que se enlace al promotor de *srfA* inicie la transcripción (Bassler 1999, Desai y Banat 1997, Lazazzera 2000, Sullivan 1998).

Cuando el CSF alcanza concentraciones críticas se transporta dentro de la célula a través de una permeasa oligopeptídica (spoOK) e interactúa con dos diferentes receptores intracelulares para modular la actividad de ComA. A densidades celulares bajas, el CSF estimula la expresión de *srfA* controlando el nivel de fosforilación de ComA, probablemente por inhibición de su actividad con una fosfatasa codificada por RapC, mientras que a densidades celulares altas, CSF inhibe la expresión de la *srfA* y estimula la esporulación por un mecanismo Rap-C independiente (Bassler 1999, Desai y Banat 1997, Lazazzera 2000, Sullivan 1998).

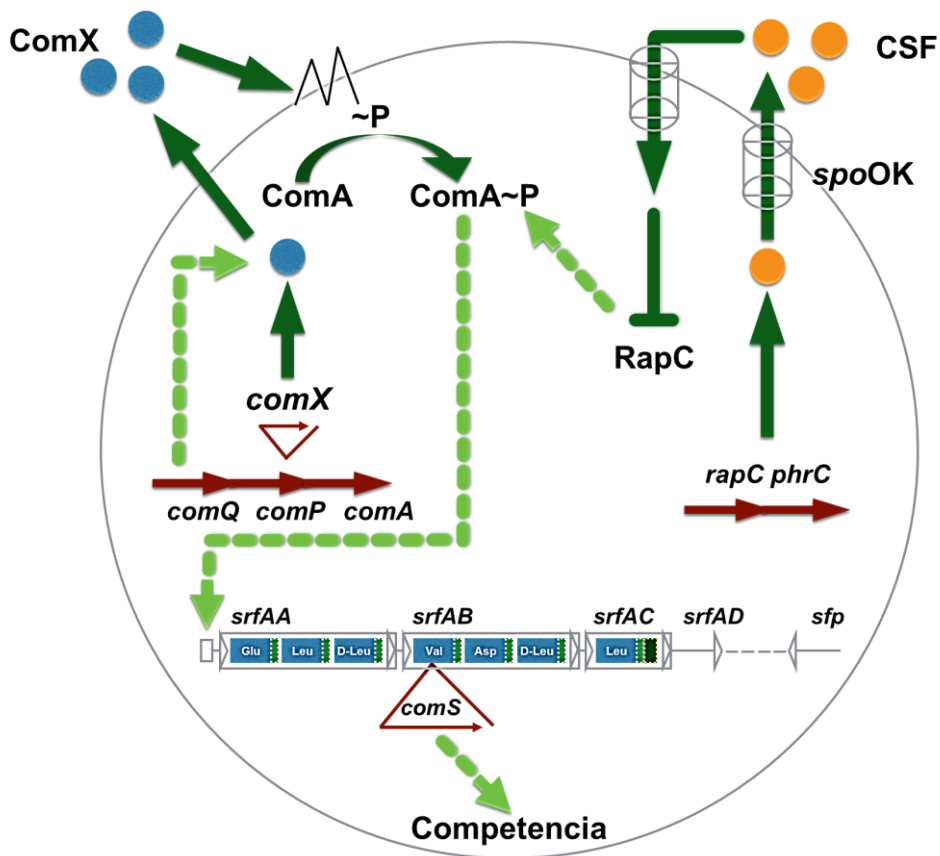


Figura 8. Activación de los genes en la producción de surfactina (Mejia 2008).

También para la producción de surfactina es necesario que se active al operón SrfA que codifica para cuatro marcos de lectura abiertos (ORF's por sus siglas en inglés), los cuales son *srfAA* que contiene los dominios de activación para adicionar al ácido glutámico, leucina y D- leucina; *srfAB* que contiene los dominios para valina, asparagina, y D-leucina; *srfAC* que adiciona a leucina y codifica la tioesterasa I (TE-I); y *srfAD* que no es requerido para la producción del biosurfactante pero que tiene una secuencia homologa con un motivo tioesterasa tipo II (TE-II) (Figura 9) (Sullivan 1998).

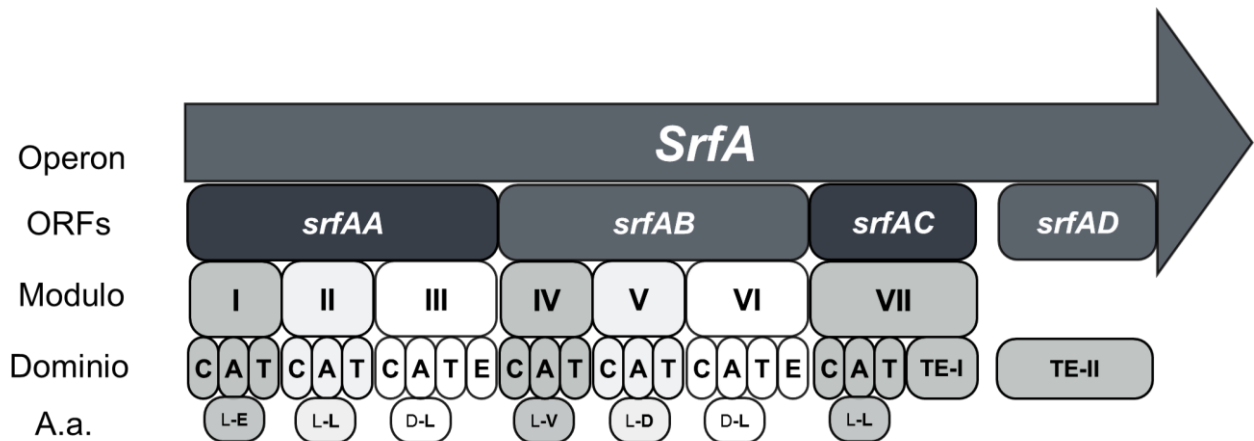


Figura 9. Organización general de los NRPS. Mecanismo de la producción de surfactina.

Estos marcos de lectura son parte del sistema péptido sintetasa no ribosomal (NRPS por sus siglas en inglés), el cual es un mecanismo de tiotemplado multimodular con el que se reconocen, activan, modifican y ligan a los aminoácidos necesarios para la producción de surfactina (Figura 9). A su vez estos módulos se componen de los dominios C (condensación), A (adenilación), T (tiolación), E (epimerización) y TE (tioesterización) que sirven como bloques de construcción para el lipopéptido final (Ramkrishna 2010, Roongsawang *et al.* 2010).

El dominio A (Figura 10) se encarga de reconocer y activar a los diversos aminoácidos que participaran en la síntesis de surfactina, mediante el uso de ATP realizando una transformación a un amino-acil-adenilato. Este aminoácido activo se une covalentemente a una péptido sintetasa a través de un enlace tioéster al dominio T que formara un enlace amida catalizado por el dominio C. También, si el aminoácido lo requiere, es utilizado el dominio E que transforma L- aminoácidos a D- aminoácidos (Farnet *et al.* 2003).

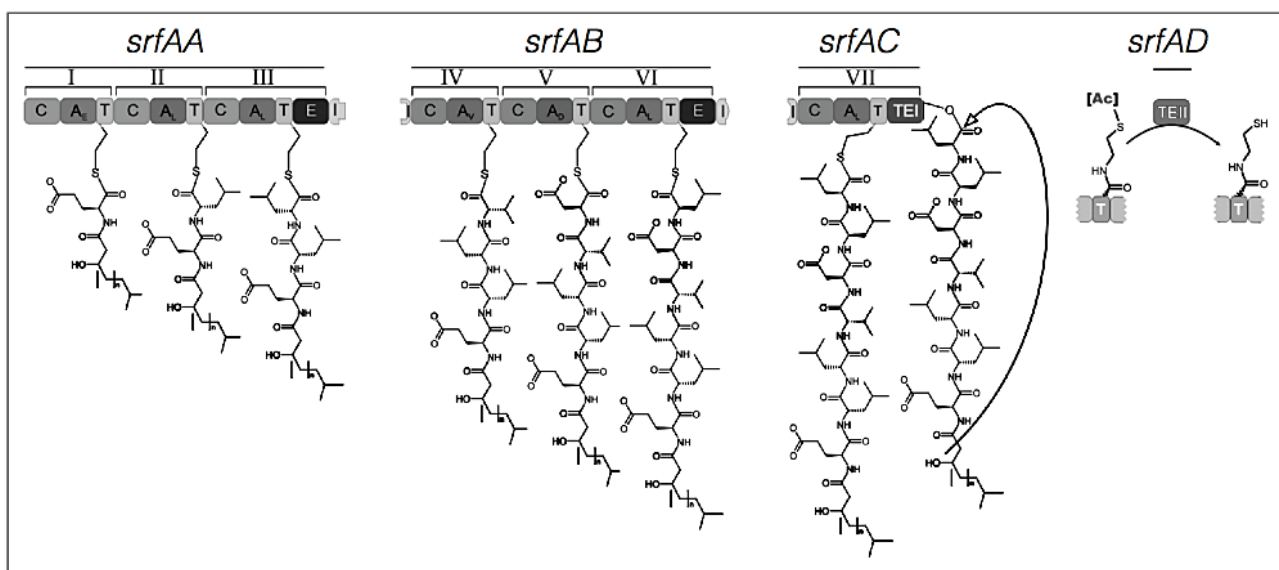


Figura 10. Diseño modular del sistema NRPS. Vista esquemática del sistema de la síntesis de surfactina que comprende las tres subunidades *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* y *srfAD* que codifica para la Tioesterasa III. Se indican los módulos I-VII de las subunidades *srf*. Cada módulo consiste en los dominios de C (Condensación), A (Adenilación), T (Tiolación), E (Epimerización) y TE (Tioesterización). Solo los módulos III y VI contienen el dominio E (Epimerización). El módulo VII contiene el dominio de terminal de Tioesterasa Tipo I (TEI) que termina el lipopéptido final. Se muestra como ocurre el crecimiento del lipopéptido surfactina mediante los módulos individuales. La enzima Tioesterasa Tipo II (TEII) regenera los dominios T misacilados (Ramkrishna 2010).

Todos los intermediarios del crecimiento del péptido son covalentemente unidos a los NRPS mediante translocaciones en una serie de alargamientos con enzimas acil-S. Para realizar la terminación de la cadena, el dominio TE cataliza la ruptura del enlace de la enzima acil-S (Farnet *et al.* 2003).

Para la formación del ácido graso que será parte del lipopéptido, es necesario que una Coenzima A (CoA), proveniente de un grupo metabólico primario, se una a los precursores del acil-graso para ser atacada por un complejo enzimático formado de oxidoreductasas, epoxidasas, desaturasas, entre otras (Figura 11).

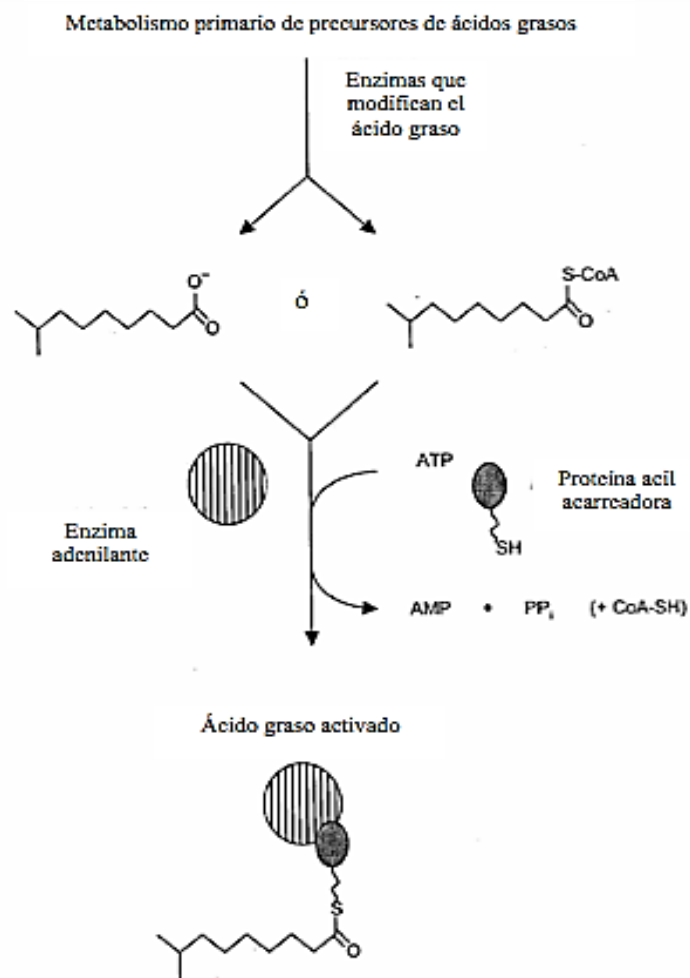


Figura 11. Mecanismo de activación de un ácido graso (Mejia 2008).

El intermediario acil-graso-CoA es reconocido por una enzima adenilante afín para transferirse al brazo prostético fosfopanteteinil del holo-ACP libre, liberando CoA-SH y utilizando ATP en el proceso. Una vez que el grupo acil-graso está unido al holo-ACP libre, el dominio C de srfAA lleva a cabo una reacción en la que el grupo carbonilo del acil-graso

activado se condensa con el grupo amino del sustrato del aminoácido que había sido previamente activado y unido al primer módulo del NRPS. Por lo tanto, el inicio de la cadena peptídica y la N-acilación están estrechamente acoplados. Posteriormente los pasos de alargamiento y terminación del péptido pueden proceder como son los módulos NRPS típicos (Figura 12) (Farnet *et al.* 2003, Mejia 2008).

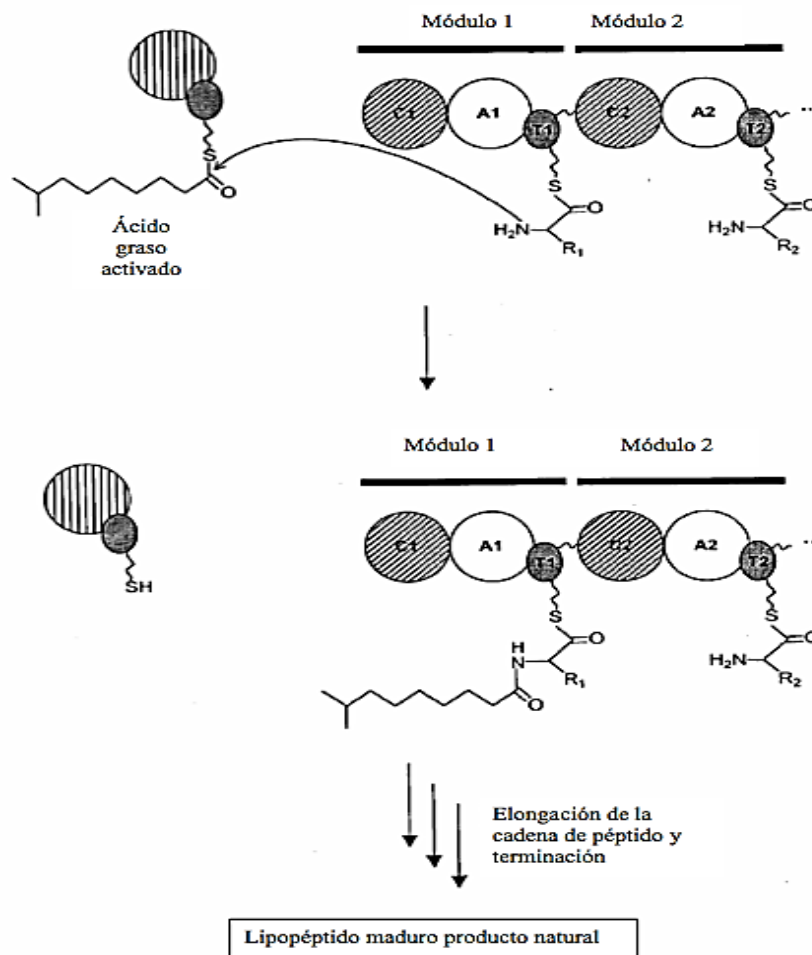


Figura 12. Integración de la cadena de ácido graso al sistema NRPS (Mejia 2008).

II. 2. 2. 3. Producción de surfactina a nivel industrial

Desde que se encontró surfactina en 1968 por Arima *et al.* con rendimientos de 50-100 mg/L en 24 horas de cultivo, se han buscado diferentes estrategias para aumentar la producción de este biosurfactante, las cuales van desde usar cepas mejoradas, optimizar medios de cultivo, diseño de bioreactores e incluso el empleo de residuos agroindustriales para reducir los costos de fermentación (Shaligram y Singhal 2010). Entre algunos de estos trabajos podemos mencionar a los de Cooper *et al.* (1981) donde se usó un medio con

sales minerales y se obtuvo una producción de 780 mg/L de surfactina. Swaminahathan optimizó un medio de fermentación y logró 760 mg/L. Wei and Chu mediante un medio enriquecido con sales orgánicas acompañado de un control de pH alcanzaron un rendimiento de 3500 mg/L. Yeh *et al.* (2005) lograron una producción de 3600 mg/L mediante la adición de sólidos. Coutte *et al.* (2010) con un reactor sin producción de espuma y una membrana de fibra hueca como contactor de aire comprimido obtuvo rendimientos de surfactina por glucosa consumida ($Y_{\text{surfactina/glucosa}}$) de 13.3, 12.8, 12.1 y 11.7 (mg/g) mediante el uso de tres configuraciones diferentes. Freitas de Oliveira *et al.* (2013) utilizaron a *B. subtilis* LAMI005 con un medio suplementado con jugo de manzana y obtuvieron una concentración máxima de 319.3 mg/L de surfactina y tensiones superficiales de 53-54 din/cm a 29-30 din/cm. Una de las investigaciones más prometedoras hasta ahora es la de Gong *et al.* (2009) donde mediante la cepa mutante *B. subtilis* E8, un reactor modificado con recolector de espuma y el medio Landy, usado en este trabajo, se pudo obtener un rendimiento de 10.26 g/L de surfactina siendo uno de los más prometedores rendimientos hasta ahora al compararse con otros, como puede observarse en la Tabla 4.

Tabla 4. Producción industrial de surfactina por *Bacillus subtilis*.

MODIFICACIÓN SOBRE <i>B. subtilis</i>	PRODUCCION (g/L)	REFERENCIA
BS5	1.12	Adbel-Mawgoud et al. 2008
LB5a	2.4	Calvante Barros et al. 2008
E8	10.26	Gong et al. 2009
LAMI008	0.0035	Ponte Rocha et al. 2009
Aislada	2.5	Amani et al. 2010
ATCC 21332	0.32	Chtioui et al. 2010
168 sobreexpresora <i>srfA</i>	1.47 (g/g) de biomasa	Coutte et al. 2010
Aislada LSFM-05	0.23	De Faria et al. 2011
1012WT sobreexpresora de <i>comX</i> y <i>phrC</i>	0.1402	Jung et al. 2012
TD4	2.65	Saimmai et al. 2012
LAMI005	0.3193	Freitas de Oliveira et al. (2013)

Por otro lado, estudios sobre la capacidad de asimilación de nutrientes de *B. subtilis* han arrojado que esta bacteria tiene la capacidad de asimilar diversas fuentes de carbón, tales como efluentes procesados de papa, aguas residuales de yuca, almidón, aceite de palma, melaza, glucosa, sacarosa, etc. con los cuales es posible obtener diferentes tipos y

rendimientos de biosurfactantes. Además, Dulmage *et al.* (1990) reportaron que el balance entre las fuentes de carbono y nitrógeno es necesario para evitar que los valores de pH del medio bajen a menos de 5.6, y esto pueda afectar al crecimiento y la cantidad de esporas de la bacteria, o en otras palabras, que un medio balanceado es posible obtener mejores rendimientos en el coeficiente de crecimiento en comparación con uno no balanceado. Otro trabajo similar realizado por Farrera *et al.* (1998) mostró que ciertas variaciones en la relación de carbono: nitrógeno (C:N) y en la concentración de sólidos totales (CST) afectan la producción de esporas y de proteína Cry en *Bacillus thuringiensis var kurstaki* HD-73 (ATTC 35866). Mejia (2008) también realizó estudios sobre el efecto de la relación C:N y la concentración de oxígeno disuelto sobre la producción de biosurfactantes en cultivos en matraz y a nivel fermentador encontrando que el medio KSAH a C:N de 8 y 11.6 producía una mejor actividad superficial debida a la síntesis de biosurfactantes. Por lo que el objetivo de este trabajo es utilizar diferentes estrategias experimentales para aumentar la fase de crecimiento exponencial mediante la variación en la relación de C:N y el aumento en la CST para así obtener buenos rendimientos en la producción de surfactina.

III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se ha incrementado la búsqueda de sustancias menos agresivas al ambiente, como es en el caso de los biosurfactantes. Los cuales tienen la capacidad de disminuir la tensión superficial e interfacial de diferentes sustancias, brindándoles diferentes propiedades que son muy utilizadas en la industria. Uno de los mejores biosurfactantes conocidos a nivel mundial es la surfactina, la cual es producida por la bacteria *Bacillus subtilis*, y que por sus características estructurales puede actuar como antibiótico, antiviral, agente antitumoral, inmunomodulador, inhibir la formación de coágulos fibrosos, ser antimicoplasmático y vehículo para la administración de drogas entre muchas otras aplicaciones. Para aumentar su producción se han buscado diversas estrategias, una posible es aumentar la fase exponencial de la bacteria mediante diferentes medios de cultivo usando relaciones altas de C:N y de concentración de sólidos totales (CST). Por este motivo, el objetivo de este trabajo es aplicar variaciones elevadas de C:N y de concentración de sólidos totales para incrementar la producción de surfactina y poder así disminuir sus costos de producción industrial.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Extender la fase de crecimiento exponencial de *Bacillus subtilis* mediante diferentes estrategias para obtener mejores rendimientos de surfactina en cultivos por lote.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el crecimiento de *B. subtilis* y producción de surfactina en cultivos por lote a diferentes relaciones C:N.
- Evaluar el efecto de la concentración de sólidos totales en el medio con mayor rendimiento de surfactina en cultivos en lote a nivel reactor.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V. 1. MICROORGANISMOS

Se utilizaron diferentes cepas de *Bacillus subtilis*. Dos fueron provenientes del CINVESTAV (CDBB39 y CDBB555), una de origen industrial (AQ), otra del cepario de CIBA (161212) y dos aisladas de muestras de suelo contaminado con hidrocarburos (TA y TB) (Tabla 5).

Tabla 5. Cepas utilizadas de *Bacillus subtilis*

CEPA	ORIGÉN
CDBB39	CINVESTAV
CDBB555	CINVESTAV
AQ	INDUSTRIAL
161212	CIBA
TA	AISLADO DE SUELO
TB	AISLADO DE SUELO

Las cepas se sembraron en placas de agar nutritivo a pH 7.2 por 30 ± 1 °C durante 24 h. Se realizaron pruebas de caracterización: morfología colonial, tinción Gram, formación de esporas, catalasa, xilosa, citrato, movilidad, lecitinasa y hemólisis en placas de agar sangre carnero (Asesores Especializados en Laboratorio del Estado de Puebla) y fueron verificadas, por la misma empresa, con las cepas *S. pneumoniae* ATCC 49619, *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922 para comprobar la hemólisis α , β y γ respectivamente.

Las cepas se resembraron en Caldo Nutritivo (BD Bioxon) a 30 ± 1 °C por 24 h a 200 rpm a valores de pH de 6.86 y 7.2. La conservación se realizó mediante la suspensión de cultivos en fase exponencial en agua estéril a la que luego se le tomó 10 μ L para colocarla en discos de papel filtro Whatman No. 1 estériles que se secaron y mantuvieron en refrigeración a 4 ± 2 °C.

V. 1. 1. INÓCULO

Se prepararon los inóculos con Caldo Nutritivo en matraces de 1 L con volumen de 200 mL a pH 7.2. Se les adiciono un disco con esporas de la cepa usada para luego incubarlos a 30 ± 2 °C y 200 rpm de agitación por 11 h. Se comprobó el crecimiento exponencial mediante el conteo en la cámara de Neubauer y se ajustaron los datos del crecimiento al modelo exponencial.

V. 2. MEDIOS DE CULTIVO

En este estudio se usaron los medios de cultivo KSAH del estudio de Mejia (2008) a relación C:N 11.6 y CST de 78.65 (Tabla 6), y medio Landy descrito por Gong en 2009 (Tabla 7). Los medios se ajustaron para tener una relación de C:N de 11, 15 y 20, y CST de 100, 50 y 33.3 % (9 tratamientos por cada medio, para posterior selección).

Tabla 6. Medio KSAH

Componentes	Concentración (g/L)
Glucosa	40
NH ₄ HCO ₃	13.5
K ₂ HPO ₄	10.5
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1.75
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.0378
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.00135
CuSO ₄	0.00479
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0058
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0117
Extracto de levadura	0.5
Harina de soya	12
CST= 78.65 C:N= 11.6	

Tabla 7. Medio Landy

Componentes	Concentración (g/L)
Almidón soluble	80
NaNO ₃	15
Mg SO ₄ ·7H ₂ O	1.025
KCl	0.5
KH ₂ PO ₄	1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.15
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.00692
Extracto de levadura	1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.16

CST= 98.31
C:N= 8

Los medios en matraz fueron de 200 mL en matraces de 1 L, incubados a pH de 7.2, temperatura de 30 °C y 200 rpm de agitación (Vortex-Genie 2 Modelo No. G650). Fueron inoculados con un 5 % del volumen total del medio con el inóculo previamente hecho. Se realizaron las pruebas de hemólisis, actividad antimicrobiana, prueba de emulsión E₂₄, colapso por gota y tensión superficial por capilaridad para comparar los resultados de las diferentes cinéticas y seleccionar los mejores medios para emplearse en fermentador.

V. 3. FERMENTACIONES

Los medios seleccionados para fermentador se prepararon en un biorreactor de 7 L con un volumen de 4 L de medio, un control de pH a 7.2, temperatura de 30 °C, aireación de 1 vvm, agitación de 600 rpm e inoculados con un 5% del volumen total del medio con el inóculo previamente realizado. A estos medios se les evaluó la actividad superficial por colapso por gota, la tensión superficial por capilaridad y tensiómetro de DuNouy y HPLC. Todos los medios se esterilizaron durante 20 min a 121 ° C.

V. 4. MÉTODOS ANÁLITICOS

V. 4. 1. Conteo celular

Las cuentas celulares se realizaron microscópicamente mediante la cámara de Neubauer con muestras de diferentes tiempos realizando diluciones. Posteriormente se usaron alícuotas de 10 µL de para agregarlas en la cámara y observar al microscopio a 40X el cambio en el comportamiento de la bacteria. El número total de células fue estimado por duplicado mediante la fórmula:

$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = (\text{Número de células}) \times (10^4) \times (\text{Factor de dilución de la muestra})$$

V. 4. 2. Velocidad específica de crecimiento (μ)

Después de realizar el conteo celular, se realizaron gráficas de los diferentes medios en función del tiempo y con un ajuste de un modelo exponencial con la siguiente ecuación:

$$X = X_0 e^{\mu t}$$

Donde:

μ = velocidad específica de crecimiento, y es constante

X = concentración de células en un tiempo t

X_0 = concentración de células en un tiempo inicial t_0

t = tiempo

V. 4. 3. Prueba de actividad biológica y surfactante

Para las pruebas de actividad biológica se tomaron muestras de 2 mL en el caso de matraces y 25 mL para fermentador que luego se centrifugaron a 10,000 rpm, durante 10 min a 4° C. Se tomaron alícuotas del sobrenadante para las pruebas de actividad antimicrobiana, actividad hemolítica, actividad superficial y tensión superficial.

Para las pruebas de actividad antimicrobiana se usaron 10 μ L de sobrenadante que se colocaron en discos de papel filtro estéril para después ser distribuidas sobre placas de agar nutritivo previamente inoculadas con *Saccharomyces cerevisiae* y *Pythium* sp.; y sobre placas de agar papa dextrosa a pH de 5.5 inoculadas con *Fusarium* sp. Una vez realizado se incubaron las placas de agar papa dextrosa a 25 ± 2 °C durante 72 h y las placas de agar nutritivo a 37 ± 1 °C durante 24 h buscando halos de inhibición para medirles su diámetro.

Para la evaluación de hemólisis, se tomaron 10 μ L del sobrenadante que se colocaron en placas con agar sangre carnero mediante perforación del medio con punta estéril. Se consideraron como negativas las muestras que presentaban γ hemólisis y como positivas las α o β . Todas estas placas se incubaron durante 48 h a 30 ° C.

V. 4. 4. Actividad superficial (Colapso por gota)

La actividad superficial se determinó por el método de colapso de gota reportado por Jain *et al.* (1991). Se usaron 10 μL de sobrenadante libre de células (10,000 rpm, 4 °C, 20 min) que se colocaron sobre una placa con círculos de 40 mm de diámetro los cuales estaban cubiertos previamente con 10 μL aceite, para luego ser observados por 60 segundos y apreciar el tamaño de la gota de sobrenadante. Estos resultados ser compararon con el esquema de la Figura 13. Como control negativo se usó agua destilada y como control positivo una solución de lauril sulfato de sodio al 5%.

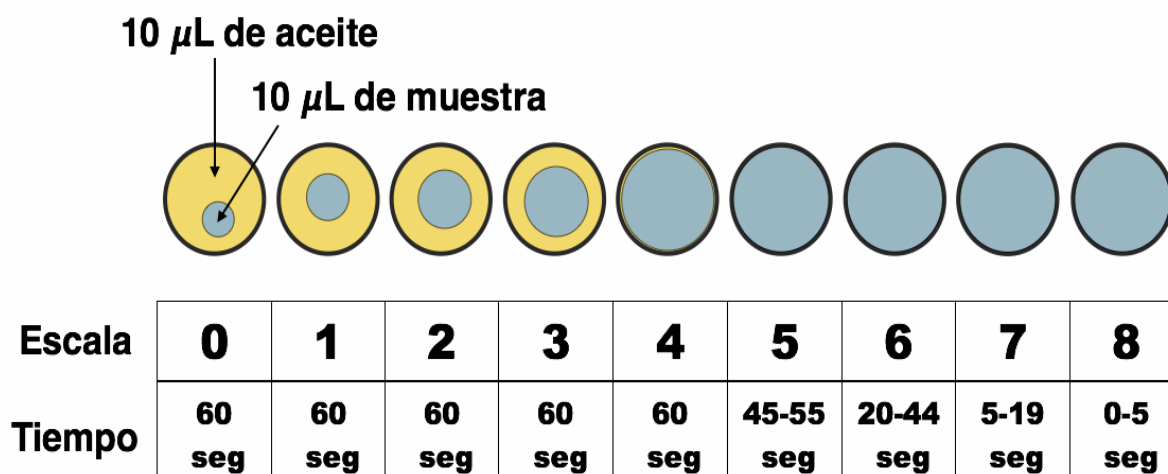
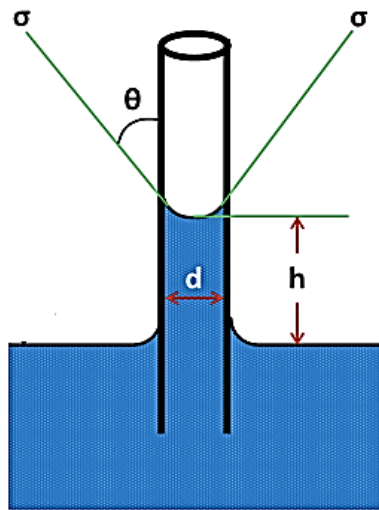


Figura 13. Asignación arbitraria de actividad superficial ajustando valores por tiempos de colapso en segundos.

V. 4. 5. Tensión superficial

Para determinar la tensión superficial por el método de capilaridad se utilizan las fórmulas de la Figura 14, las cuales difieren en el ángulo de contacto existente entre el líquido y la pared del capilar debido a la relación que existe entre las fuerzas de cohesión y de adherencia. En el caso de la interacción entre agua y vidrio este ángulo de contacto se considera cero, por lo que la fórmula usada para calcular la tensión fue la número dos.



$$(1) \quad \sigma = (h \cdot g \cdot r \cdot \rho) / 2 \cos \theta$$

$$(2) \quad \sigma = (h \cdot g \cdot r \cdot \rho) / 2$$

σ -es la tensión superficial (dyn/cm)

h -altura de la columna dentro del capilar (cm)

g - gravedad (m/s^2)

r - radio del capilar (cm)

ρ - densidad del líquido (Kg/cm^3)

θ - el ángulo que forma el menisco

Figura 14. Técnica de capilaridad para calcular la tensión superficial (Tipler 1995).

Para la medición con el tensiómetro de DuNouy, se utilizaron 5 mL del sobrenadante libre de células de los medio del fermentador a los que luego se les introdujo el anillo de DuNouy. Se tomaron las lecturas de la resistencia ejercida por los medios al ir retirando el anillo. El tensiómetro utilizado fue de precisión (CSC científico).

V. 4. 6. Determinación del índice de emulsificación (E_{24})

Para evaluar esta característica se utilizó una relación 1:1 de aceite de soya con el sobrenadante de las muestras libres de células. Esta mezcla se agitó durante 2 min en vórtex (Vortex-Genie 2 Modelo No. G560) para luego dejarla reposar durante 24 h en un lugar sin perturbaciones. Pasado este tiempo se mide la altura de la emulsión estable mediante la expresión (Ramkrishna 2010).

$$\text{Índice } E_{24} = \frac{\text{Altura de la capa de emulsión}}{\text{Altura total de la columna del líquido}} \times 100$$

V. 4. 7. Extracción y determinación de surfactina por HPLC

Para la preparación de las muestras para HPLC se les ajustó a los sobrenadantes el pH a 2 con HCl 3N, se mantuvieron durante 12 h a 4 ° C. Pasado este tiempo se volvió a

centrifugaron a 9,000 rpm, 4 ° C durante 30 min, pero conservando la pastilla, la cual se resuspendió en metanol (1:50 con respecto al volumen original de la muestra). Se trasladó a tubos y reposó 4 h. Después se centrifugó a 11000 rpm durante 15 min, el sobrenadante se transfirió a otro tubo y se conservó en refrigeración, el pellet se resuspendió en el mismo volumen de metanol y se repitió el proceso, las muestras se conservaron en congelación hasta su análisis (Soriano 2013).

Los lipopéptidos extraídos se analizaron por HPLC, con el método de Effendy *et al.* (2015), [columna Chromolith RP-18 (100 X 4.6 mm, 5 µm) de alto rendimiento] operada y mantenida a 25 ° C. La mezcla de fase móvil fue una solución con ACN y 3.8 mM de TFA en relación 80:20 (modo isocrático, flujo de 2.2 mL/min). El volumen de inyección fue de 30 µL y fue determinado a través de un detector VWD a 205 nm.

V. 4. 8. Análisis estadístico

Se utilizó el software SAS 9.4 para realizar el análisis de varianza (Anova) en un diseño completamente al azar, para después hacer la comparación de medias de Tukey con un índice de confianza de 95 %.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI. 1 PRUEBAS PRELIMINARES DE LA CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE SURFACTINA

Para el inicio de este trabajo se contaba en la colección del grupo con distintas especies del género *Bacillus*, tales como *Bacillus subtilis* CDBB-B39, *Bacillus subtilis* CDBB-555, *B. amyloliquefaciens*, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD37, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 y *B. licheniformis*. Estas cepas fueron tomadas como referencia para comparar mediante morfología colonial (Figura 15) y tinción de Gram (Figura 16) a las cepas aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos y a la cepa aislada del producto industrial la cual es utilizada para el control biológico de hongos fitopatógenos. Se seleccionaron las más similares a *B. subtilis* denominándolas como TA, TB y 161212 para las muestras de suelo y AQ para la cepa industrial.

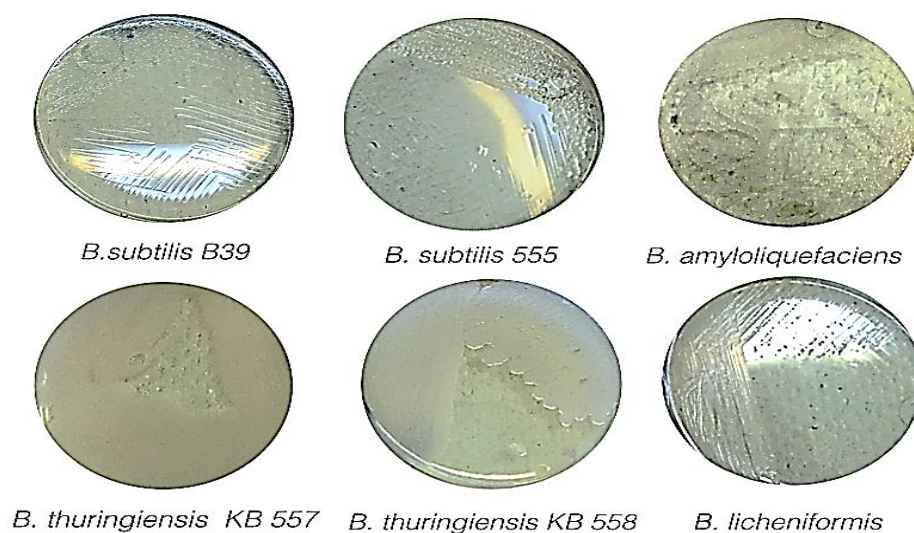


Figura 15. Diferentes morfologías coloniales de cepas del género *Bacillus* sp.

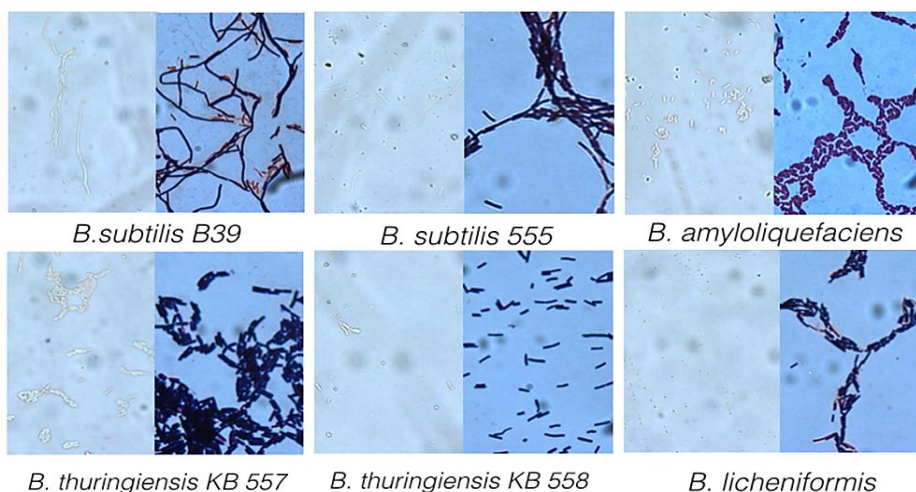


Figura 16. Muestras de tinción de Gram y examen en fresco de las diferentes especies de *Bacillus*.

Los resultados de las pruebas de caracterización se observan en la Tabla 8. En el caso de la prueba de hemólisis 3 cepas dieron positivas, CDBB39, CDBB555 y TA debido a que produjeron una zona hemolítica clara a su alrededor por el rompimiento de la membrana de los hematíes del medio, lo cual puede atribuirse a la producción de biosurfactantes por parte de estas bacterias como lo mencionaron Ghribi *et al.* (2012) en sus trabajos donde sugieren que esta hemólisis es provocada por la interacción electrostática entre la parte hidrofílica (catiónica) del biosurfactante y la carga negativa de la membrana del hematíe, encontrando que la capacidad de producción de biosurfactantes está asociada con la actividad hemolítica.

Tabla 8. Resultados de la caracterización de las cepas cultivadas en Caldo Nutritivo a pH 6.86.

	CDBB39	CDBB555	161212	TA	TB	AQ	B. subtilis
Tinción Gram	BGP	BGP	BGP	BGP	BGP	BGP	BGP
Formación de esporas	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Xilosa	+	+	-	+	-	+	+
Lecitinasa	-	-	+	-	+	-	-
Citrato	+	+	-	+	-	+	+
Movilidad	+	+	+	+	-	+	+
Hemólisis	+	+	-	+	-	-	+

(BGP) Bacilos Gram positivos; (+) Positivo a la prueba; (-) Negativo a la prueba. La caracterización de *Bacillus subtilis* fue tomada del Manual *Bergey's*

De las cepas restantes la 161212 y TB también dieron negativo para las pruebas de xilosa y citrato, y positivo para lecitinasa por lo que según la caracterización del Manual *Bergey's* estas no correspondían a *Bacillus subtilis*, así que a pesar de tener una morfología colonial parecida se decidió prescindir de ellas. Las demás CDBB39, CDBB555, TA y AQ fueron identificadas como *Bacillus subtilis*, y se utilizaron en la siguiente etapa del trabajo. Se les inoculó en Caldo Nutritivo a pH 6.86, con temperatura de 30 °C a 200 rpm durante 24 h con el fin de reactivarlos y poder realizar una nueva prueba de hemólisis (Figura 17). En esta prueba nuevamente la cepa AQ dio negativo a hemólisis, pero debido a que al comparar su morfología colonial con el de la colección del grupo, está presentó mayor similitud por lo que nuevamente se le consideró para las cinéticas de germinación.

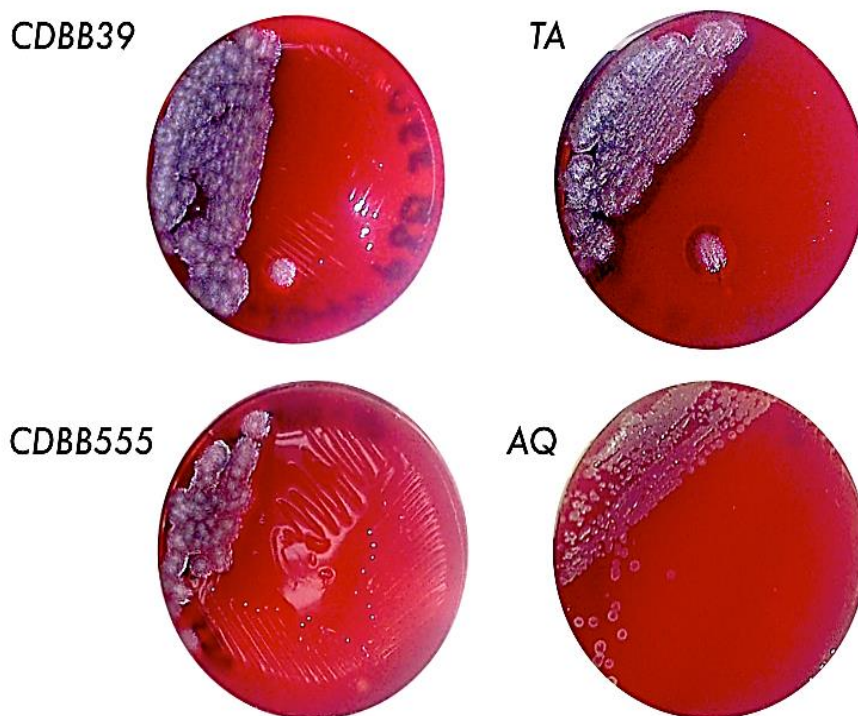


Figura 17. Presencia de hemólisis en las cepas CDBB39, CDBB555, TA y AQ sembradas en Caldo Nutritivo a pH de 6.86.

Las cinéticas de germinación se realizaron para establecer los tiempos de propagación y comportamientos a nivel matraz para las pruebas posteriores. Estas fueron en Caldo Nutritivo a 30 °C, 200 rpm y ahora a un pH 7.2 (Figura 18). La cepa TA obtuvo un máximo de $1.32E+08$ células/mL y 13 h de inicio de fase exponencial, CDBB39 $3.87E+08$ células/mL y 7 h de inicio de fase, la cepa CDBB555 inicio su crecimiento exponencial a las 14 h y obtuvo cuentas celulares de $3.41E+07$ células/mL y mientras que la cepa AQ, que mostró un mejor comportamiento en cuanto a su curva de crecimiento, inicio su fase exponencial a las 10 h y alcanzó un crecimiento significativo de $1.83E+08$ células/mL a las 18 h. Estas diferencias entre el inicio de la fase exponencial y la cantidad de células son debidas a la carga genética propia de cada microorganismo que también está implicada en la producción de biosurfactantes, como lo menciona Ramkrishna (2010), pues dos microorganismos del mismo género y especie pero provenientes de dos diferentes hábitats pueden producir diferentes isoformas de biosurfactantes para sustentar su crecimiento en un medio ambiente particular. Un grupo de biosurfactantes podría tener una ventaja en un específico nicho ecológico, mientras que otro grupo podría no ser apropiado para este.

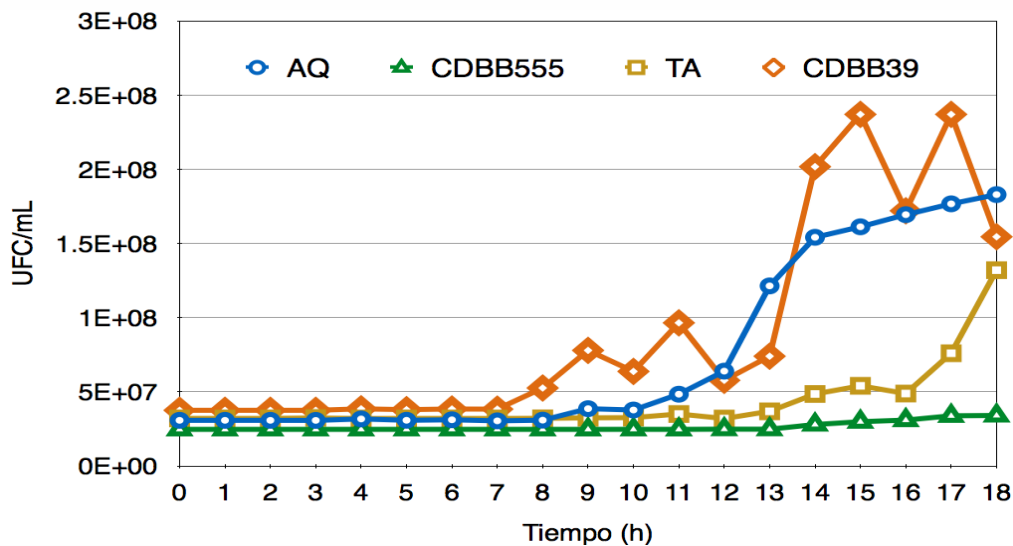


Figura 18. Cinética de germinación de las diferentes cepas de *Bacillus subtilis* AQ, CDBB555, TA y CDBB39.

Se realizó el monitoreo de los medios y se evaluaron los parámetros de actividad superficial, por la prueba de colapso por gota y hemólisis. La prueba de colapso por gota, descrita previamente, consiste en la desestabilización de la superficie hidrofóbica de un líquido a causa de la interacción con biosurfactantes, es decir si el sobrenadante no contiene biosurfactantes al interactuar con la capa de aceite de la placa provocará que las moléculas polares del sobrenadante se repelan a la superficie hidrofoba de la capa de aceite y la gota de sobrenadante se mantenga estable (Figura 19 a), pero si contiene biosurfactantes las gotas se extienden o incluso colapsan por la disminución de la tensión superficial y la formación de micelas (Figura 19 c) (Ramkrishna 2010).

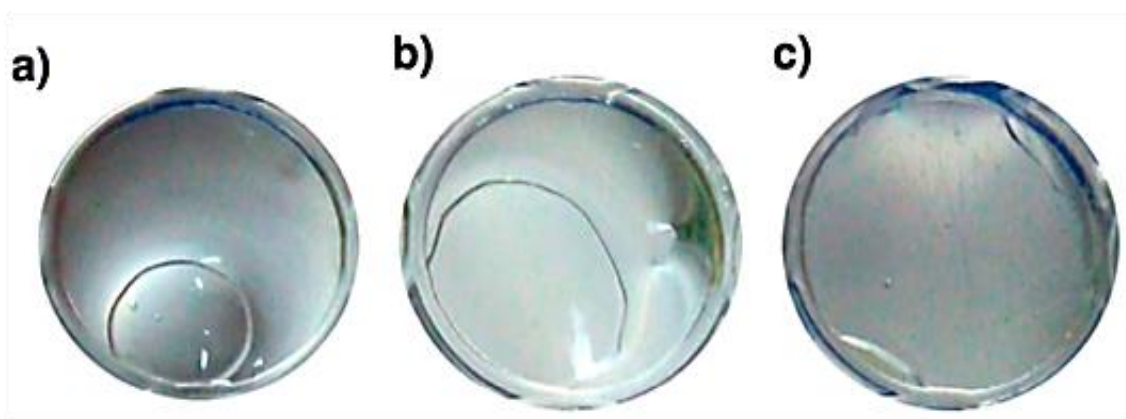


Figura 19. Prueba de colapso de gota. a) Control negativo con agua, b) Resultado positivo en una escala de 2 con la cepa AQ obtenida de un cultivo en Caldo Nutritivo a pH de 7.2, c) Control positivo con de lauril sulfato de sodio al 5%, se observa como la gota cubre todo el círculo.

En los medios únicamente se observó presencia de tensión superficial a las 18 h de incubación por parte de la cepa AQ (Tabla 9) con un resultado de dos. Por otro lado la

cinética de la Figura 16, muestra que la cepa AQ inicia su fase exponencial a partir de las 10 h de incubación, donde da inicio a la producción de surfactina. Esta falta de tensión superficial puede deberse a que el Caldo Nutritivo no tiene una fuente de carbono que le ayude a las bacterias a producir biosurfactantes. Los trabajos de Batista *et al.* (2005) apoyan este argumento, ya que en medios con diferentes fuentes de carbono observaron que había un mejor crecimiento y producción de biosurfactantes en los enriquecidos con glucosa, y solo crecimiento sin producción de biosurfactantes en los que contenían fructosa. Por lo que una fuente adecuada de carbono es muy importante para que exista una producción de biosurfactantes y por lo tanto un cambio en la tensión superficial.

Tabla 9. Resultados de la cinética de germinación de las cepas de B. subtilis CDBB39, CDBB555, TA y AQ en Caldo Nutritivo a pH de 7.2.

Tiempo (h)	B. subtilis CDBB39		B. subtilis CDBB555		B. subtilis TA		B. subtilis AQ	
	Actividad superficial (Colapso por gota)	Hemólisis	Actividad superficial (Colapso por gota)	Hemólisis	Actividad superficial (Colapso por gota)	Hemólisis	Actividad superficial (Colapso por gota)	Hemólisis
1	-	-	-	-	-	+	-	+
2	-	-	-	-	-	-	-	+
3	-	-	-	-	-	-	-	+
4	-	-	-	-	-	+	-	+
5	-	-	-	-	-	+	-	+
6	-	-	-	-	-	+	-	+
7	-	-	-	-	-	+	-	+
8	-	-	-	-	-	+	-	+
9	-	-	-	-	-	+	-	+
10	-	-	-	-	-	+	-	+
11	-	-	-	-	-	+	-	+
12	-	-	-	-	-	+	-	+
13	-	-	-	-	-	-	-	+
14	-	-	-	-	-	-	-	+
15	-	-	-	-	-	-	-	+
16	-	-	-	-	-	-	-	+
17	-	-	-	-	-	-	-	+
18	-	-	-	-	-	-	2	+

(+) Positivo a la prueba, (-) Negativo a la prueba

En cuanto a la hemólisis, en esta prueba solo las cepas TA y AQ fueron positivas (Tabla 9 y Figura 20). La razón fue por el cambio de pH en este medio, pues mientras en la primera prueba se manejó un pH de 6.86, en esta última fue de 7.2. Batista *et al.* (2005) menciona que los factores nutricionales y de crecimiento (pH, temperatura, limitación de nutrientes y elementos traza) afectan la producción de biosurfactantes por lo que esto puede ser la explicación del porqué de este comportamiento.

Por lo que al realizar un cotejo de los resultados se determinó que la cepa AQ era la más adecuada para continuar con los experimentos ya que fue positiva a la presencia de hemólisis a pH de 7.2, tuvo presencia de actividad superficial a diferencia de las demás cepas y un mejor comportamiento en la curva de crecimiento.

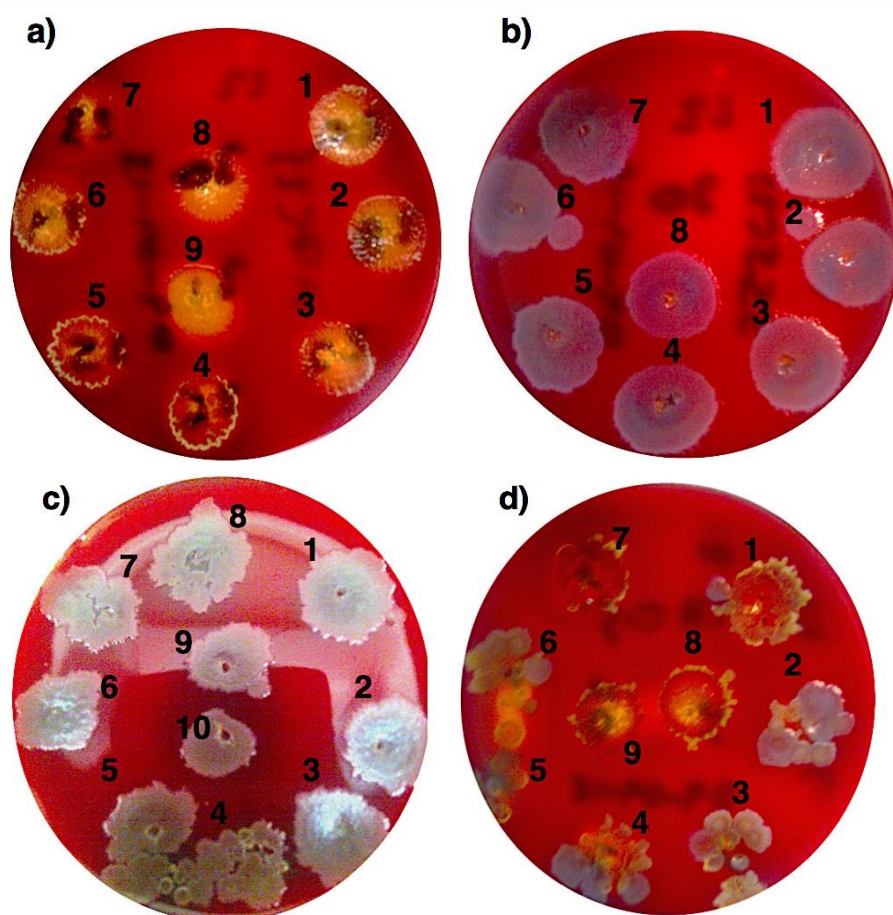


Figura 20. Evaluación de hemólisis en agar sangre carnero de las diferentes cepas bacterianas evaluadas cada hora provenientes de la cinética de matraz en Caldo Nutritivo. a) AQ, b) CDBB 555, c) CDBB39 y d) TA

VI. 2. Cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* AQ

Para realizar esta etapa del trabajo se usó el medio KSAH con una glucosa inicial de 40 g/L, basándose en los estudios de Ghribi y Ellouze-Chaabouni (2011), donde observaron un incremento lineal en la producción de biosurfactantes llegando hasta 720 mg/L, siendo este el mejor rendimiento en comparación a los demás concentraciones de glucosa y fuentes de carbono usadas. Se sustituyó en este medio la harina de soya por peptona de soya debido a la gran cantidad de espuma que está genera a nivel fermentador, lo cual aunado con la producción de biosurfactantes de *Bacillus subtilis* provocó problemas en el control del medio. Tanto al medio KSAH con C:N de 11.6, como a el medio Landy con C:N de 8 se les tomaron muestras cada hora para realizar las pruebas de actividad superficial, producción de biosurfactantes, velocidad de crecimiento y actividad biológica.

Usando la cepa AQ se realizaron las cinéticas de crecimiento en los medios KSAH, Landy y Caldo Nutritivo a pH de 7.2 y con un preinóculo a partir de un cultivo en Caldo Nutritivo durante 12 h a pH 7.2, 140 rpm y 30° C. Los resultados de la cinética (Figura 21) mostraron que el medio KSAH tiene una fase de crecimiento exponencial que dura 4 h y crecimiento máximo de 3.34E+08 células/mL, el Caldo Nutritivo obtuvo 4.27E+08 células/mL a las 8 h de inoculación, mientras que en Landy se inició su fase exponencial a partir de las 3 h llegando a un crecimiento máximo de 7.29E+07 células/mL, obteniendo el menor crecimiento de los tres medios que puede ser debido a la falta de oxígeno disuelto en el medio.

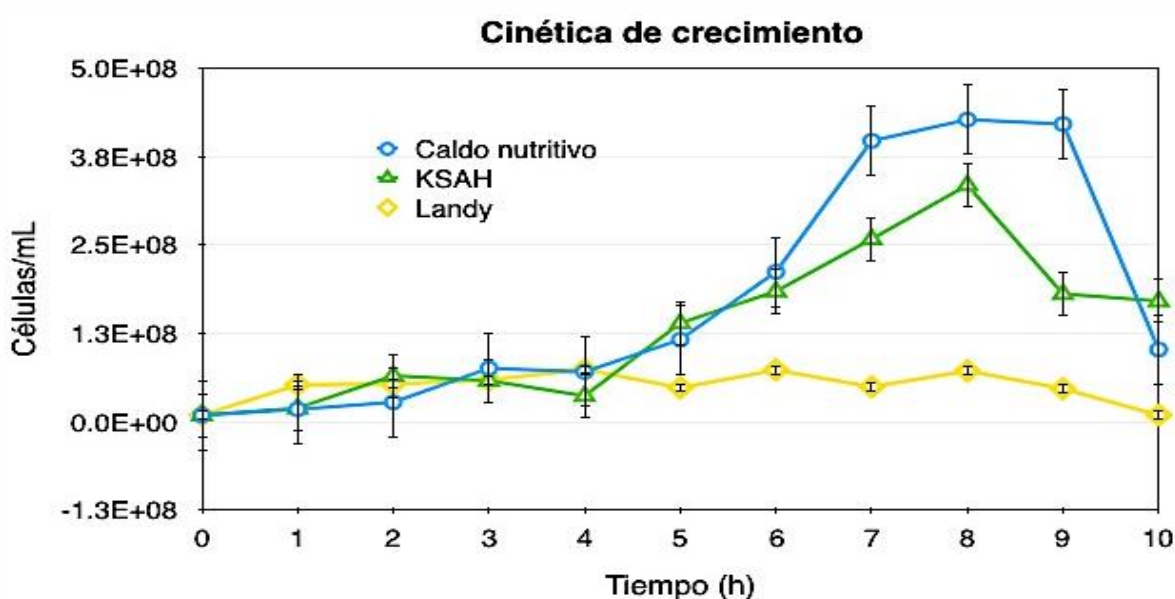


Figura 21. Cinética de crecimiento *Bacillus subtilis* AQ en Caldo Nutritivo, Landy y KSAH.

La evaluación de la actividad hemolítica se realizó con las muestras tomadas cada hora de los medios KSAH, Landy y Caldo Nutritivo. Se colocaron alícuotas de 10 μ L de sobrenadante sobre placas de agar sangre carnero y se dejó incubar durante 48 h. En esta prueba se encontró que la bacteria de *Bacillus subtilis* AQ fue positiva después de las 48 h de incubación, siendo el medio KSAH el de mejores resultados (Figura 22 c y d), lo que podría indicar que en este medio existe una mayor producción de biosurfactantes y por lo tanto de surfactina. Para verificarlo se usó un filtro de 0.22 μ m para quitar los rastros celulares del sobrenadante y luego se inoculo en placas de agar sangre carnero (Figura 22 g). Se utilizó como control positivo el estándar de surfactina con 98 % de pureza (Figura 22 h).

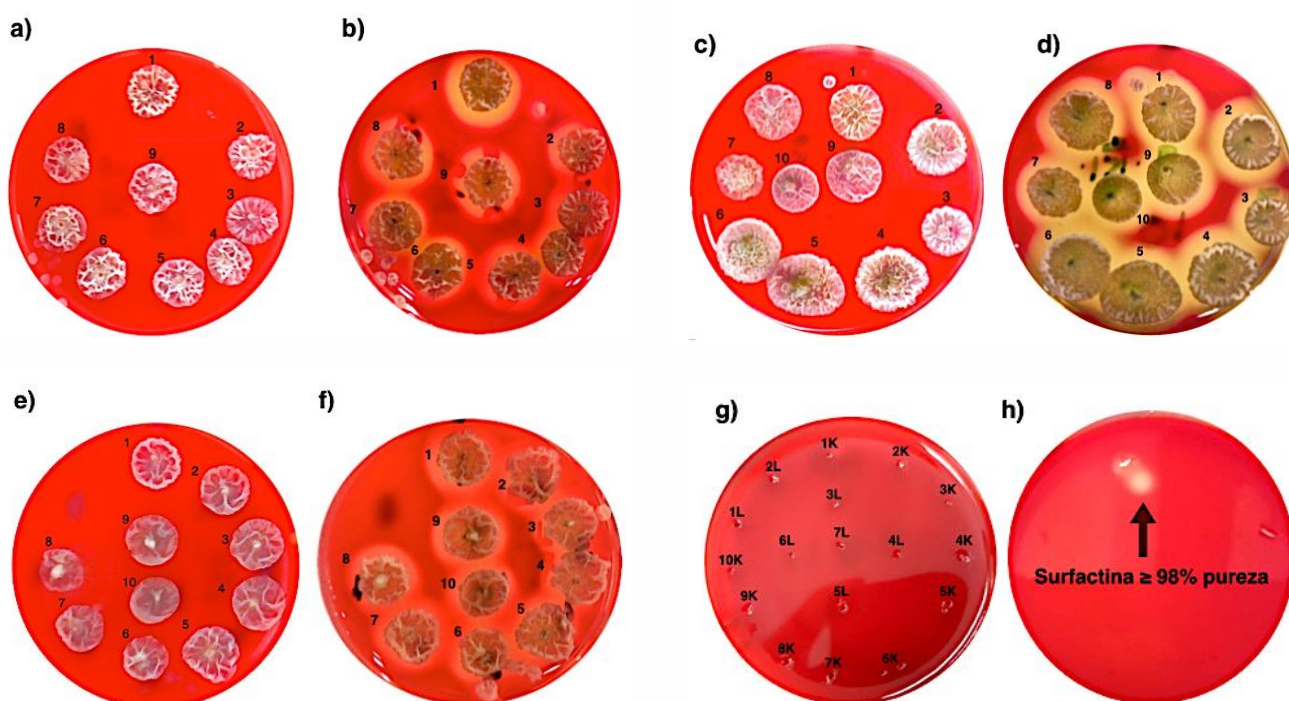


Figura 22. Evaluación de hemólisis en agar sangre carnero de la cepa *Bacillus subtilis* AQ proveniente de diferentes medios de crecimiento (Caldo Nutritivo, KSAH y Landy). La evaluación se hizo cada hora y se observó a las 24 y 48 h de incubación. a) Caldo Nutritivo a las 24 h, b) Caldo Nutritivo a las 48 h, c) KSAH a las 24 h, d) KSAH a las 48 h, e) Landy a las 24 h, f) Landy a las 48 h, g) Sobrenadante libre de células de los medios KSAH (K) y Landy (L) a diferentes horas de toma de muestra, h) Estándar de surfactina.

Los resultados de esta prueba fueron negativos a las 72 h, lo cual es atribuido a la cantidad de biosurfactante producido como lo mencionan los estudios realizados por Ongena y Jacques (2007) sobre vesículas lipídicas, donde se observó que a bajas concentraciones de surfactina [Surfactina-lípido relación molar (Rb) <0.04 en la membrana], solo se produce una perturbación limitada en la célula porque la surfactina solo se inserta en la parte externa de la membrana. A concentraciones intermedias (Rb 0.05-0.1) se provoca una permeabilización transitoria, pero las membranas se recuperan. A relaciones más altas (Rb 0.1-0.2) se hace una formación de poros irreversibles debido a la inserción

de grupos ricos en surfactina en la membrana. Finalmente cuando alcanzan su CMC, se produce una interrupción y solubilización completas de la bicapa lipídica con formación de micelas mixtas (a Rb 0.22). Curiosamente, si hay presencia de colesterol en la capa de fosfolípidos se atenúa el efecto desestabilizador de las surfactinas, lo que sugiere que la susceptibilidad de las membranas biológicas puede variar de una manera específica dependiendo del contenido en esteroides de los organismos diana.

Al mismo tiempo este proceso de desestabilización de la bicapa lipídica es facilitado por la forma tridimensional de la surfactina debido a las cadenas laterales cargadas que sobresalen en la fase acuosa y restos apolares que alcanzan el núcleo hidrofóbico de la membrana. Lo cual podría explicar por qué las surfactinas muestran actividades hemolíticas, antivirales, anti-micoplasma y antibacterianas, pero intrigantemente no una fungotoxicidad marcada. Por lo tanto en vista de lo anterior al no poder observarse la presencia de hemólisis hasta concentraciones de biosurfactante o surfactina elevadas y con altos grados de pureza se decidió que esta prueba no ayudaría a conocer en qué momento comienza la producción de biosurfactantes por lo que se decidió prescindir de la prueba.

En cuanto a la evaluación de la actividad superficial (Figura 23), el medio con mejores resultados fue Landy con una actividad de 4 y un conteo celular de $7.39E+07$ células/mL, lo que coincide con lo reportado por Mejia (2008) y con Maget-Dana *et al.* (1992) donde mencionan que a altas actividades superficiales se encuentran cuentas celulares bajas. Esto es debido a la activación del sistema quorum sensing de la célula, que al detectar densidades celulares bajas este activa a los genes involucrados como el ComX, como lo menciona Rojas en 2011. Para activar este sistema es necesario que las bacterias detecten a las moléculas circunvecinas y se inicie la señalización celular. Así dependiendo de si el medio es sólido o líquido será el tiempo en que inicie la producción de biosurfactantes, por lo que este mecanismo también explica el por qué en la prueba de hemólisis no pudo detectarse el efecto hasta pasadas las 48 h de incubación (Figura 22).

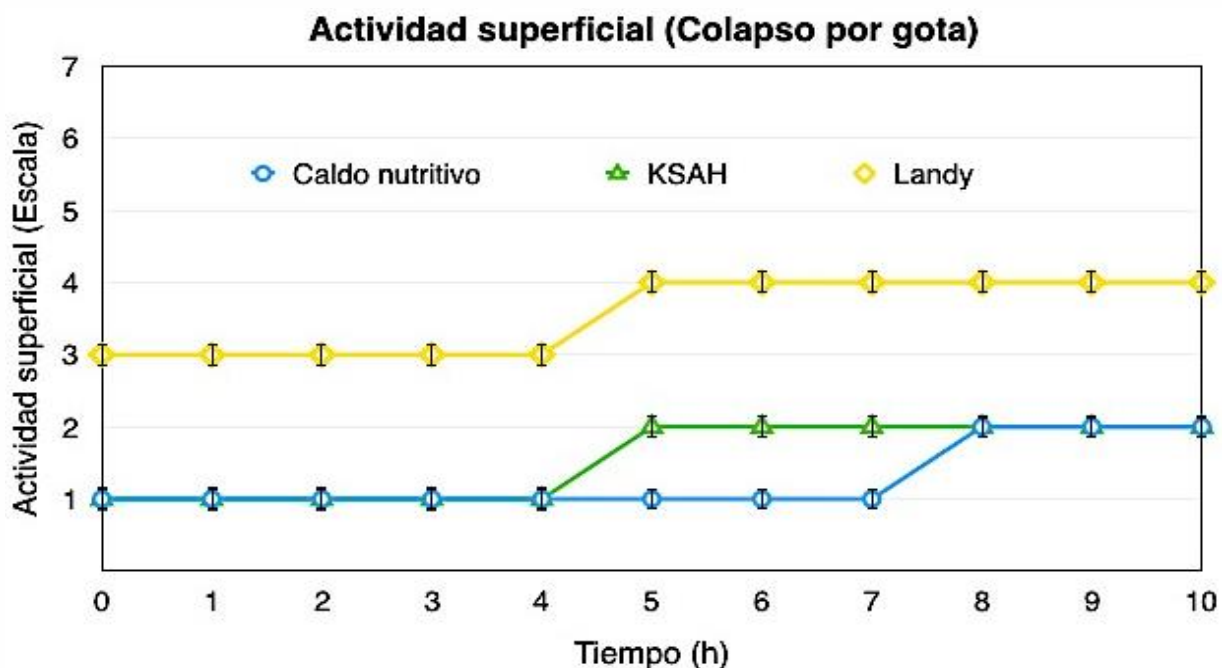


Figura 23. Comparativo de las actividades superficiales provocadas por *Bacillus subtilis* AQ en Caldo Nutritivo, KSAH y medio.

Las pruebas de inhibición se hicieron al mismo tiempo que las pruebas anteriores, utilizando a *S. cerevisiae*, *Phytum* sp. y *Fusarium* sp. En la Figura 24 se observan algunos ejemplos de los resultados de esta prueba donde se puede observar que si existe inhibición por parte del sobrenadante. La primer estrategia de inoculación consistió en agregar 10 μ L de muestra directamente sobre la placa ya inoculada con los correspondientes hongos, pero se observó que este modo de inoculación no era uniforme por lo que fue cambiada.

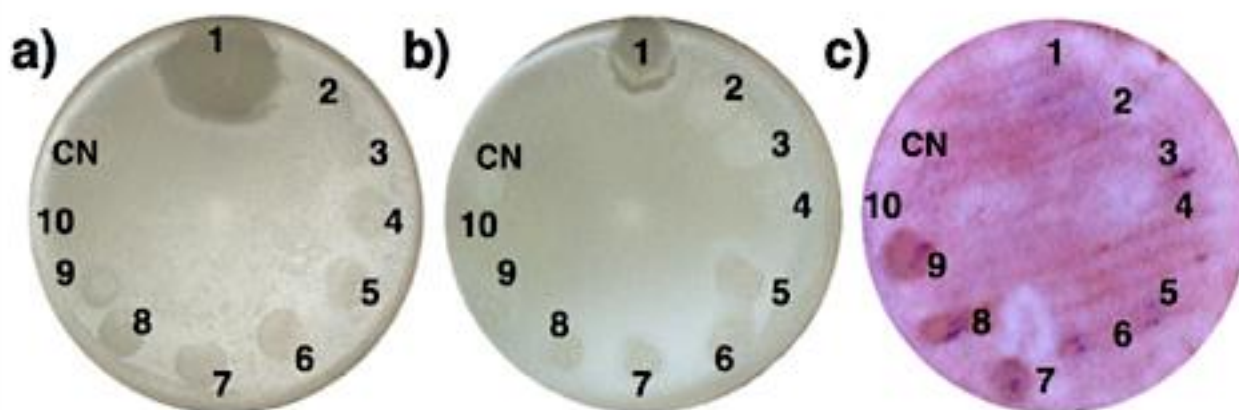


Figura 24. Pruebas de inhibición por inoculación directa contra diferentes microorganismos. a) *S. cerevisiae* b) *Phytum* sp. c) *Fusarium* sp. CN - control negativo. El sobrenadante fue de la cinética de Caldo Nutritivo.

Los resultados de esta estrategia (Figuras 25) mostraron que en Caldo Nutritivo no se producen biosurfactantes con actividad biológica ni superficial, a pesar de que a la primer hora los halos de inhibición de *S. cerevisiae* y *Phytum* sp. fueron significativos, lo cual es

debido que en el momento de inoculación el sobrenadante desplazó a los microorganismos de la placa. A pesar de esto se observó que los mejores rendimientos en *S. cerevisiae* y *Phytum sp.* fueron en el medio KSAH, posiblemente porque en el medio Landy la fuente de carbono usada es almidón y por lo tanto es más difícil para las bacterias utilizar este polisacárido para asimilarlo. Por otro lado, el medio Landy fue el que mostró mejor inhibición contra *Fusarium sp.* coincidiendo con su elevación en la actividad superficial comprobando que existe una relación entre esta y la formación de biosurfactantes en este medio de cultivo.

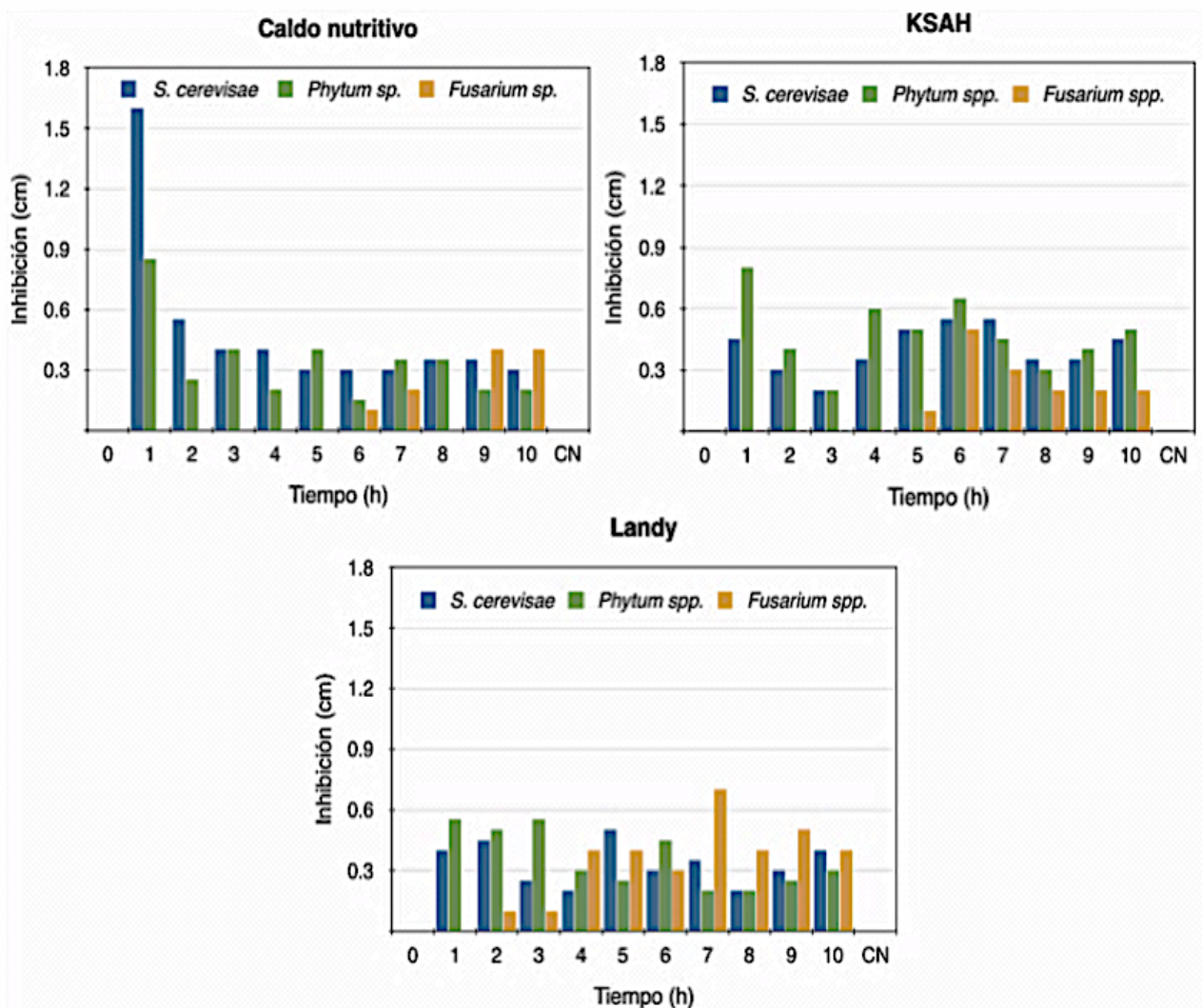


Figura 25. Inhibición de las cepas *Saccharomyces cerevisiae*, *Phytum sp.* y *Fusarium sp.* causada por la cepa *Bacillus subtilis* AQ provenientes de Caldo Nutritivo, medio KSAH y medio Landy. CN es el control negativo el cual fue agua destilada estéril.

La segunda estrategia de inoculación fue mediante el empleo de discos estériles a los que se les colocó 10 μ L de sobrenadante libre de células (Figura 26), pero a pesar de que se observaron halos de inhibición estos no fueron uniformes y solo demostraban la producción de biosurfactantes pero no el tipo de biosurfactante ya que *Bacillus subtilis*

también produce iturina, fengicina y micosubtilina, por lo que se decidió también prescindir de esta prueba en este trabajo.



Figura 26. Prueba de inhibición por inoculación con discos de papel contra *S. cerevisiae* utilizando el medio KSAH.

VI. 3. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO CON DIFERENTES RELACIONES DE C:N Y CST CON *Bacillus subtilis* AQ A NIVEL MATRAZ

Una vez observado el comportamiento de los medios KSAH, Landy y Caldo Nutritivo, se modificó la relación de C:N a 11, 15 y 20. Por otro lado, debido a que Mejia (2008) observó en el medio KSAH, que la cantidad de biomasa está relacionada a una alta CST, se hicieron variaciones en las relaciones de sólidos totales a nivel matraz de 100% a la mitad (50%) y a un tercio (33.3%) de CST conservando siempre la relación de C:N correspondiente para evaluar su efecto en los dos medios. A continuación se describen los experimentos a nivel matraz.

VI. 3.1 CINÉTICAS CON MEDIO KSAH

VI. 3. 1. 1 MEDIO KSAH CON RELACIÓN C:N 11

Los primeros experimentos se realizaron con el medio KSAH a nivel matraz. En este medio, cuyas variaciones según las diferentes CST se muestran en la Tabla 10, se encontró que en KSAH a CST 50% se obtuvieron $7.75E+08$ células/mL obteniéndose el mayor rendimiento en biomasa a C:N 11 (Figura 27), pero en lo correspondiente a actividad superficial quien mostró mejor actividad fue KSAH C:N 11 a CST 100% a las 16 h con un valor de actividad superficial de 3 y $1.9E+08$ células/mL a esta hora (Figura 27 y 28), lo cual confirma que la producción de biosurfactantes es inversamente proporcional a la cantidad de biomasa.

Tabla 10. Relación de las diferentes variaciones de CST del medio KSAH a C:N 11

Componentes	CST 100% (g/L)	CST 50% (g/L)	CST 33.3% (g/L)
Glucosa	40	20	13.33
Carbonato de amonio	9	4.5	3
Peptona de soya	6.58	3	1.8
CST de sales	13.29	13.29	13.29
CST Final	68.87	40.79	31.42

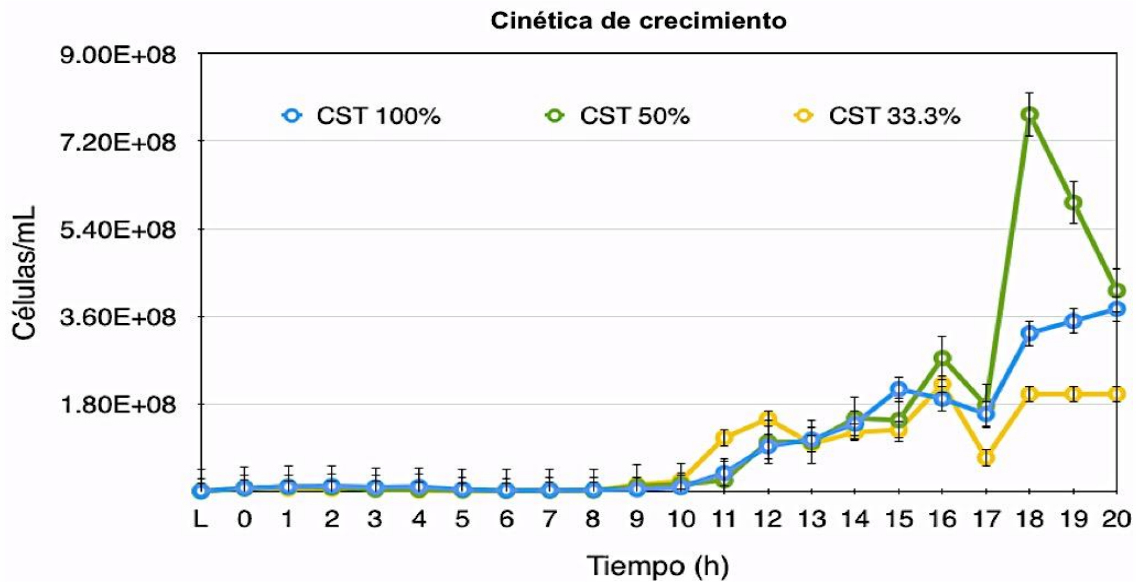


Figura 27. Cinética de *Bacillus subtilis* AQ en KSAH a C:N 11.

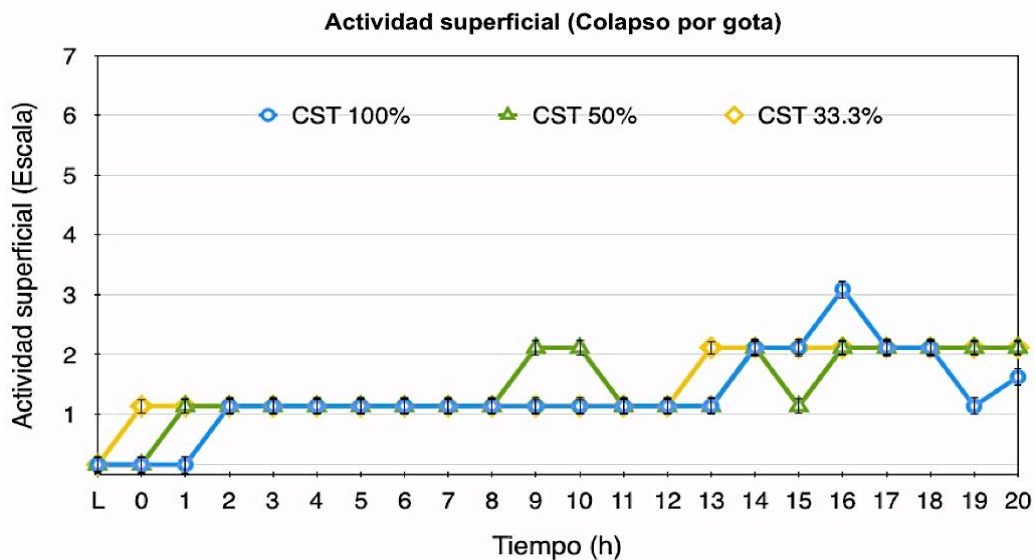


Figura 28. Actividad superficial de *Bacillus subtilis* AQ en KSAH a C:N 11 con la técnica de colapso por gota.

En el transcurso de la cinética en matraz en el medio KSAH con C:N 11, se observó que a las 8 h comenzó el alargamiento de los bacilos, a las 11 inició la producción de espuma, coincidiendo con el inicio de la fase exponencial, a las 17 h el tamaño de los bacilos empezó a decrecer y al final de la cinética algunos bacilos mostraron una apariencia deforme, mientras que otros tenían un tamaño muy pequeño casi imperceptible, además de que la cantidad de espuma era considerable, y el medio era muy viscoso, lo cual está relacionado al comportamiento que tiene la bacteria al producir biosurfactantes.

Para verificar el comportamiento en los medios de cultivo se utilizó la prueba de tensión superficial mediante capilaridad, la cual es el resultado de la elevación o depresión

de un líquido en un tubo estrecho causado por la tensión superficial de un líquido. Cuando un interfaz gas-líquido toca una superficie sólida, la interfaz se curva hacia arriba o abajo provocando la formación de un menisco según sea la naturaleza del líquido, y es esta cualidad de elevación que ayuda a medir el aumento o decremento de la tensión superficial (Jiménez 2012). En el caso de este medio en particular se observó un decremento en los tres medios de cultivo (Figura 29) lo cual se relaciona con la producción de biosurfactantes. Al comparar estas muestras o tratamientos con los valores del agua como control negativo (tensión superficial o $\sigma = 91$ din/cm a 25°C) y con el estándar de surfactina ($\sigma = 34.88$ din/cm a 25°C) como control positivo se observó que los valores de los tratamientos KSAH a C:N 11 son cercanos a los de surfactina lo que puede indicar que existe producción de surfactina en estas condiciones.

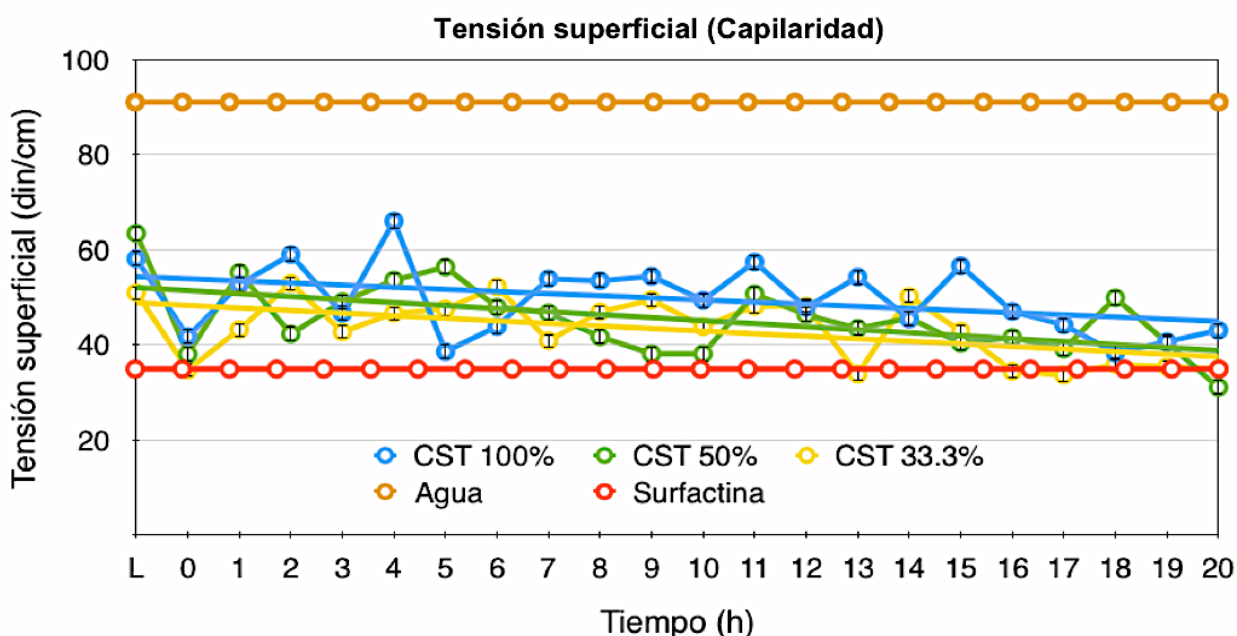


Figura 29. Tensión superficial de *Bacillus subtilis* AQ en KSAH a C: N 11 por la técnica de capilaridad.

VI. 3. 1. 2 MEDIO KSAH CON RELACIÓN C:N 15

En este medio (Tabla 11) se encontró que la mayor producción de biomasa fue también a CST 50 % llegando a $1.88E+10$ células/mL (Figura 30 y 31) a las 23 h de incubación. En general la cantidad de biomasa generada a C:N 15 en este medio supero a la KSAH C:N 11 a las diferentes CTS, lo cual podría sugerir que la actividad superficial y la tensión superficial deberían ser menores en estos medios, sin embargo mostraron comportamientos muy superiores en cuanto a actividad superficial (Figura 32) teniendo en los tres tratamientos de KSAH C:N 15 un valor de 5 en las escala de 7 a las 26 h de

incubación lo que puede ser el efecto de la acumulación de los demás biosurfactantes que también produce la *B. subtilis*.

Tabla 11. Relación de las diferentes variaciones de CST del medio KSAH a C:N 15

Componentes	CST 100% (g/L)	CST 50% (g/L)	CST 33.3% (g/L)
Glucosa	40	20	13.33
Carbonato de amonio	4	2	1.33
Peptona de soya	6.58	3.05	1.87
CST de sales	13.29	13.29	13.29
CST Final	63.87	38.34	29.82

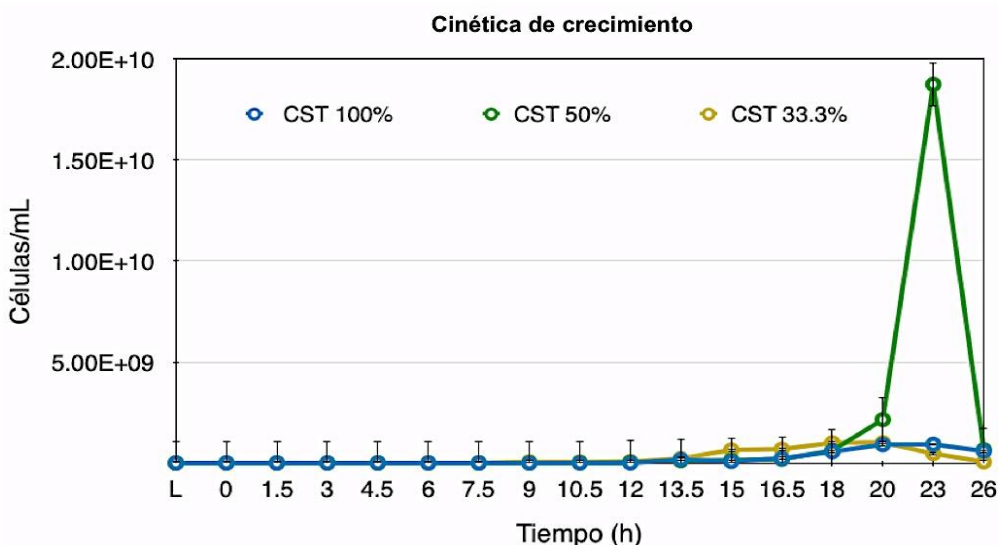


Figura 30. Cinética de *Bacillus subtilis* AQ en KSAH a C: N 15.

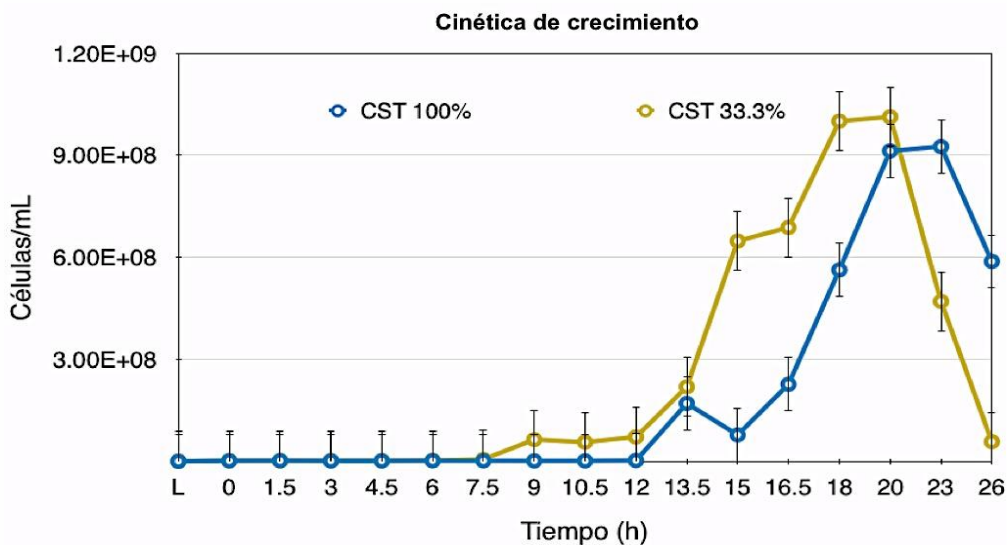


Figura 31. Cinética de *Bacillus subtilis* AQ en KSAH a C: N 15 con CST a 100 y 33.3 %.

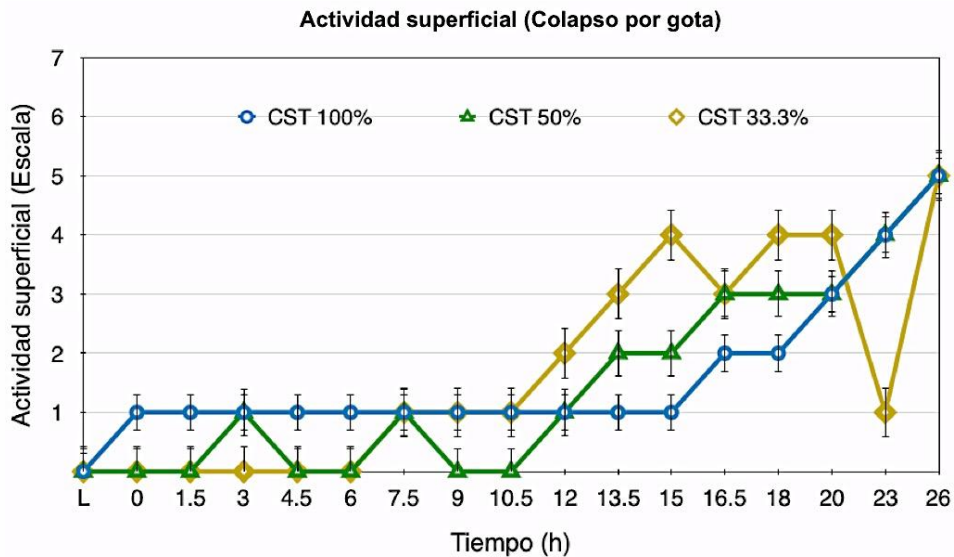


Figura 32. Actividad superficial de *Bacillus subtilis* AQ en KSAH a C: N 15 con la técnica de colapso por gota.

Por otro lado se observa que hay una relación entre el incremento de la actividad superficial y la aparición de la fase exponencial en los tres casos, sin embargo la presencia de la gran cantidad de biomasa que se produjo en KSAH C:N 15 a CST 50% no significa que la actividad superficial de este tratamiento fuera mayor. Sobre a su velocidad de crecimiento el medio que presentó un mejor comportamiento fue el KSAH C:N 15 con CST de 100% con una μ de $1.09 \text{ (h}^{-1}\text{)}$, siguiéndole KSAH C:N 15 CST 50% con μ de $0.96 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ y finalmente KSAH C:N 15 CST 33.3% con μ de $0.68 \text{ (h}^{-1}\text{)}$. En cuanto a la tensión superficial (Figura 33) se observó que también tiende a disminuir como ocurrió en los tratamientos de KSAH C:N 11, y que solo se observan valores cercanos a los de surfactina hasta el final de la etapa de crecimiento cuando, a su vez, los valores de la actividad superficial son más elevados. Esto puede indicar que los biosurfactantes producidos en mayor cantidad no son de la familia de la surfactina sino más bien de otro tipo.

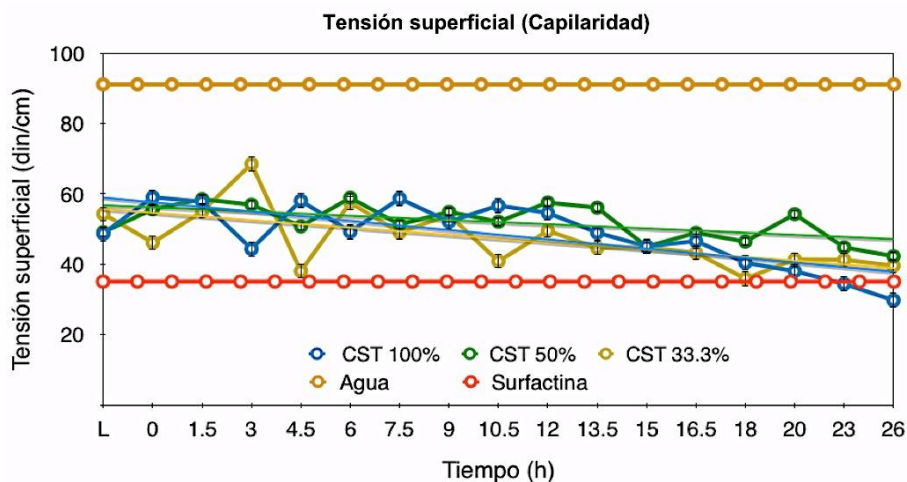


Figura 33. Tensión superficial de *Bacillus subtilis* AQ en KSAH a C: N 15 por la técnica de capilaridad.

VI. 3. 1. 3 MEDIO KSAH CON RELACIÓN C:N 20

En este tratamiento se usaron las relaciones de fuentes de carbono y de nitrógeno que se observan en la Tabla 12. En la Figura 34 y 35 se encuentra el comportamiento del crecimiento microbiano, que en el caso de KSAH C:N 20 a CST 100 y 50% fue muy errático, pero en con el medio de KSAH C:N 20 CST 33.3% se observó un incremento de biomasa iniciada a las 16 h de incubación y llegando a ser de 9.25×10^7 células/mL, lo cual no superó a KSAH C:N 15 CST 50%.

Tabla 12. Relación de las diferentes variaciones de CST del medio KSAH a C:N 20

Componentes	CST 100% (g/L)	CST 50% (g/L)	CST 33.3% (g/L)
Glucosa	40	20	13.33
Carbonato de amonio	6	3	2
Peptona de soya	1.92	0.7	0.3
CST de sales	13.29	13.29	13.29
CST Final	61.21	36.99	28.92

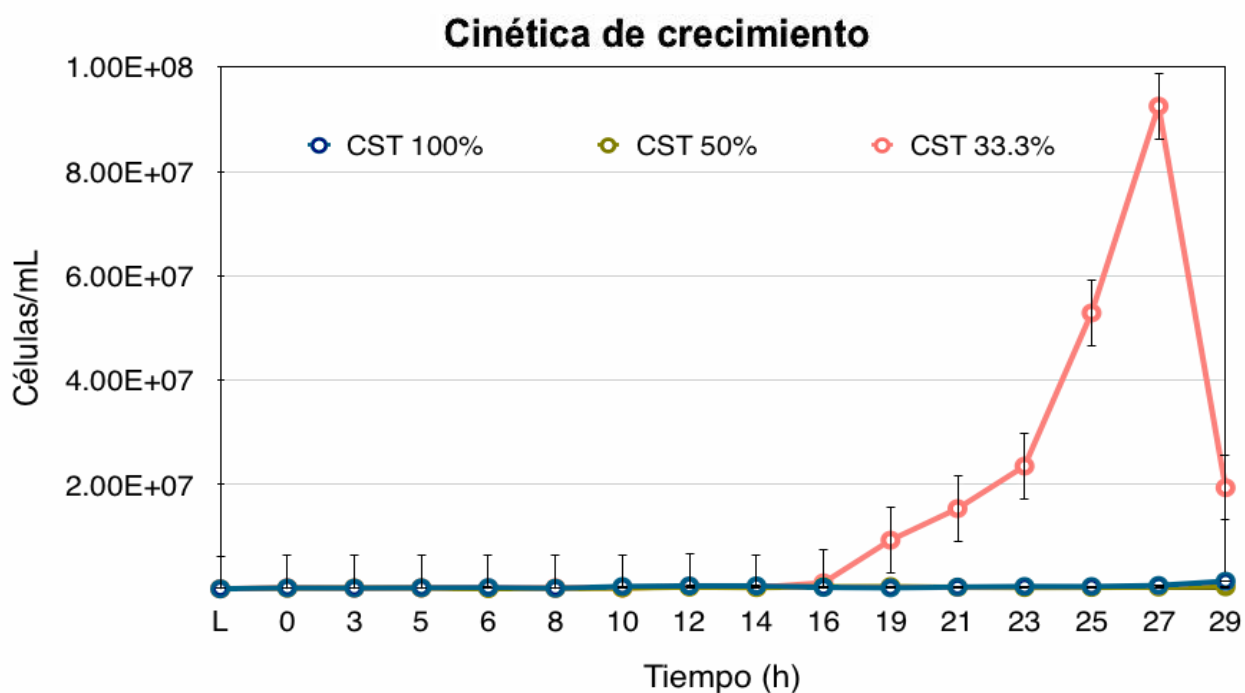


Figura 34. Cinética de *Bacillus subtilis* AQ en KSAH a C:N 20.

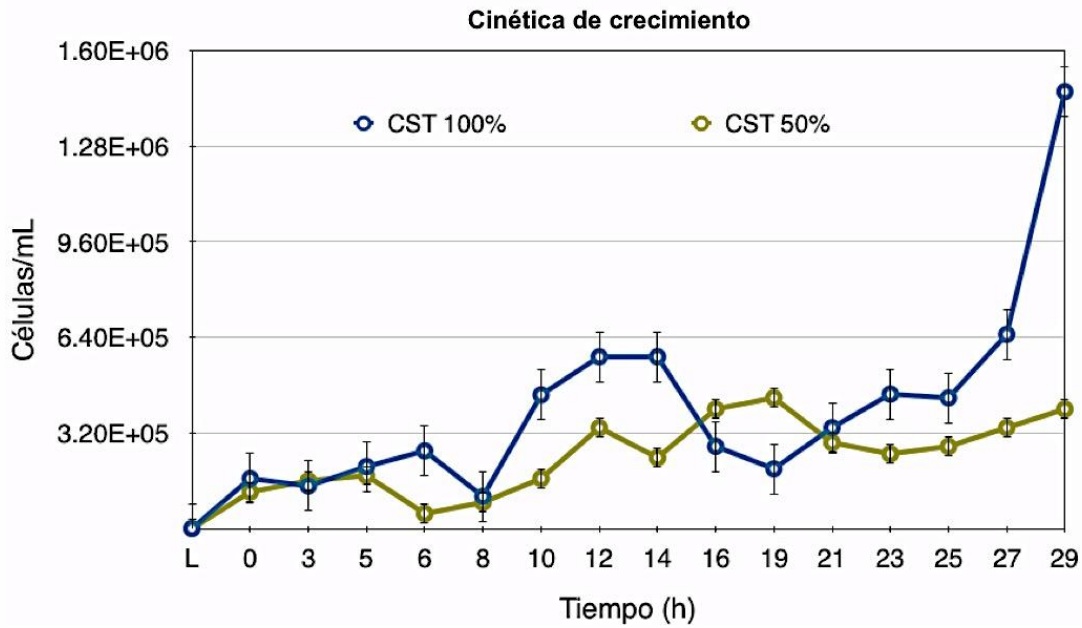


Figura 35. Cinética de *Bacillus subtilis* AQ en KSAH a C:N 20 a CST 100 y 50%.

En cuanto a los valores de la actividad superficial el máximo valor que se obtuvo de los tres tratamientos fue KSAH C:N 15 CST 33.3% con 3 (Figura 36). Pero con respecto a los valores de la tensión superficial se observó en la Figura 37 que se encuentran muy alejados de los de surfactina, por lo que es muy poco probable que exista producción de este biosurfactantes en estos tres tratamientos.

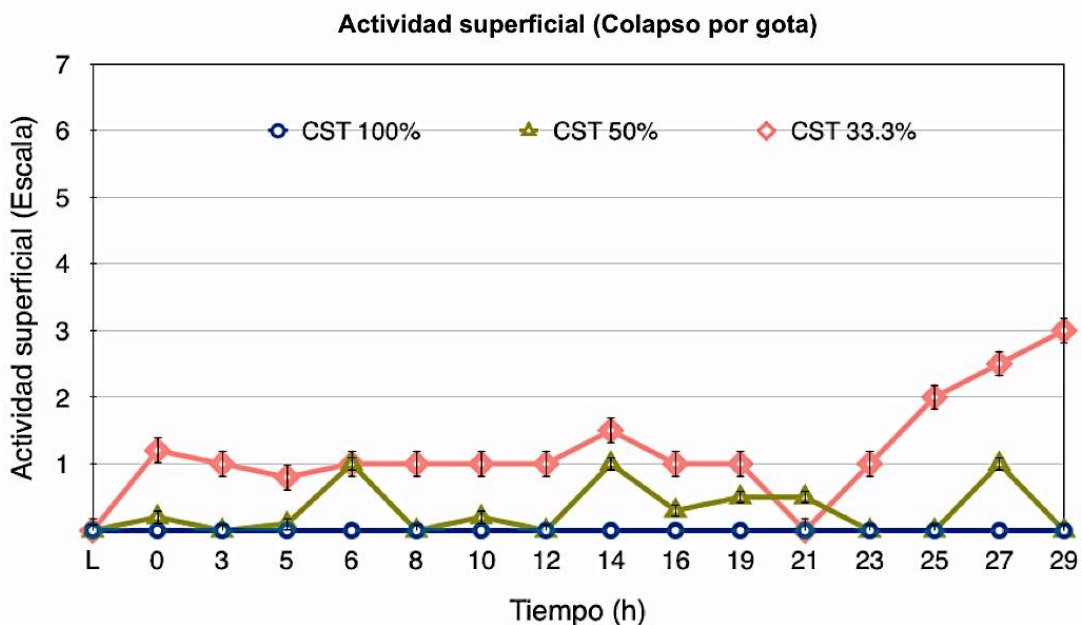


Figura 36. Actividad superficial de *Bacillus subtilis* AQ en KSAH a C:N 20 con la técnica de colapso por gota.

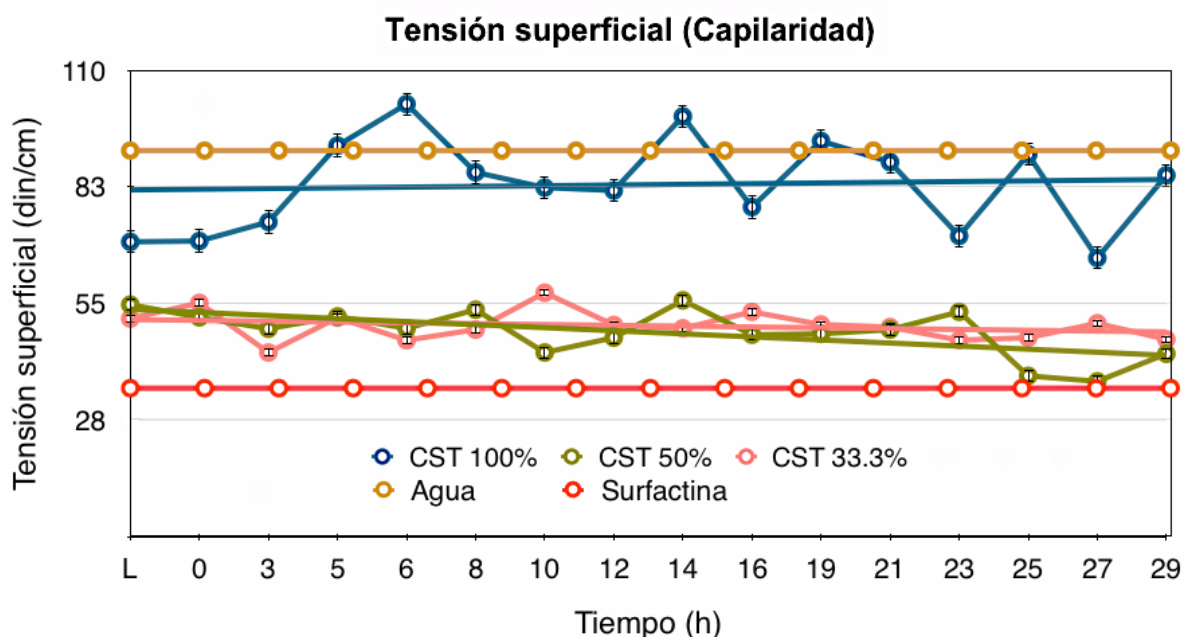


Figura 37. Tensión superficial de *Bacillus subtilis* AQ en KSAH a C:N 20 por la técnica de capilaridad.

VI. 3. 1. 4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS TRATAMIENTOS DE KSAH

Con base a los resultados de tensión superficial (TensionS) se realizó un análisis de varianza (Anova) con el software SAS 9.4 en un diseño completamente al azar por comparación de medias de Tukey con un índice de confianza de 95% (Tabla 13) de las muestras en fase exponencial de todos los tratamientos de KSAH (Anexo 3).

Tabla 13. Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TensionS

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	270
Error de cuadrado medio	18.21029
Valor crítico del rango estudentizado	6.10254
Diferencia significativa mínima	13.02

En la Tabla 14 se observan los datos que dieron los valores más cercanos a surfactina. En el lado izquierdo aparece un código de identificación que consiste en una letra que representa el tipo de medio que se usó (K para KSAH y L para Landy), los dos números siguientes son la relación de C:N del tratamiento, los siguientes 3 representan la CST a la que se encontraban y finalmente los últimos dos números corresponden al tiempo

transcurrido de la cinética, por ejemplo el caso de K2005013 corresponde al medio KSAH C:N 20 CST 50% a las 13 h de crecimiento.

Tabla 14. Resumen de la comparación de medias de Tukey de los valores de tensión superficial de los tratamientos de KSAH a las diferentes CST en fase exponencial.

Tratamiento	Media	Agrupamiento Turkey						
K2005027	36.600	R	X	W	V	U	T	S
K1503318	35.875	R	X	W	V	U	T	S
K1103318	35.825		X	W	V	U	T	S
K1103319	35.40		X	W	V	U	T	
K1103320	34.90		X	W	V	U		
Surfactina	34.880		X	W	V	U		
K1103316	34.775		X	W	V			
K1510023	34.40		X	W				
K1103313	33.800		X					
K1103317	33.600		X					

Los valores de la Tabla 14 fueron los más cercanos al valor de la tensión superficial de surfactina. Los cuales no tienen diferencias significativas entre ellos y muestran que el tratamiento K11033 representa mayor coincidencia con el valor del estándar, y al tomar en cuenta el tiempo de inoculación se observa que estos valores son cercanos a partir de las 13 a las 20 h de incubación, por lo cual es el mejor candidato para continuar con la siguiente etapa en fermentador.

VI. 3. 2 CINÉTICAS CON MEDIO LANDY

VI. 3. 2. 1 MEDIO LANDY CON RELACIÓN C:N 11

En el caso de los medios Landy, cuya composición se observa en la Tabla 15, se presentó un alargamiento en la fase exponencial de la bacteria (Figura 38) en los tres tratamientos a C:N 11, además de que su inicio en la fase exponencial fue a las 3 h de incubación lo cual es beneficioso a nivel industrial por los costos energéticos que pueden ahorrarse.

Tabla 15. Relación de las diferentes variaciones de CST del medio Landy a C:N 11

Componentes	CST 100% (g/L)	CST 50% (g/L)	CST 33.3% (g/L)
Almidón de papa	80	40	27
Nitrato de sodio	17	8.21	5.34
CST de sales	3.68	3.68	3.68
CST Final	100.68	51.89	36.02

La mayor cantidad celular alcanzada a C:N 11 fue de $4.88E+09$ células/mL en el tratamiento de Landy C:N 11 CST 100% a las 56 h de incubación. En cuanto a la actividad superficial (Figura 39) se observa un incremento de esta desde el inicio de la cinética llegando a establecerse en 4 a las 15 h en los tres tratamientos, y al compararlo con la gráfica anterior se puede observar que el valor máximo de actividad superficial fue alcanzado a la mitad de la fase exponencial de los tres tratamientos, lo cual podría indicar que esta tensión es a causa de la producción de surfactina.

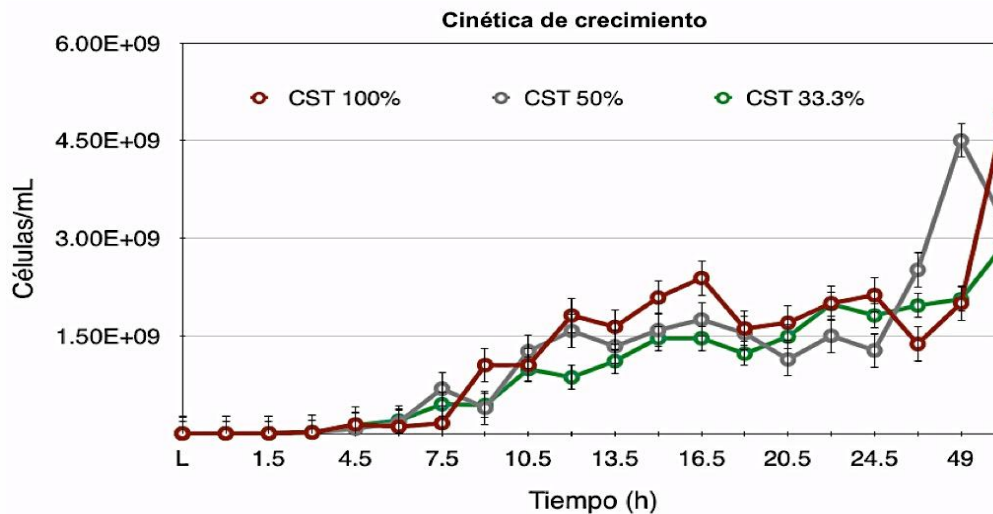


Figura 38. Cinética de *Bacillus subtilis* AQ en Landy a C:N 11.

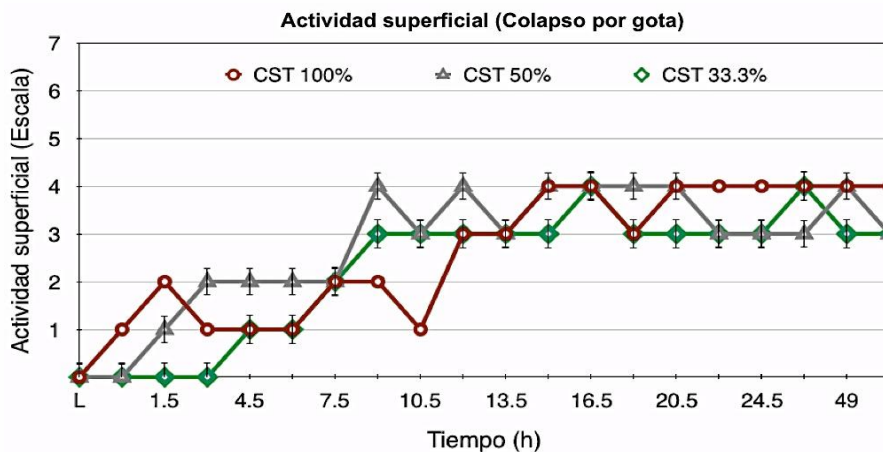


Figura 39. Actividad superficial de *Bacillus subtilis* AQ en Landy a C:N 11 con colapso por gota.

En cuanto a los valores de tensión superficial por capilaridad (Figura 40) se observa en todos los tratamientos valores cercanos a los de surfactina y particularmente en Landy C:N 11 CST 100% donde hay valores menores, lo que puede deberse a la misma naturaleza del medio pues como se observa en la misma imagen este medio sin inocular (L), presentó una tensión superficial menor a surfactina, por lo que junto a la producción de los biosurfactantes (surfactina) se produjeron estos valores.

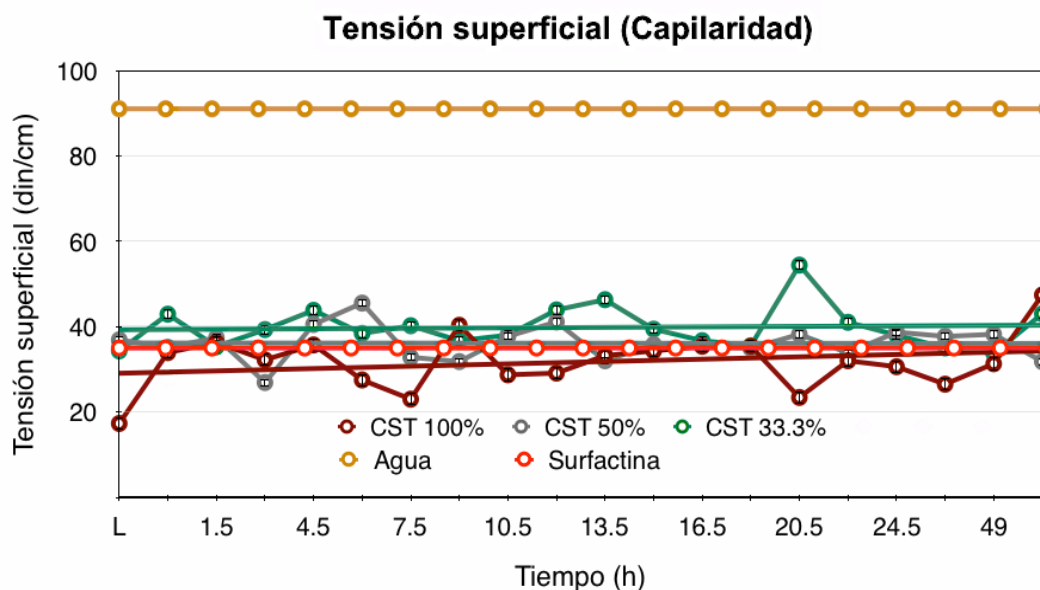


Figura 40. Tensión superficial de *Bacillus subtilis* AQ en Landy a C:N 11 por la técnica de capilaridad.

VI. 3. 2. 2 MEDIO LANDY CON RELACIÓN C:N 15

En este tratamiento (Tabla 16) se observó en Landy C:N 15 CST 100% una primera campana de Gauss que inicio de las 3 a las 19 h de incubación con una máximo celular de 5.63E+08 células/mL para volver a hacer un incremento celular hasta llegar a su máximo de 7.38E+09 células/mL a las 99 h de incubación (Figura 41).

Tabla 16. Relación de las diferentes variaciones de CST del medio Landy a C:N 15

Componentes	CST 100% (g/L)	CST 50% (g/L)	CST 33.3% (g/L)
Almidón de papa	80	40	27.3
Nitrato de sodio	12.3	5.85	3.8
CST de sales	3.68	3.68	3.68
CST Final	95.98	49.53	34.78

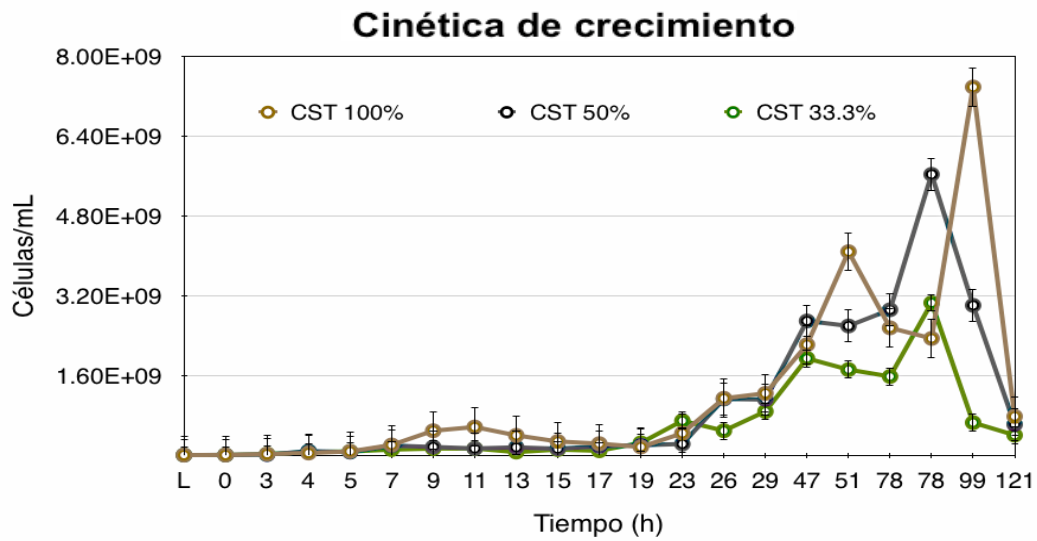


Figura 41. Cinética de *Bacillus subtilis* AQ en Landy a C:N 15.

En lo relativo a la actividad superficial (Figura 42) el mejor comportamiento fue también de Landy C:N 15 a CST 100% con un máximo de 3 que coincidió con el máximo punto de la fase exponencial a su vez que se observó como un valor muy cercano al de la surfactina en la tensión superficial (Figura 43).

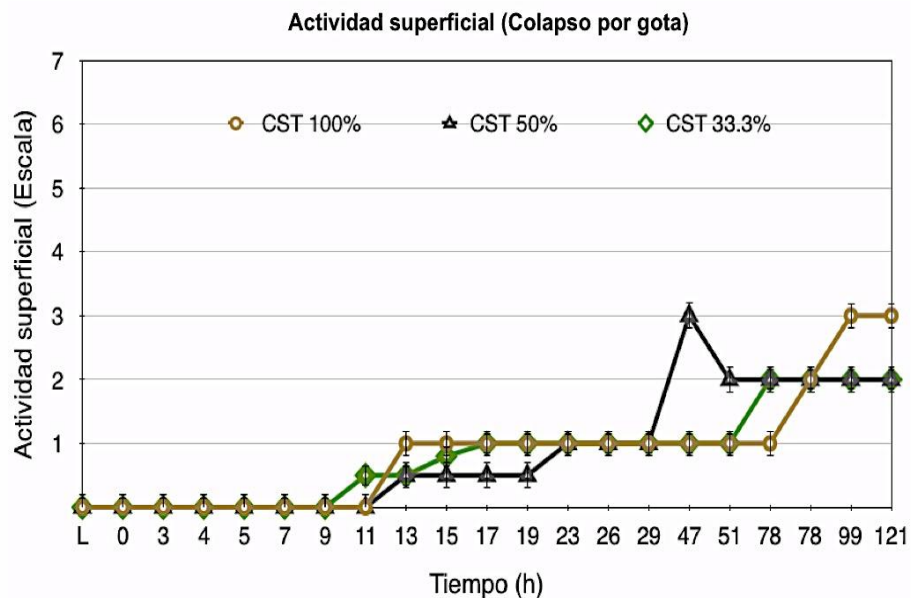


Figura 42. Actividad superficial de *Bacillus subtilis* AQ en Landy a C:N 15 con la técnica de colapso por gota.

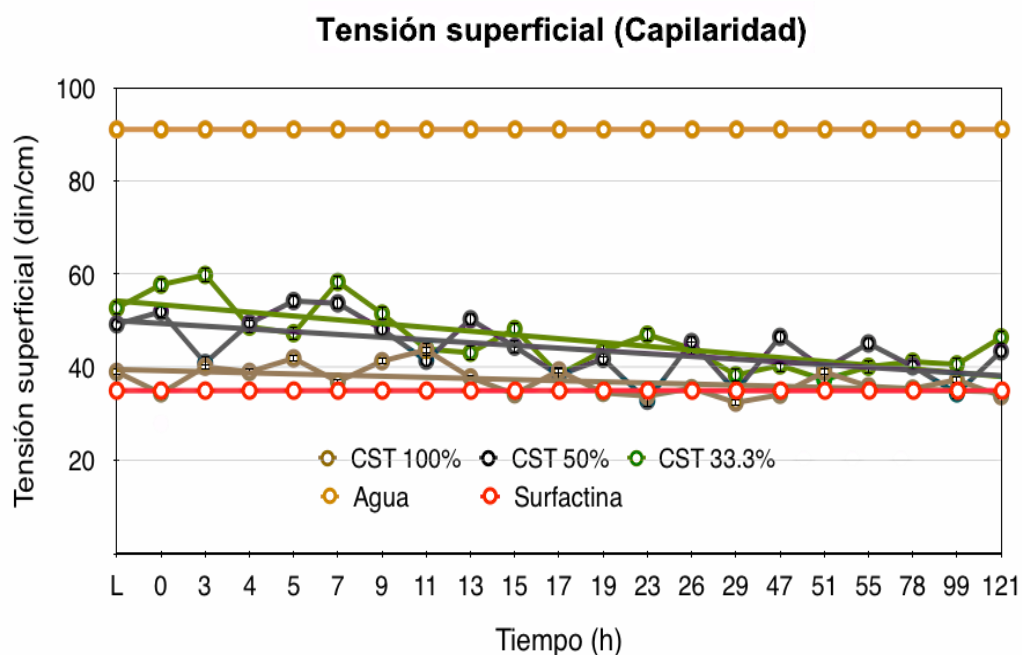


Figura 43. Tensión superficial de *Bacillus subtilis* AQ en Landy a C:N 15 por la técnica de capilaridad.

VI. 3. 2. 3 MEDIO LANDY CON RELACIÓN C:N 20

Finalmente en lo que respecta a estos tratamientos (Tabla 17) se debe destacar que el mejor rendimiento de biomasa se dio en Landy C:N 20 CST 100% con $4.09E+08$ células/mL (Figura 44) con un máximo de actividad superficial de 2 (Figura 45) y tensiones superficiales similares a los de surfactina (Figura 46).

Tabla 17. Relación de las diferentes variaciones de CST del medio Landy a C:N 20

Componentes	CST 100% (g/L)	CST 50% (g/L)	CST 33.3% (g/L)
Almidón de papa	80	39.7	25.62
Nitrato de sodio	9	4.2	2.5
CST de sales	3.68	3.68	3.68
CST Final	92.68	47.58	31.80

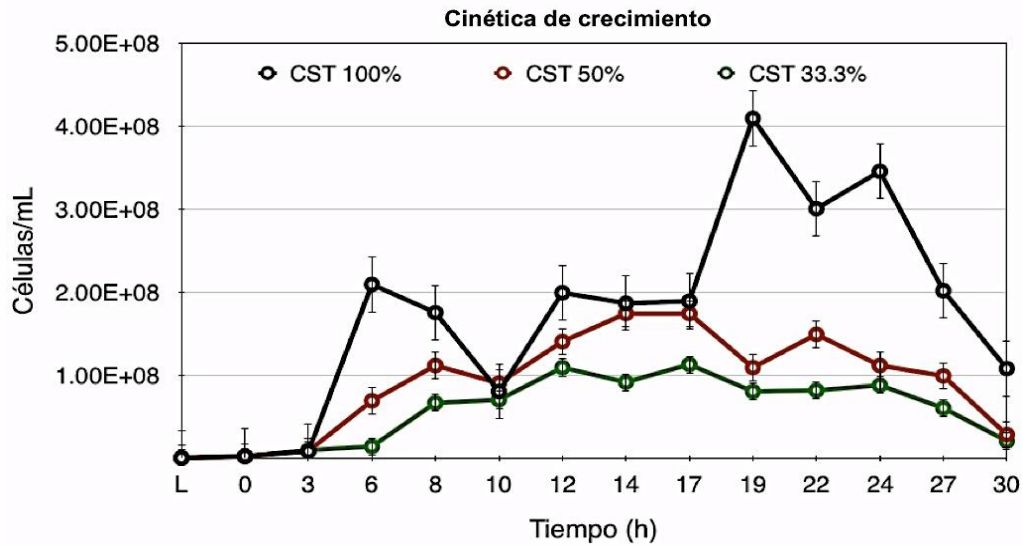


Figura 44. Cinética de *Bacillus subtilis* AQ en Landy a C:N 15.

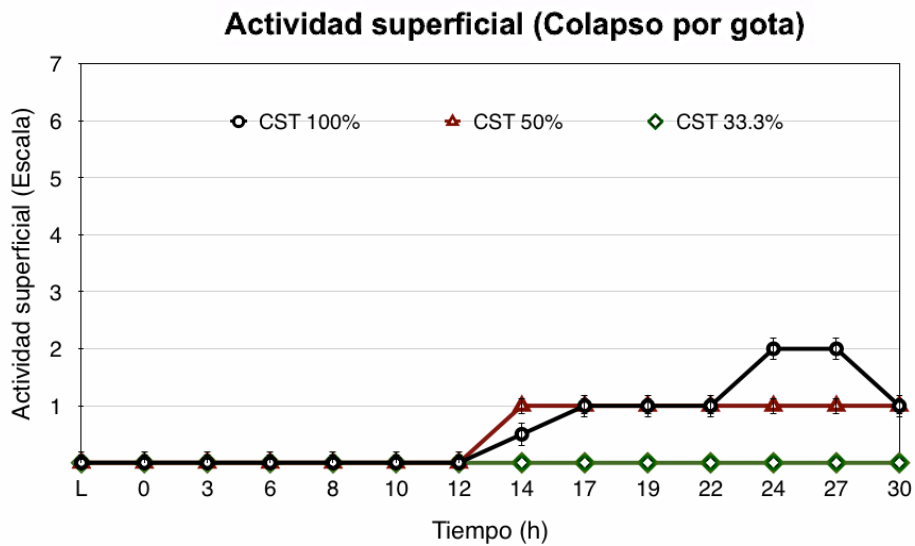


Figura 45. Actividad superficial de *Bacillus subtilis* AQ en Landy a C:N 15 con la técnica de colapso por gota.

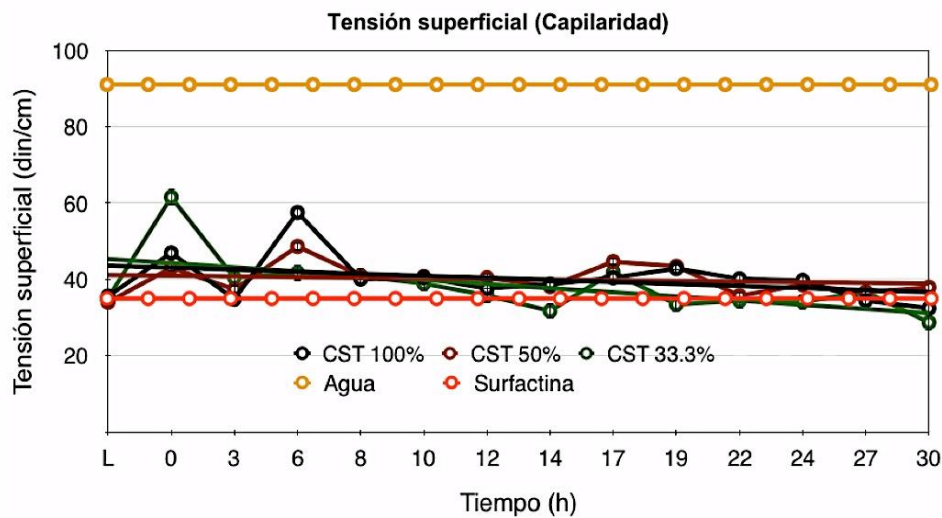


Figura 46. Tensión superficial de *Bacillus subtilis* AQ en Landy a C:N 15 por la técnica de capilaridad.

VI. 3. 2. 4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS TRATAMIENTOS DE LANDY

Este análisis realizado por comparación de medias de Tukey con un 95% de confianza (Tabla 18), también se basó en los resultados de tensión superficial de los valores en fase exponencial del medio Landy (Anexo 4). En la Tabla 19 se puede apreciar que los valores más cercanos al estándar fueron a Landy C:N 11 CST 100% y Landy C:N 15 CST 100 y 50%.

Tabla 18. Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TensionS

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	396
Error de cuadrado medio	15.68
Valor crítico del rango estudentizado	6.31
Diferencia significativa mínima	12.51

Tabla 19. Resumen de la comparación de medias de Tukey de los valores de tensión superficial de los tratamientos de Landy a las diferentes CST en fase exponencial.

Tratamiento	Media	Agrupamiento Turkey																				
		D	M	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E
L1110018	35.400	D	M	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E
L1510078	35.375	D	M	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E
L1110016	35.375	D	M	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E
L1105018	35.000	D	M	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E
L1103329	34.900	D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E
Surfactina	34.880	D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E
L1505029	34.800	D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C		E
L2010003	34.800	D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C		E
L1510019	34.500	D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C		E
L1505099	34.425	D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V		C		E
L2003322	34.300	D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G		V		C		E

Sin embargo al considerar el tiempo de inoculación de los medios se observa que en el caso de los medios Landy C:N 15 CST 100% los valores cercanos de surfactina se presentaron a las 19 y 78 h, mientras que en el caso de Landy C:N 15 CST 50% fue a las 29 y 99 h de incubación lo cual indica que se encuentran en los extremos de sus respectivas

cinéticas de crecimiento y es posible que los valores cercanos a la fase de muerte se deban más a la acumulación de biosurfactantes que a la producción de surfactina. Por tal motivo se puede considerar en el caso del medio Landy C:N 11 CST 100% como un buen candidato para pasar a la etapa de fermentador.

En un resumen mas puntual de los tratamientos de KSAH y Landy (Tabla 20) se observa que la mayor cantidad de biomasa se produjo en KSAH C:N 15 CST 50% con $1.875E+10$ células/mL con una μ de 0.96 h^{-1} , mientras que la mayor μ es 1.09 h^{-1} en KSAH C:N 15 CST 100% con $9.25E+08$ células/mL. Si bien la cantidad celular producida por KSAH C:N 15 CST 50% pudiera ser útil para la obtención de biomasa tiene el inconveniente en tardar 17 h para observar crecimiento y 23 h para ser obtenida la biomasa, lo cual es un inconveniente al trabajarlo a nivel industrial. Lo contrario ocurre en los medios Landy 20, pues desde el principio de su inoculación presentan crecimiento bacteriano. Sin embargo en cuanto a la cantidad de biomasa que producen estos se encuentran por debajo de la media.

En lo que respecta a la actividad superficial los tratamientos de KSAH C:N 15 arrojaron como resultado valores de 5 al final de sus fases de crecimiento, lo cual hace suponer que esta actividad no era debida a las surfactina sino a otros biosurfactantes como iturina, micosubtilina fengicina (Roongsawang *et al.* 2010).

Los tratamientos de Landy C:N 11 CST 100%, Landy C:N 15 CST 100 y 50%, que presentaron valores de tensión superficial muy cercanos a los de surfactina fueron, después del tratamiento KSAH C:N 15 CST 50%, los mejores en cuanto a producción celular, además de que su tiempo de adaptación menor a los demás tratamientos.

En cuanto a los tratamientos KSAH C:N 11 CST 33.3% y Landy C:N 11 CST 100%, que mostraron los mejores resultados para pasar a la etapa de fermentador se observó lo siguiente: el medio KSAH C:N 11 CST 33.3% fase de adaptación de 8 h, con una μ de 0.55 h^{-1} , actividad superficial de 2 y una máxima cantidad celular de $2.20E+08$ células/mL. Mientras que Landy presentó una fase de adaptación menor con 3 h, mayor cantidad de biomasa con $4.88E+09$ células/mL, menor velocidad de crecimiento 0.44 h^{-1} y una actividad superficial de 4. Se espera que estos tratamientos presenten buenos resultados en cuanto a la producción de surfactina.

Tabla 20. Comparación de los parámetros usados en Bacillus subtilis AQ a diferentes relaciones de C:N y CST a nivel matraz.

Tratamiento			Inicio de fase exponencial (h)	Máxima cantidad celular (células/mL)	Velocidad específica de crecimiento- μ (h^{-1})	R^2	Máxima actividad superficial (valores arbitrarios)	Tensión superficial			
Medio	C:N	CST						Valor mínimo (din/cm)	Tiempo en alcanzar el valor mínimo (h)	Valor máximo (din/cm)	Tiempo en alcanzar el valor máximo (h)
KSAH	11	100	9	3.75E+08	0.40	0.89	3	38.19	18	65.97	4
KSAH	11	50	9	7.75E+08	0.41	0.90	2	30.99	20	63.37	L
KSAH	11	33.3	8	2.20E+08	0.55	0.88	2	33.60	17	52.87	2
KSAH	15	100	12	9.25E+08	1.09	0.88	5	29.72	26	59.02	0
KSAH	15	50	17	1.88E+10	0.96	0.96	5	42.26	26	58.85	6
KSAH	15	33.3	8	1.01E+09	0.68	0.90	5	35.89	18	68.46	3
KSAH	20	100	5	1.46E+06	0.34	0.90	0	65.75	27	101.99	6
KSAH	20	50	3	9.25E+07	0.35	0.87	1	36.61	27	55.68	14
KSAH	20	33.3	16	4.38E+05	0.85	0.95	3	43.35	3	57.50	10
Landy	11	100	3	4.88E+09	0.44	0.79	4	17.34	L	47.43	56
Landy	11	50	3	4.50E+09	0.69	0.91	4	26.90	3	45.46	6
Landy	11	33.3	3	2.90E+09	0.22	0.84	4	33.68	49	54.43	21
Landy	15	100	5	7.38E+09	0.32	0.80	3	32.44	29	43.66	11
Landy	15	50	5	5.63E+09	0.30	0.88	3	32.76	23	54.21	5
Landy	15	33.3	5	3.05E+09	0.28	0.88	2	37.34	51	59.79	3
Landy	20	100	0	4.09E+08	0.51	0.62	2	32.41	30	57.54	6

Tabla 20. Comparación de los parámetros usados en Bacillus subtilis AQ a diferentes relaciones de C:N y CST a nivel matraz.

Tratamiento			Inicio de fase exponencial (h)	Máxima cantidad celular (células/mL)	Velocidad específica de crecimiento- μ (h^{-1})	R^2	Máxima actividad superficial (valores arbitrarios)	Tensión superficial			
Medio	C:N	CST						Valor mínimo (din/cm)	Tiempo en alcanzar el valor mínimo (h)	Valor máximo (din/cm)	Tiempo en alcanzar el valor máximo (h)
Landy	20	50	0	1.74E+08	0.72	0.77	1	34.03	L	48.58	6
Landy	20	33.3	0	1.13E+08	0.81	0.91	0	28.73	30	61.46	0
Valor mínimo			0	4.38E+05	0.22	0.62	0	17.34	NA	43.66	NA
Valor máximo			17	1.88E+10	1.09	0.96	5	65.75	NA	101.99	NA
Media			5	8.50E+08	0.47	0.88	3	33.64	NA	57.52	NA
Promedio			6.17	2.85E+09	0.55	0.86	2.72	35.11	NA	58.68	NA

L-Medio limpio, NA- No aplica, 0- Momento en el que se inoculo el medio.

VI. 3. 3 FERMENTACIÓN CON MEDIO LANDY C:N 11, CST 100%, *Bacillus subtilis* AQ CON ACEITE DE OLIVA COMO FUENTE DE CARBONO.

Debido a que existen estudios que utilizan como fuente de carbono a hidrocarburos para la producción de biosurfactantes (Batista 2005), se realizó una experimento alterno donde se usó aceite de oliva como fuente de carbono junto con medio Landy C:N 11 CST 100% debido a que este medio fue un candidato para ser usado en fermentador. Su composición se observa en la Tabla 21.

Tabla 21. Relación de las diferentes variaciones de CST del medio Landy a C:N 11 CST 100% con aceite de oliva como fuente de carbono.

Componentes	CST 100% (g/L)
Aceite de oliva	10
Nitrato de sodio	3.28
CST de sales	3.68
CST Final	16.96

En la Figura 47 se puede observar un crecimiento celular de $4.5E+08$ células/mL, una actividad superficial inicial de 2, y una tensión superficial menor al de surfactina. El comportamiento de la actividad superficial inicialmente más alta se debe a la interacción del aceite de oliva del medio con la capa de aceite colocada en la placa para hacer la prueba de capilaridad, posteriormente a que ha habido un incremento en la cantidad celular esta actividad superficial baja a 1 y se mantiene constante.

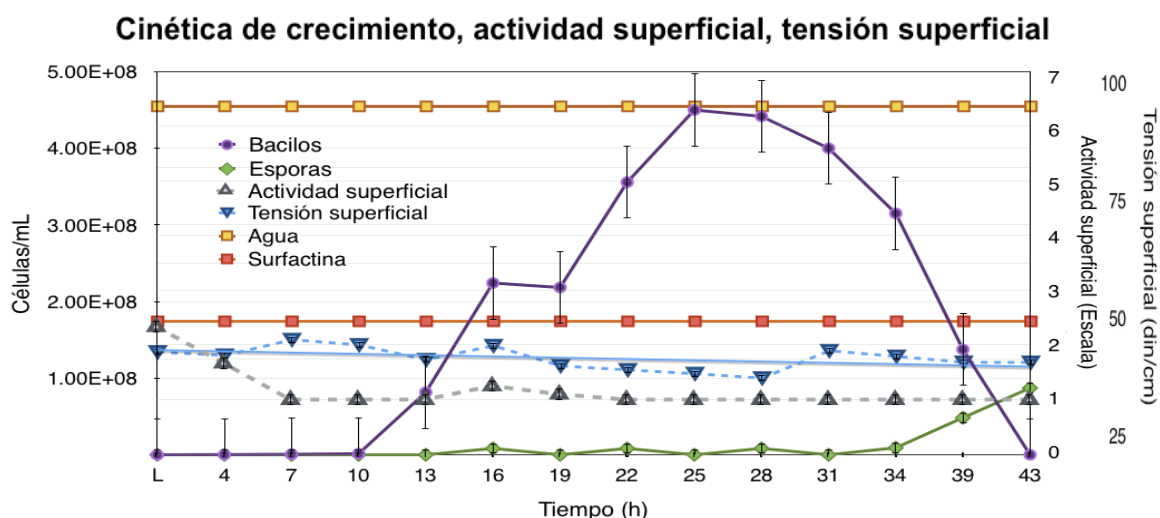


Figura 47. Cinética de crecimiento, actividad superficial y tensión superficial de *Bacillus subtilis* AQ en medio Landy C:N 11 CST 100% con aceite de oliva como fuente de carbono.

Si se realiza un comparativo con el medio Landy a C:N 11 y CST 100% sin aceite de oliva se puede observar (Figura 48) que este medio se presentó una mayor cantidad de biomasa, $4.88E+09$ células/mL, en su punto de mayor producción, lo cual puede deberse a que el almidón, fuente de carbono del medio Landy, es más asimilable que el aceite y por lo tanto es más rápido que la bacteria la utilice para su reproducción celular.

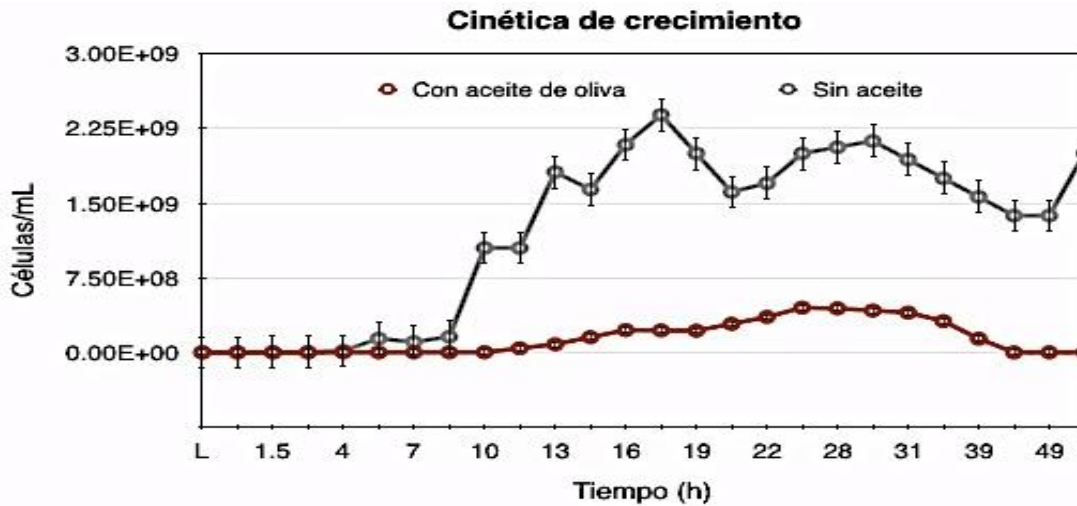


Figura 48. Cinéticas de *Bacillus subtilis* AQ en medio Landy

En lo que respecta a su actividad superficial (Figura 49), se observa que existe una gran diferencia entre los dos medios, la actividad del medio sin aceite es mucho mayor y está indicando que existe una mayor producción de biosurfactantes con respecto al otro medio. Sin embargo la interacción de las moléculas del aceite de oliva con la de los biosurfactantes producidos por *Bacillus subtilis* puede estar creando diferentes tipos de micelas (Figura 2) a causa de la relación existentes de estos en el medio y puede ser la causa de esta baja actividad, aunque no justifica que llegue a niveles de uno (Holmberg et al. 2003).

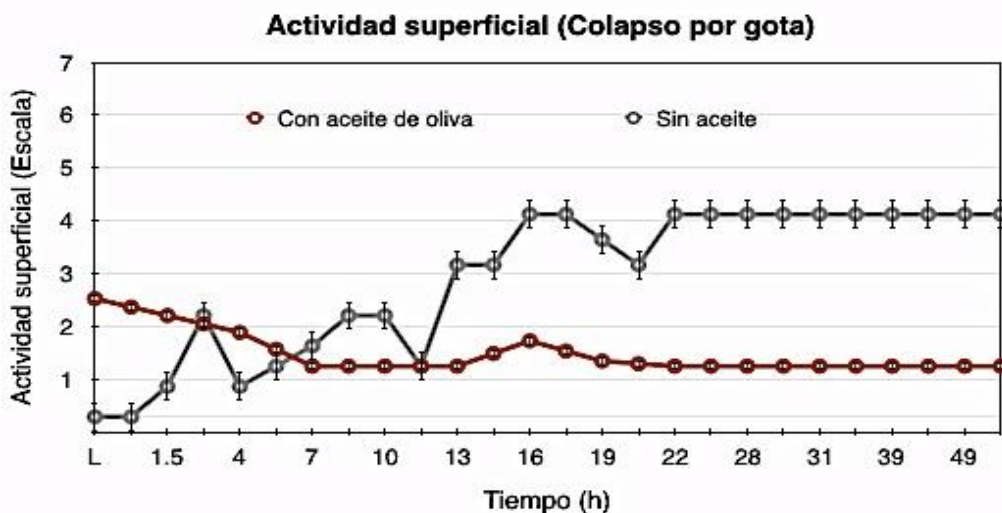


Figura 49. Actividad superficial de *Bacillus subtilis* AQ en medio Landy

En lo correspondiente a la tensión superficial ambos medios tienen valores similares a los de surfactina, pero otra vez la participación del aceite interfiere en los resultados. El aceite de oliva tiene una tensión superficial a 20 ° C de 32 din/cm, mientras que el agua tiene de 72.8 din/cm, por lo que al adicionar el aceite la tensión superficial del medio disminuyó y conforme aumentaba el crecimiento celular la producción de biosurfactantes contribuyó a que la tensión superficial del medio con aceite fuera menor al medio sin aceite. Por lo tanto con lo anterior se observó que el agregar ácidos grasos al medio de cultivo no aumenta la producción de biosurfactantes, que si bien los biosurfactantes son utilizados para la bioremediación puede que tenga mejor efecto el agregar los biosurfactantes purificados que los microorganismos para su crecimiento en los ambientes contaminados.

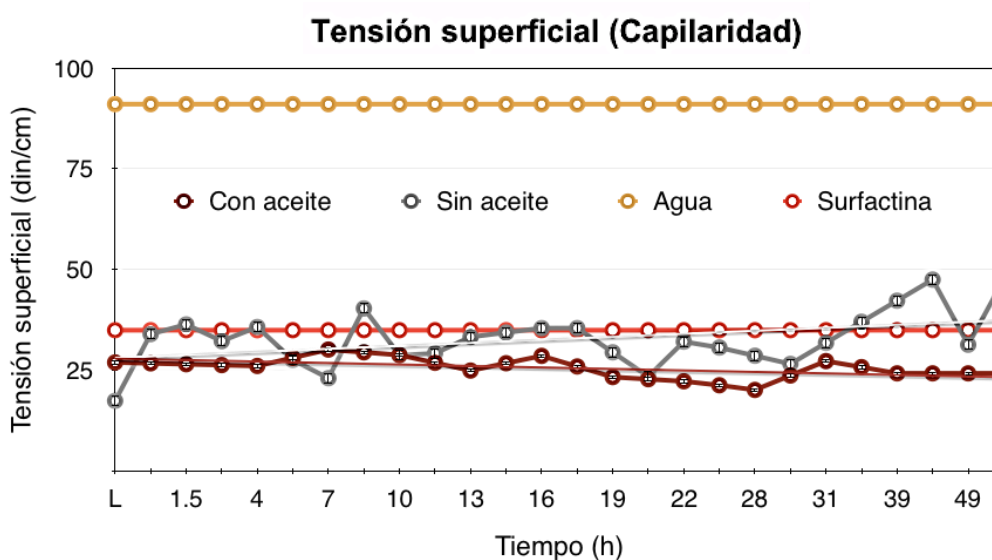


Figura 50. Tensión superficial de *Bacillus subtilis* AQ en medio Landy

VI. 3. 4 PRUEBA E24

La actividad de los biosurfactantes puede medirse de diversas formas, una de estas es midiendo la estabilización o desestabilización de las emulsiones, las cuales se forman cuando una fase líquida se dispersa como gotas microscópicas en otra fase líquida. Los biosurfactantes tienen la capacidad de estabilizar (emulsionantes) o desestabilizar (desemulsificantes) una emulsión. Esta actividad se realiza midiendo la capacidad del biosurfactante para generar turbidez cuando son suspendidos en un sistema acuoso con diversos hidrocarburos (Desai y Banat 1997).

Para esta prueba se utilizó como control negativo una suspensión agua-aceite en relación 1:1, y como control positivo al surfactante Tween 20-aceite (Figura 51 a). Además

de que se probaron dos hidrocarburos diferentes, el aceite de oliva y de soya para realizar las emulsiones. Los sobrenadantes libres de células probados fueron de los medios KSAH C:N 20 CST 50%, Landy C:N 15 CST 33.3% y Landy C:N 20 CST 100%. En la Figura 51 b, c y d se observan los resultados de esta prueba donde del lado izquierdo de las gráficas se observa el aceite de soya y del izquierdo el aceite de oliva. El porcentaje de emulsión de los diferentes medios se mantuvo estable después de las 24 h de realizada la prueba como se puede observar en las diferentes gráficas, siendo el medio Landy el de mejores resultados.

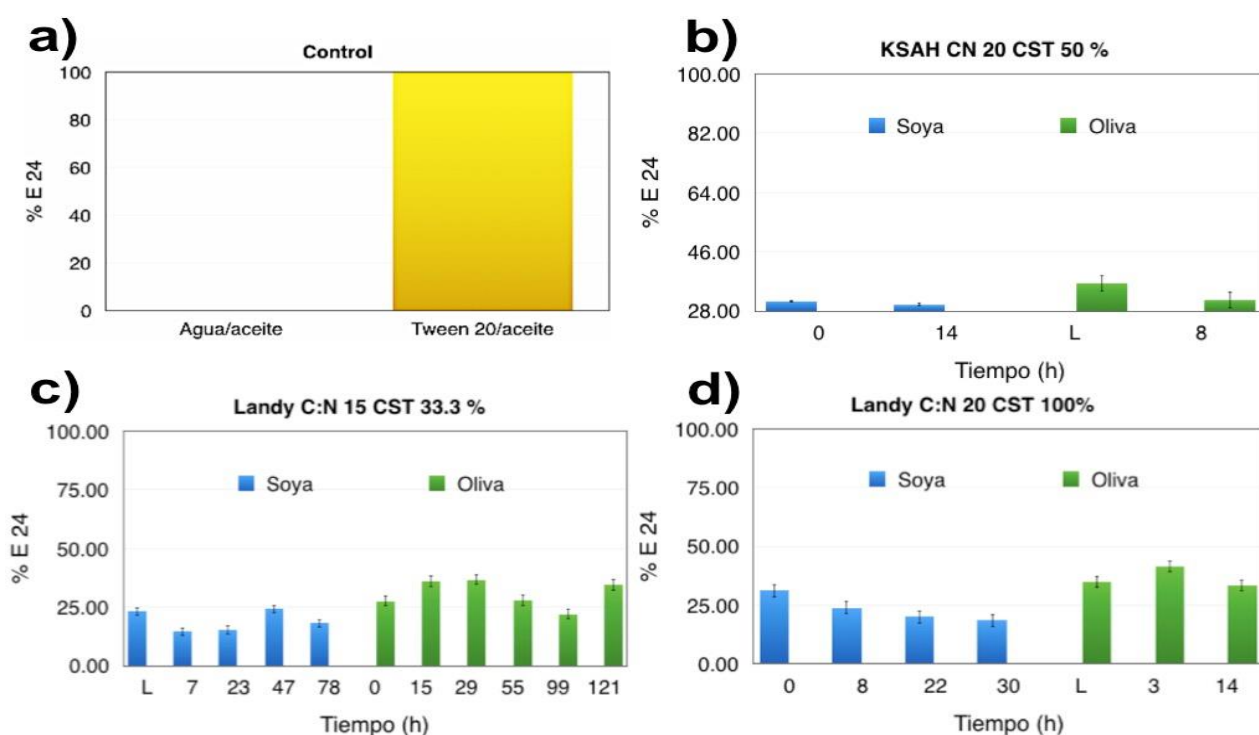


Figura 51. Prueba E₂₄. a) Control negativo (agua-aceite) y control positivo (**Tween 20-aceite**), b) Medio KSAH C:N 20 CST 50%, c) Medio Landy C:N 15 CST 33.3% y d) Medio Landy C:N 20 CST 100%.

En el caso del medio Landy C:N 11 y CST 33.3% con aceite de soya se presentó una mayor cantidad de emulsión a las 47 h y en el de aceite de oliva a las 15 y 29 h con lo cual que comprueba que existe presencia de biosurfactantes estables con el paso del tiempo, independientemente de la cantidad y el tipo producido.

Con todas la pruebas realizadas se cumple el primer objetivo observando que los mejores medios para pasar a la etapa de fermentador son el KSAH C:N 11 CST 33.3% y Landy C:N 11 CST 100%. Se descartaron las pruebas de hemólisis, actividad antimicrobiana y E₂₄ debido a que si bien ayudaron a comprobar la producción de biosurfactantes no ayudan a verificar que biosurfactantes son y en qué cantidad se producen. En el caso del medio con aceite de oliva que fue propuesto para ver cómo se

comportaba el medio a esta condición se observó que el mismo aceite de oliva causa mucho ruido para la detección de biosurfactantes y que hasta el momento no hay indicios de que sea mejor productor en comparación con los demás medios por lo que también fue descartado para la siguiente etapa.

VI. 4. PRUEBAS DE FERMENTACION A NIVEL REACTOR

Para confirmar lo observado a nivel matraz y extender la fase de crecimiento se realizaron las pruebas de fermentación con los dos medios. Primero se realizaron los medios con la misma composición a la de matraz y después se aumentó la CST a 150% de los medios originales. Todos los medios se realizaron en un fermentador de 7 L, con un volumen de medio total de 4 L, 600 rpm de agitación, pH de 7.2, temperatura de 30 ° C y oxígeno disuelto (OD) al 100%. A continuación se presentan los resultados.

VI. 4. 1. FERMENTACIONES CON MEDIO KSAH

Se realizó una prueba inicial con el medio KSAH C:N 11 y CST 100% con la composición original de Mejia (2008) con harina de soya pero generó muchos problemas para controlar la espuma generada por el reactor aun cuando el medio no había sido inoculado. Cuando se realizó la inoculación (Figura 52) la cantidad de espuma producida causó que el medio. Además para evitar que el medio, la bacteria o el surfactante sufrieran alguna alteración se decidió disminuir a lo mínimo la cantidad de antiespumante usado, por lo que se cambió de harina de soya a peptona de soya.

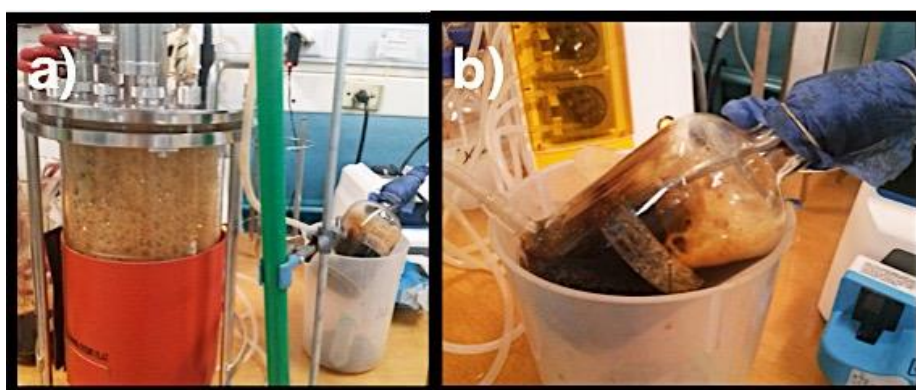


Figura 52. Fermentación de medio KSAH a C:N 11 y CST 100%. a) Fermentador con recolector de espuma, b) Recolector de espuma lleno.

Muchos autores han mencionado diferentes técnicas para aprovechar las grandes cantidades de espuma generadas en estos medios, los cuales se basan principalmente en

la recolección de espuma por medio de columnas, colapso por medios mecánicos, recolección por modificaciones al reactor, remoción de espuma, etc. Un ejemplo de esto es Cooper *et al.* en 1981 el cual utilizó dos métodos de fermentación, uno por remoción de espuma y el otro por recolección, con rendimientos de 0.8 g/L de surfactina proveniente de *Bacillus subtilis*. Sin embargo el inconveniente de usar estas técnicas es la dificultad para ser utilizadas a gran escala debido a que no pueden asegurarse las condiciones asépticas de las fermentaciones.

VI. 4. 1. 1 MEDIO KSAH A RELACIÓN C:N 11 Y CST 33.3 %

Este medio fue realizado con la misma composición de la prueba en matraz y como se puede observar (Figura 53) el inicio de la fase exponencial inicio desde la primer hora en que se inoculó el medio llegando hasta las 14 h con un máximo de crecimiento celular de $9.17E+08$ células/mL a diferencia del $2.20E+08$ células/mL obtenidas en matraz.

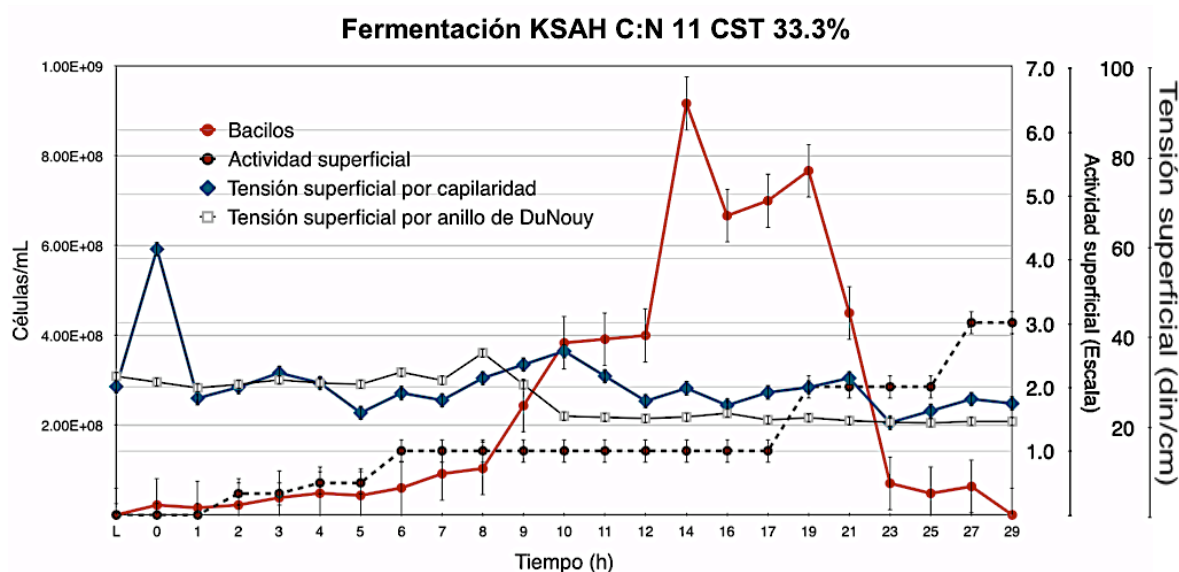


Figura 53. Fermentación de *Bacillus subtilis* AQ en medio KSAH a C:N 11 y CST 33.3 %.

La actividad superficial máxima obtenida en este medio fue de 3 mejorando la de 2 de la prueba anterior. Al aumentar la cantidad de biomasa se observó un incremento en la actividad superficial que se mantuvo hasta las etapas finales de la fermentación. Por otro lado para esta etapa en el trabajo se realizaron dos métodos para la medición de la tensión superficial, una fue por capilaridad como se había venido manejando y la otra fue con ayuda del tensiómetro con el anillo de DuNouy (Figura 54). En ambos casos se observó una disminución de la tensión superficial coincidiendo con las etapas de crecimiento bacteriano.

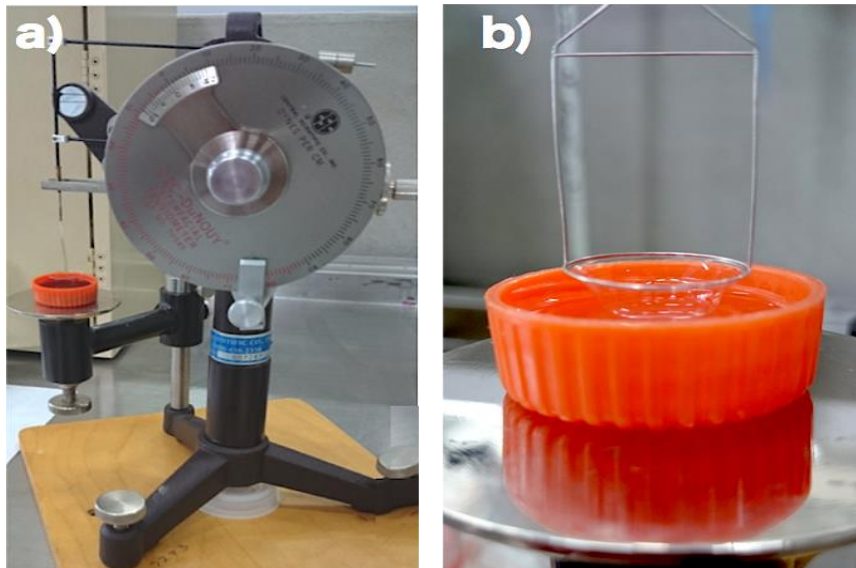


Figura 54. Tensiómetro de precisión con anillo de DuNouy. a) Equipo con muestra en la platina, b) Resistencia del medio al anillo de DuNouy.

VI. 4. 1. 2 MEDIO KSAH A RELACIÓN C:N 11 Y CST DE 150%

Una vez realizada la primer fermentación se aumentó la CST a 150% del original para ver su comportamiento (Figura 55). En esta cinética se obtuvo un crecimiento máximo de $1.38E+07$ células/mL que fue mucho menor al de la fermentación anterior, al igual que la actividad superficial que llegó a ser de cero. En lo correspondiente a las tensiones superficiales en ambos métodos se observa que fueron estables casi en toda la prueba por lo que se puede decir que el medio anterior obtuvo mejores resultados en cuanto a este respecto.

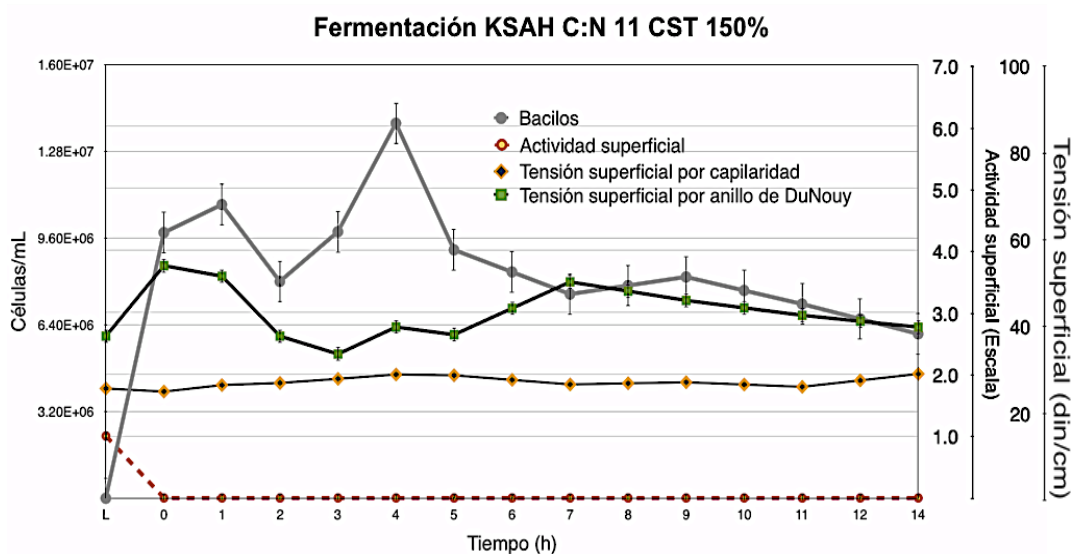


Figura 55. Fermentación de *Bacillus subtilis* AQ en medio KSAH a C:N 11 y CST 150 %.

VI. 4. 2. FERMENTACIONES CON MEDIO LANDY

VI. 4. 2. 1 MEDIO LANDY A RELACIÓN C:N 11 Y CST DE 100%

Este medio fue el que obtuvo la más larga fase exponencial de todas las pruebas con 54 h y con un crecimiento celular de $1.07E+10$ células/mL, incluso su actividad superficial concuerda con su comportamiento llegando a un máximo de 4 (Figura 56). Gracias al tensiómetro con anillo de DuNouy se observa una clara disminución de la tensión superficial hasta las 44 h de inoculación para después realizar un leve ascenso, el cual se puede deber a que inicia la descomposición de los biosurfactantes y por lo tanto no puede seguir la misma tensión superficial.

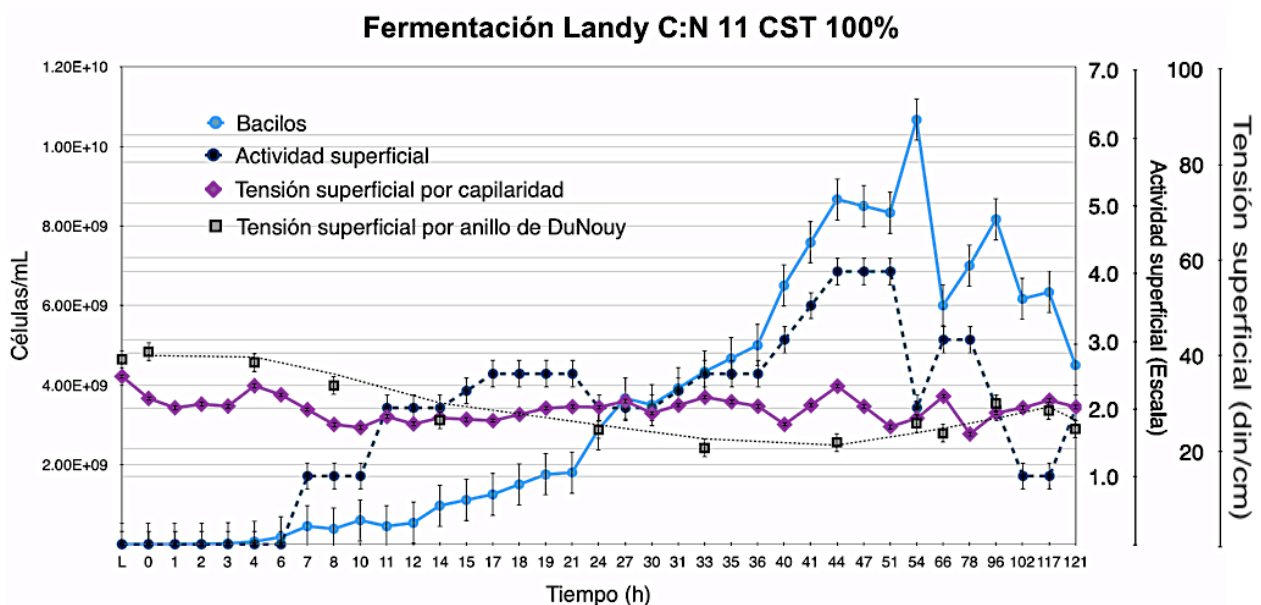


Figura 56. Fermentación de *Bacillus subtilis* AQ en medio Landy a C:N 11 y CST 100%.

VI. 4. 2. 2 MEDIO LANDY A RELACIÓN C:N 11 Y CST DE 150%

En esta fermentación se observa una fase exponencial igual de alargada hasta las 47 h, pero en este caso no hubo presencia alguna de actividad superficial hasta las 31 h que es la parte media de la etapa exponencial (Figura 57). También en este caso la tensión superficial por capilaridad prácticamente mientras que la de anillo presento una leve disminución hasta las 8 h para luego subir a las 27.

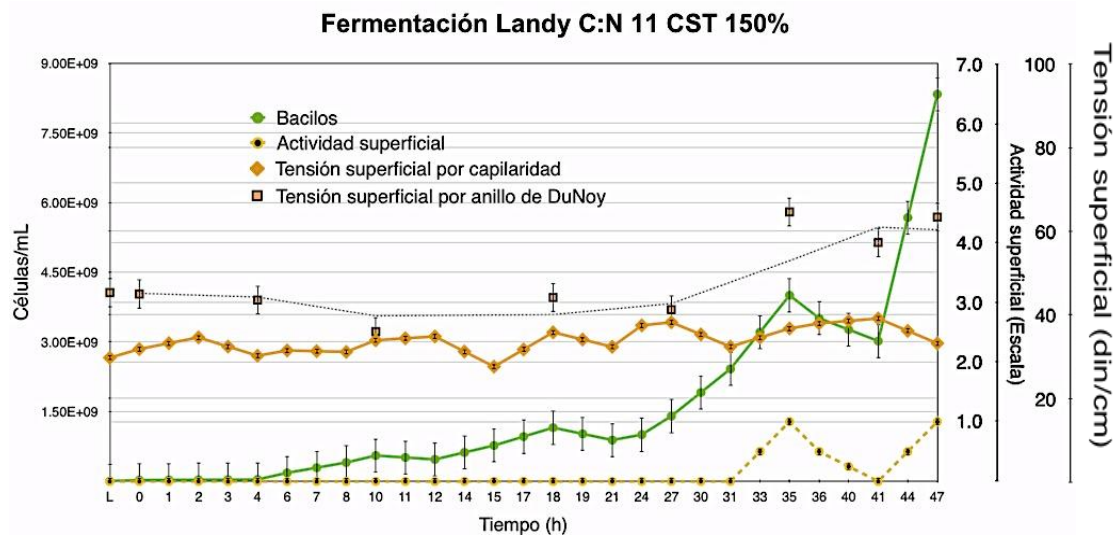


Figura 57. Fermentación de *Bacillus subtilis* AQ en medio Landy a C:N 11 y CST 150%.

VI. 4. 3 MEDIO KSAH A RELACIÓN C:N 11 Y CST DE 33.3% SIN PEPTONA DE SOYA NI EXTRACTO DE LEVADURA

A lo largo de todos los experimentos, tanto de matraz como de fermentador se observó que varios medios limpios, sin inóculo, presentaban tensión superficial, por lo que se decidió realizar una nueva fermentación pero sin usar peptona de soya ni extracto de levadura (Figura 58). Además de que solo se usó la medición por tensión superficial con anillo de DuNouy y recolección de espuma para ver su comportamiento.

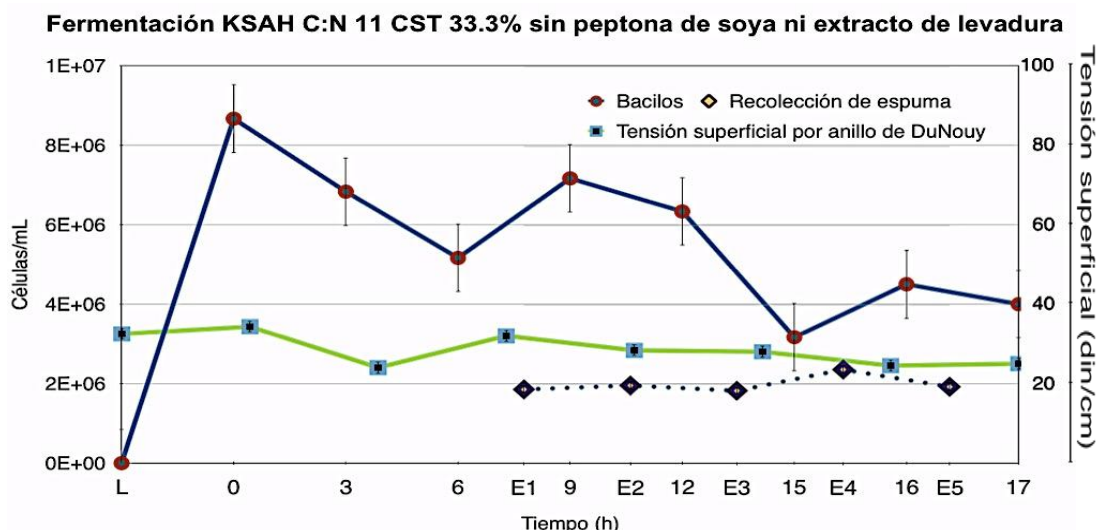


Figura 58. Fermentación de *Bacillus subtilis* AQ en medio KSAH a C:N 11, CST 33.3% sin peptona de soya ni extracto de levadura. E- espuma.

En cuanto al crecimiento microbiano este fue el menor de todas las fermentaciones con $8.67E+06$ células/mL, pero su actividad superficial fue menor que las demás con este

método. Algo importante a mencionar es que en este medio la producción de espuma fue mayor que todas las demás teniendo que detener la fermentación a las 17 h por falta de medio. Por tal motivo se realizó recolección continua de espuma de casi 500 mL aproximadamente en cada ocasión. Al realizarle pruebas a estas recolecciones de espuma se observó que sus tensiones superficiales fueron mucho menores que las de los sobrenadantes libres de células por lo que se decidió realizarles pruebas al igual que las demás muestras con HPLC.

El resumen general de todas las fermentaciones junto con sus respectivos equivalentes en matraz se puede observar en la Tabla 20, donde cabe destacar que el medio con mayor producción celular fue el Landy C:N 11 CST 100% y que al mismo tiempo fue el que presentó una menor tensión superficial con la técnica del anillo llegando a 20.17 din/cm. Con esto se concluyó el segundo objetivo en el trabajo, para finalmente poder realizar las pruebas con HPLC y verificar si se encuentra surfactina en los medios.

Tabla 22. Comparación de los parámetros usados en Bacillus subtilis AQ a diferentes relaciones de C:N y CST a nivel matraz y fermentador.

Tratamiento			IFE (h)	MCC (cél/mL)	μ (h ⁻¹)	R ²	MAS (valores arbitrarios)	Tensión superficial							
Medio	C:N	CST						Capilaridad				Tensiómetro de DuNouy			
								Vmin (din/cm)	TVmin (h)	Vmax (din/cm)	TVmax (h)	Vmin (din/cm)	TVmin (h)	Vmax (din/cm)	TVmax (h)
KSAH-M	11	33.3	8	2.20E+08	0.55	0.88	2	33.60	17	52.87	2	NA	NA	NA	NA
KSAH-F	11	33.3	1	9.17E+08	0.30	0.96	3	20.56	23	59.23	0	20.50	25	36.13	8
KSAH-F	11	150	2	1.38E+07	0.27	0.98	1	24.55	0	28.62	14	33.20	3	53.58	0
Landy-M	11	100	3	4.88E+09	0.44	0.79	4	17.34	L	47.43	56	NA	NA	NA	NA
Landy-F	11	100	4	1.07E+10	0.15	0.96	4	23.10	78	35.17	L	20.17	33	40.33	0
Landy-F	11	150	4	8.33E+09	0.20	0.89	1	27.45	15	39.00	41	35.83	10	64.50	35
KSEYP-F	11	33	NA	8.67E+06	0.11	0.62	NA	NA	NA	NA	NA	24	3	34.33	0
Valor mínimo			1	1.38E+07	0.15	0.79	1	17.34	0	28.62	0	20.17	3	36.13	0
Valor máximo			8	1.07E+10	0.55	0.98	4	33.60	78	59.23	56	35.83	33	64.50	35
Media			4	2.90E+09	0.29	0.93	3	23.83	17	43.22	14	26.85	17.50	46.96	4
Promedio			4	4.18E+09	0.32	0.91	3	24.43	27	43.72	22.6	27.43	17.75	48.64	10.75

CST- concentración de sólidos totales, IFE- inicio de fase exponencial, MCC- máxima cantidad celular, μ - velocidad específica de crecimiento, MAS- máxima actividad superficial, Vmin- valor mínimo, TVmin- tiempo en alcanzar el valor mínimo, Vmax- valor máximo, TVmax- tiempo en alcanzar el valor máximo. L-Medio limpio, NA- No aplica, 0- Momento en el que se inoculo el medio, M- cinética en matraz, F- cinética en fermentador, KSEYP-Medio KSAH sin peptona de soya ni extracto de levadura.

VI. 5 PRUEBAS DE HPLC

Como parte final de este trabajo se determinó la presencia de surfactina por el método de HPLC con las fermentaciones realizadas. Se utilizó el estándar de surfactina a una concentración de 16 000 mg/L, el cual coincide con el reportado por Effendy *et al.* (2015) (Figura 59). Para un mejor análisis de las muestras en este trabajo se le asignó a cada pico del estándar una denominación de la S₁ a la S₁₁, considerando a cada pico como una posible isoforma de surfactina diferente. Para verificar que los picos encontrados correspondieran a los de surfactina se realizó una ampliación del espectro de los picos de las muestras y se compararon con los correspondientes del estándar para una vez comprobado esto se prosiguió al análisis de las muestras.

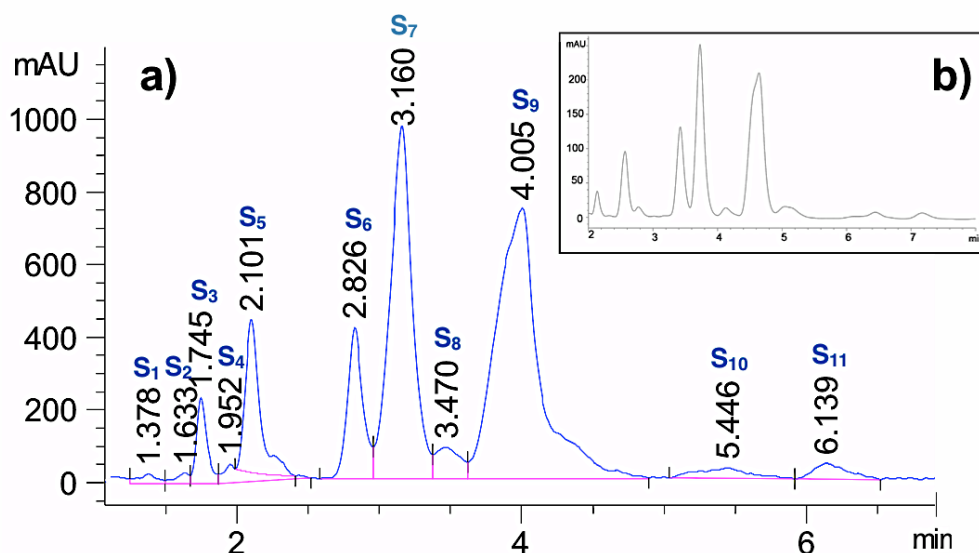


Figura 59. Estándar de surfactina a 205.4 nm. a) Cromatograma obtenido a la concentración de 16 000 mg/L, b) Cromatograma reportado por Effedy *et al.* en 2015.

En el medio KSAH C:N 11 CST 33.3% al inicio de su fase exponencial no se presentó producción de surfactina o de biosurfactantes, pero a partir de las 10 h de inoculación se identificaron dos posibles isoformas la S₅ y S₆ (Figura 60). Posteriormente a las 27 h se observó la mayor producción de surfactina con las isoformas S₁, S₅, S₆, S₇ y S₉, siendo la isoforma S₆ la que se produjo en mayor cantidad.

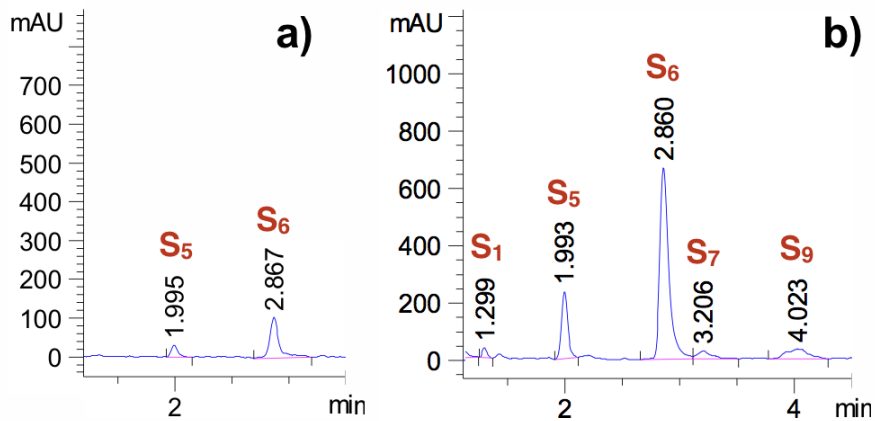


Figura 60. Cromatogramas de muestras de medio KSAH a C:N 11 y CST 33.3%. a) Inicio de producción de surfactina a las 10 h, b) Mejor producción de surfactina a las 27 h.

El medio KSAH C:N 11 CST 150% presentó a las 3 h de inoculación las isoformas S₅ y S₆ (Figura 61a). Después a las 5 horas, cuando ya había iniciado la fase de muerte de la bacteria solo se observó un aumento de las mismas isoformas, pero a diferencia del medio anterior, la isoforma S₅ presentó mayor producción.

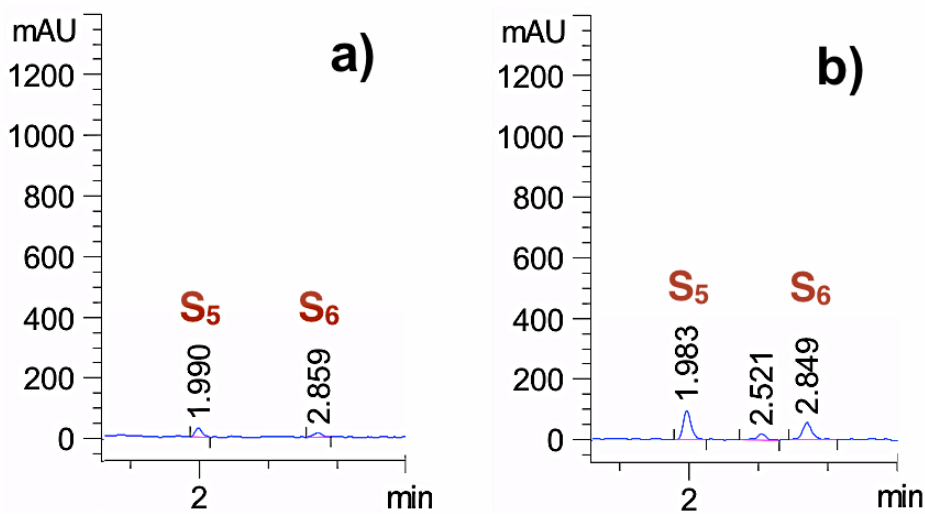


Figura 61. Cromatogramas de muestras de medio KSAH a C:N 11 y CST 150%.

En el medio Landy C:N 11 CST 100% se apreció que la producción de surfactina inicio 1 h antes del inicio de la fase exponencial con la isoforma S₆ y cuando se presentó la fase exponencial también se pudo encontrar a la isoforma S₅ (Figura 62a y b). Conforme pasaba el tiempo aumento la cantidad de isoformas presentes en el medio hasta que aparecieron la S₇ y S₉ a las 17 h que mostró ser la mejor producción del medio (Figura 62c). Posteriormente de este tiempo se siguió observando la presencia de surfactina con las isoformas S₁, S₂, S₅, S₆, S₇, S₈ y S₉ a las 78 h.

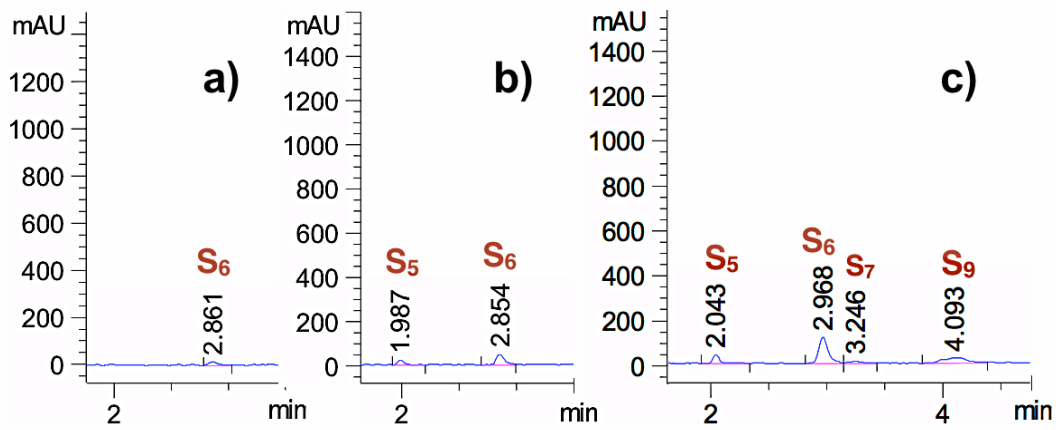


Figura 62. Cromatogramas de muestras de medio Landy a C: N 11 y CST 100%.

Para el medio Landy C:N 11 CST 150% se observó que en ninguna etapa de crecimiento se produjeron biosurfactantes, lo cual puede ser debido a la naturaleza del medio ya que por la cantidad de almidón en este, 119 g/l, no hubo buena oxigenación y por lo tanto las bacterias no pudieron desarrollarse de la forma adecuada, además de que al no tener escases de nutrimentos la bacteria no tenía necesidad de activar el sistema de competencia para sobrevivir y no produjo un excedente biosurfactantes. Sin embargo, en la recolección de espuma se observó que casi a las 24 h hubo presencia surfactantes como se observa en la Figura 63

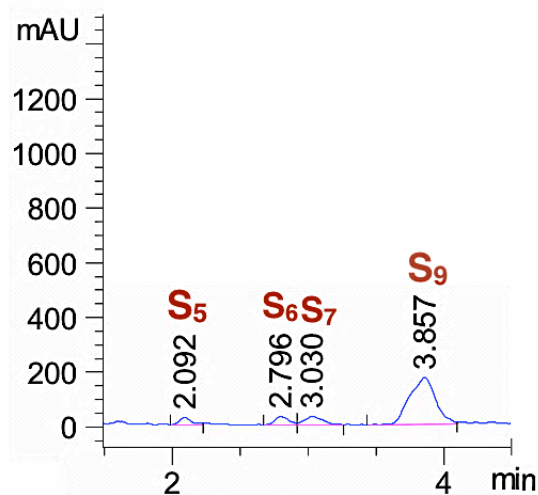


Figura 63. Cromatogramas de muestras de medio Landy a C:N 11 y CST 150%.

Finalmente en el medio KSAH C:N 11 CST 33.3% sin peptona de soya ni extracto de levadura (Figura 64), se observaron concentraciones más altas de surfactina, especialmente a las 15 h de producción de espuma donde se observaron las concentraciones más altas de este biosurfactante incluso con los demás medios de fermentación lo cual puede ser debido a que la bacteria se estreso por falta de nitrógeno

por lo que trato de compensarlo produciendo biosurfactantes que pudieran ayudarle a conseguir este nutriente.

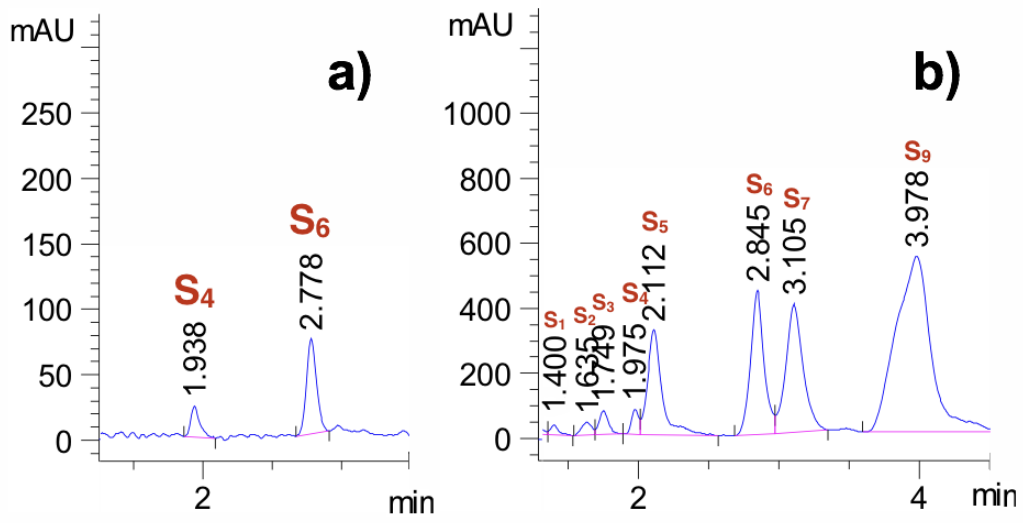


Figura 64. Cromatogramas de muestras de medio KSAH a C: N 11 y CST 33.3% sin peptona de soja ni extracto de levadura.

VII. CONCLUSIONES

- La bacteria *Bacillus subtilis* es una importante productora de biosurfactantes, los cuales pueden ayudar a disminuir los riesgos ambientales provocados por los surfactantes sintéticos.
- La mejor cepa productora de surfactina fue la *Bacillus subtilis* AQ.
- La producción de hemólisis y actividad antimicrobiana no solo dependen de los biosurfactantes producidos, sino también de las isoformas de estos.
- La producción de las isoformas de surfactina dependerá de las condiciones en las que se encuentre el medio de cultivo.
- El mejor medio de cultivo para la producción de surfactina es el medio KSAH C:N 11 CST 33.3% sin peptona de soya ni extracto de levadura.
- La mayor cantidad de surfactina se recuperó de la espuma de los medios de cultivo.

VIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar experimentos probando los medios sin peptona de soya y extracto de levadura.
- Diseñar un método de purificación para las diversas isoformas de surfactina.
- Hacer un análisis del tipo de nutrientes que favorecen la producción de las diferentes isoformas.

IX. BIBLIOGRAFIA

- ◇ Al-Araji L., Zaliha R. N. R. A. R., Basri M. y Baker S.A. (2007) Microbial surfactant. Asia pacific journal of molecular biology and biotechnology. Vol. 15 (3): 99-105.
- ◇ Arima, K.; Kakinuma, A.; Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 488–494.
- ◇ Bassler B. L. (1999) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. Current Opinion in Microbiology 1999, 2:582–587
- ◇ Batista S.D., Mounteer A.H., Amorim F.R., Tótola M.R. (2005). Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. Bioresource technology 97, 868-875.
- ◇ Cavalcante B. F. F.; Pereira de Quadros C.; Maróstica J. M. R.; Maria P. (2007). Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. Quím. Nova vol.30 no.2 São Paulo Mar./Apr.
- ◇ Cooper D.G., MacDonals C.R., Duff S.J.B., Korasic N. (1981). Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions, Appl. Environ. Microb. 42: 408-412.
- ◇ Ceresana (2015). Market Study: Surfactants (2nd edition) <http://www.ceresana.com/en/market-studies/chemicals/surfactants/> consultado 10 de Diciembre de 2015 a las 16:18 h.
- ◇ Coutte F., Lecouturier D., Ait Y. S., Leclère V., Béchet M., Jacques P., Dhulster P. (2010). Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. Appl Microbiol Biotechnol (2010) 87:499–507.
- ◇ Coutte F., Leclère V., Béchet M., Guez JS., Lecouturier D., Chollet- Imbert M., Dhulster P., Jacques P. (2010) Effect of pps disruption and constitutive expression of *urfA* on surfactin productivity, spreading and antagonistic properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives. J Appl Microb. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04683.x
- ◇ Cuervo J.P.L. (2010). Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp. como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Tesis de licenciatura para optar por el título de microbiología agrícola y veterinario. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá D.C. 8-9.
- ◇ Desai J. D., Banat I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiology and molecular biology reviews. American Society for Microbiology. Vol. 61, No. 1. Mar. 1997, p. 47–64
- ◇ Dulmage H.T., Yousten A.A., Singer S., Lacey L.A. (1990). Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. Special programme for research and training in tropical diseases. 42.
- ◇ Effendy M. M. Q., Rahman H. A., Hamid A. A., Khalil S. & Mohd I. M. H. (2015) A simple and effective isocratic HPLC method for fast identification and quantification of surfactin. Sains Malaysiana 44(1) : 115–120
- ◇ Espinosa J. J. M. F. (2005). Caracterización del proceso de crecimiento de *Bacillus subtilis* bajo condiciones anaerobias. Tesis de doctorado del instituto de Biología de la Universidad Autónoma de Mexico. 17-20.
- ◇ Farnet et al US Patent 0198981 A1 (2003)
- ◇ Farrera R.R. Pérez-Guevara F, De la Torre M. (1998) Carbon:nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal cristal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. Appl Microbiol Biotechnol 49: 758-765.
- ◇ Freitas de Oliveira W. D., Lima F. Í. W., Nogueira F. A. K., Lima M. J. J., Aparecida G. A. E., Melo M. V. M., Rocha B. G. L. (2013). Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 101. Page 34–43
- ◇ Ghribi D., Ellouze-Chaabouni S. (2011). Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. Biotechnology research international. Volume 2011, Article ID 653654, 6 pages.
- ◇ Ghribi, D., Abdelkefi-Mesrati, L., Mnif, I., Kammoun, R., Ayadi, I., Saadaoui, I., ... & Chaabouni-Ellouze, S. (2012). Investigation of antimicrobial activity and statistical optimization of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant production in solid-state fermentation. *BioMed Research International*, 2012.
- ◇ Gong G, et al. (2009). Enhanced production of surfactin by *Bacillus subtilis* E8 mutant obtained by ion beam implantation. Food technol. Biotechnol. 47: 27-31.
- ◇ Hernández B. C. I. (2003). Crecimiento y formación de productos en cultivos aeróbicos y anaeróbicos de *Bacillus subtilis* con glucosa, xilosa y celobiosa. Instituto tecnológico de Zacatepec. Tesis.
- ◇ Holmberg K., Jönsson B., Kronberg B., Lindman B. (2003). Surfactants and polymers in aqueous solution. Wiley. Inglaterra.

- ◇ Jain D.K., Collins-Thompson D.L., Lee H and Trevors J.T. (1991) A drop–collapsing test for screening surfactant producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 13: 271-279.
- ◇ Jiménez P. E. (2012). Determinación Experimental de Tensión Superficial del agua en cámara micro-reológica. Tesis. Universidad Carlos III de Madrid. Escuela Politécnica Superior. Departamento de Ingeniería Mecánica. Pág. 10
- ◇ Jiménez I. D., Medina M. S. A., y Gracida R. J. N., (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 26,1: 65-84.
- ◇ Kempe. A. (2016). Imagen de la bacteria *Bacillus subtilis* con una espora. Oxford scientific. Sciencefoto. De. Getty imagenes. [http://www.gettyimagenes.com/search/more-like-this_/135623238?excludenudity=true&mediatype=photography&phrase=bacillus%20subtilis&sort=mostpopular#license.13/11/16 16:23](http://www.gettyimagenes.com/search/more-like-this_/135623238?excludenudity=true&mediatype=photography&phrase=bacillus%20subtilis&sort=mostpopular#license.13/11/16%2016%2016)
- ◇ Kragh-Hansen U., Le Maire M., Moller J.V. (1998) The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes. *Biophys. J.* 75:2932-2946.
- ◇ Lazazzera B. A. (2000) Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Current Opinion in Microbiology* 2000, 3:177–182
- ◇ Maget-Dana, L Thimon R., Peypoux, F., Ptak, M. (1992). Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Société française de biochimie et biologie moléculaire.* 74, 1047-1051.
- ◇ Mejia M. L. F., López V. E. L, (2008). Evaluación del efecto de la relación carbono nitrógeno y el nivel de oxígeno disuelto sobre las producción de biosurfactantes a partir de *Bacillus subtilis*. Tesis de maestría. Centro de investigación de biotecnología avanzada IPN. Tlaxcala, México.
- ◇ Mercado-Flores Y., Cárdenas-Álarez I.O., Rojas-Olvera A.V., Pérez-Camarillo., Leyva-Mir S.G., Anducho-Reyes M.A., (2014). Application of *Bacillus subtilis* in the biological control of the phytopathogenic fungus *Sporisorium reilianum*. *Biological Control* 76:36–40.
- ◇ Morán A.C., Martínez M.A., Siñeriz F. (2002). Quantification of surfactin in culture supernatants by hemolytic activity. *Biotechnology letters* 24: 177-180
- ◇ Mutaz M. A. A., Abid M. S., Ahmad Z., Hasnain S., (2007) Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. *Microbial cell factories* 6:17.
- ◇ Mukherjee S., Das P., Sen R. (2008). Rapid quantification of microbial surfactant by simple turbidimetric method. *J. Microbiol. Methods* 76: 38-42
- ◇ Ongena M., Jacques P. (2007). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology* Vol.16 No.3: 115-125.
- ◇ Ostroumova S. O., Malev V. V., Ilin G. M., Schagina V. L., (2010). Surfactin Activity Depends on the Membrane Dipole Potential. *Langmuir* 2010, 26(19), 15092–15097
- ◇ Pornsunthorntawe O., Arttaweeporn N., Paisanjit S., Soomboonthanate P., Abe M., Rujiravanit R., Chvadeja S., (2008). Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. *Biochemical Engineering Journal* 42: 172-179.
- ◇ Rojas B.M.M. (2011). *Quorum sensing* en la asociación beneficiosa de las bacterias con las plantas. *Rev. Colomb. Biotechnol.* Vol. XII No. 2 135-143.
- ◇ Ramkrishna S. (2010), *Biosurfactants*. Springer+Business Media, LLC Landes Bioscience. Springer series: Advances in experimental medicine and biology.
- ◇ Ramnani P., Suresh S. K., Gupta R., (2005). Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RG1: Bioformulation as detergent additive. *Process biochemistry* 40:3352-3359.
- ◇ Ron E, Rosenberg E. (2001) Natural roles of biosurfactants. *Environ Microbiol*; 3(4):229-236.
- ◇ Roongsawang N., Washio K., Morikawa M. (2010). Diversity of Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Biosynthesis of Lipopeptide Biosurfactants. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 141-172; doi:10.3390/ijms12010141.
- ◇ Sabaté D.C., Audisio M.C. (2013). Inhibitory activity of surfactin, produced by different *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strains, against *Listeria monocytogenes* sensitive and bacteriocin-resistant strains. *Microbiological Research* 168, 125–129.
- ◇ Sen R., Swaminathan T., (2005), Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. *Process biochemistry* 40: 2953-2958.
- ◇ Shaligram N.S. y Singhal R.S. (2010). Surfactin – A Review, *Food Technol. Biotechnol.* 48 (2) 119–134
- ◇ Soriano P. E. Y. (2013). Evaluación de la esporulación de *Bacillus sp.* 83 en función de la densidad celular en cultivos continuos. Universidad Politécnica de Puebla. Pág. 36
- ◇ Sullivan E. R. (1998) Molecular genetics of biosurfactant production. *Current Opinion in Biotechnology.* 9: 263-269.
- ◇ Tadros Th. F (2005). *Applied Surfactant: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. ISBN-13: 978-3-527-30629-9; ISBN-10: 3-527-30629-3 Republica Federal de Alemania.
- ◇ Tipler P. A. (1995) Física Tercera Edición. Sección 11-5 Tensión superficial y capilaridad. Editorial Reverte, S.A. Pág. 344-345.

- ◇ Torres-Papaqui (2010). Tensión superficial Tema II.3. Departamento de Astronomía Universidad de Guanajuato DA-UG. División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Sede Noria Alta (México)
- ◇ Yañez-Ocampo G. Wong-Villarreal A. (2013) Biosurfactantes microbianos, producción potencial con residuos agroindustriales de Chiapas, Biotecnología, año 2013, Vol. 7 No 3.
- ◇ Zana R. (2005). Dynamics of Surfactant Self-Assemblies, Micelles, Microemulsions, Vesicles and Lyotropic Phases. Zana R (Ed). CRC Press. Boca Raton.

X. ANEXOS

ANEXO 1

Cinéticas de crecimiento, actividad superficial y tensión superficial de los medios KSAH con sus diferentes tratamientos.

Cinética de crecimiento

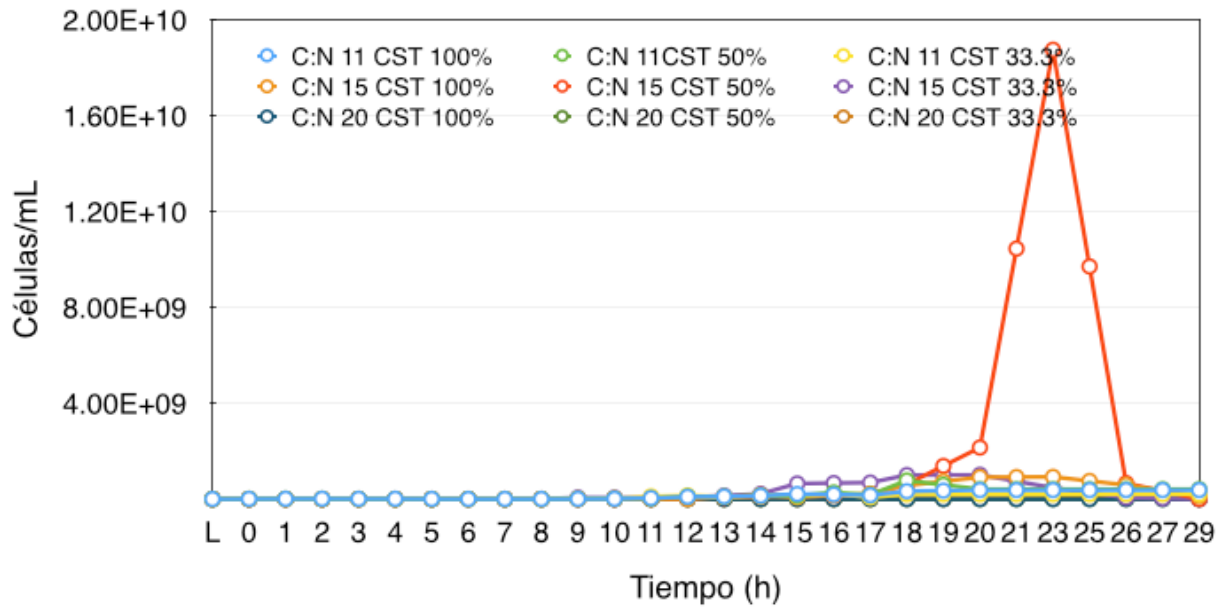


Figura 45. Cinéticas de *Bacillus subtilis* AQ en KSAH.

Cinética de crecimiento

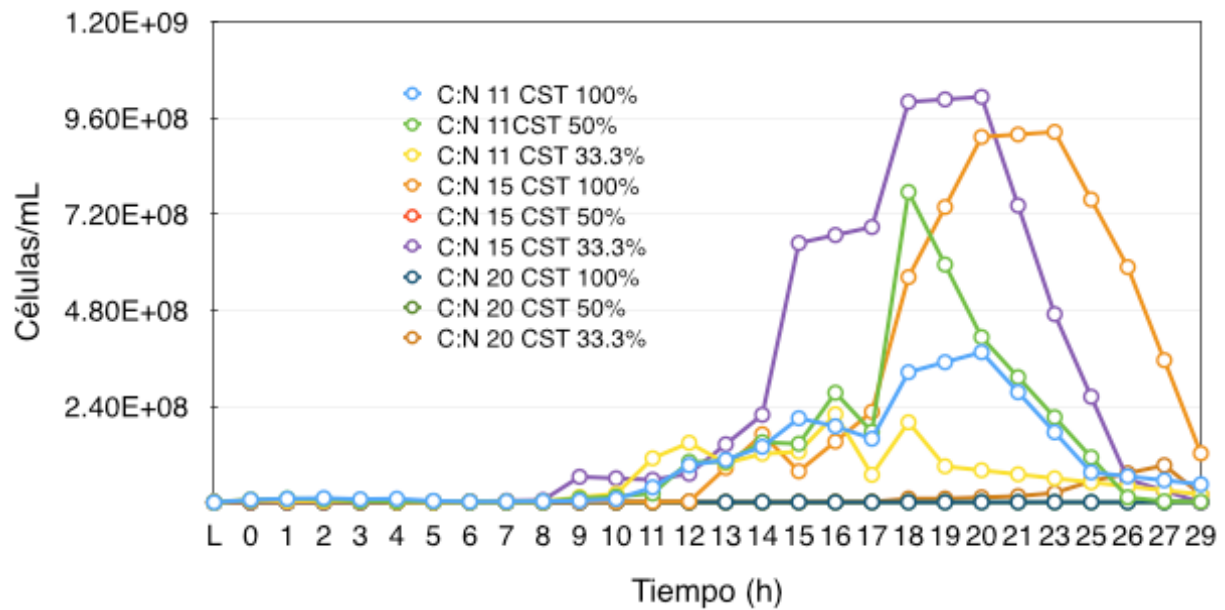


Figura 46. Cinéticas de *Bacillus subtilis* AQ en KSAH sin C:N 15 CST 50%.

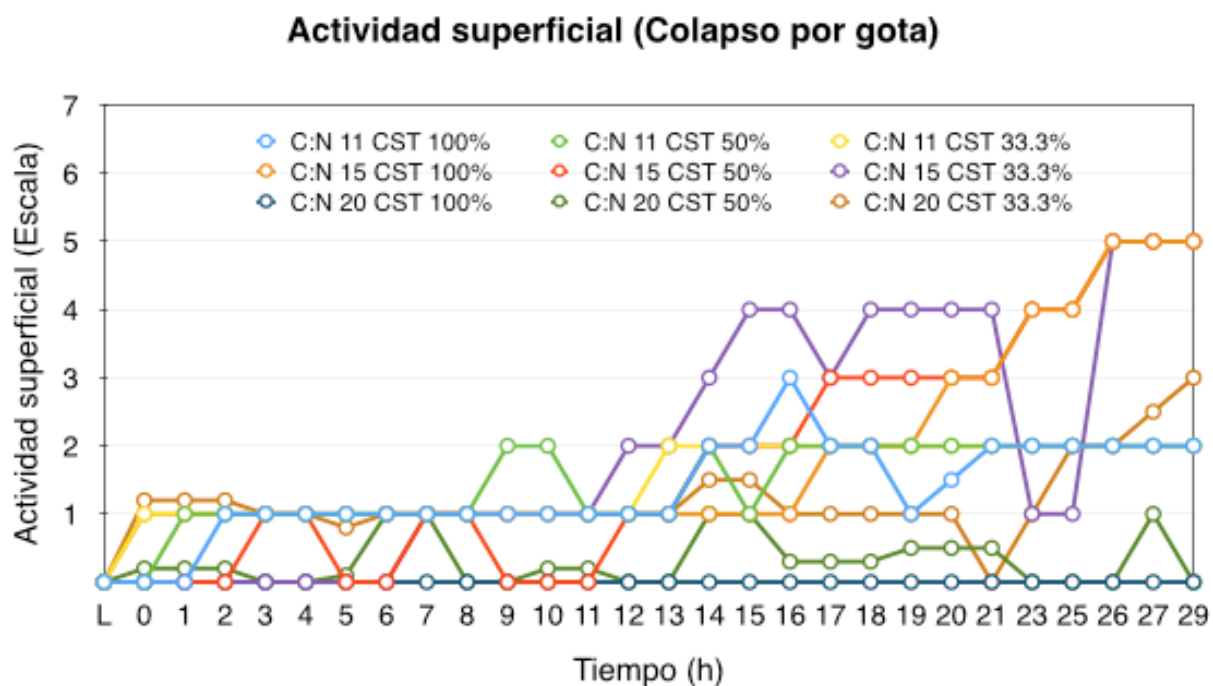


Figura 47. Actividades superficiales de *Bacillus subtilis* AQ en KSAH con la técnica de colapso por gota.

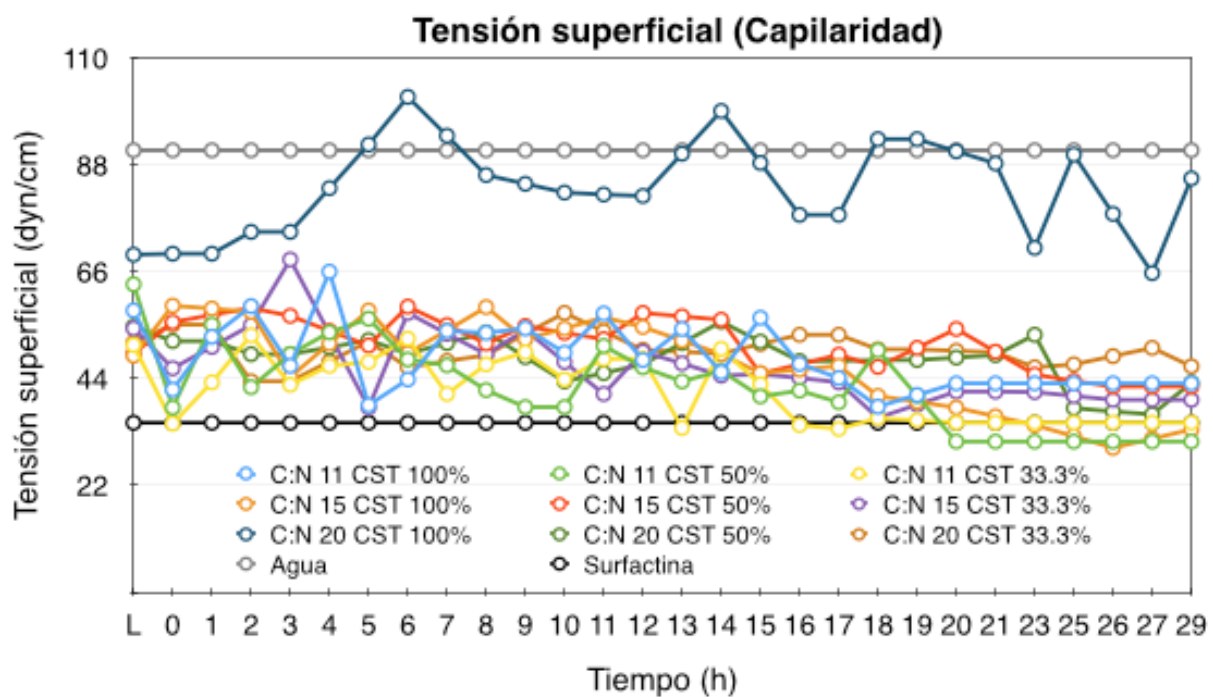


Figura 48. Tensiones superficiales de *Bacillus subtilis* AQ en KSAH por la técnica de capilaridad.

ANEXO 2

Cinéticas de crecimiento, actividad superficial y tensión superficial de los medios Landy con sus diferentes tratamientos.

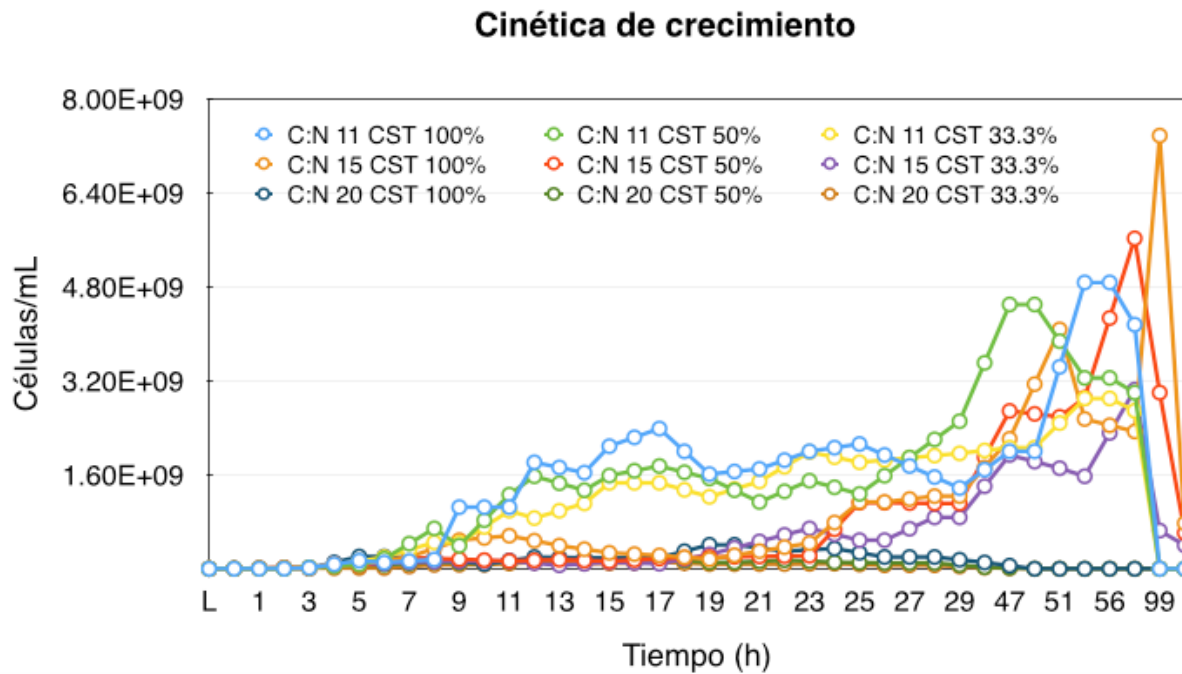


Figura 58. Cinéticas de *Bacillus subtilis* AQ en Landy.

Actividad superficial (Colapso por gota)

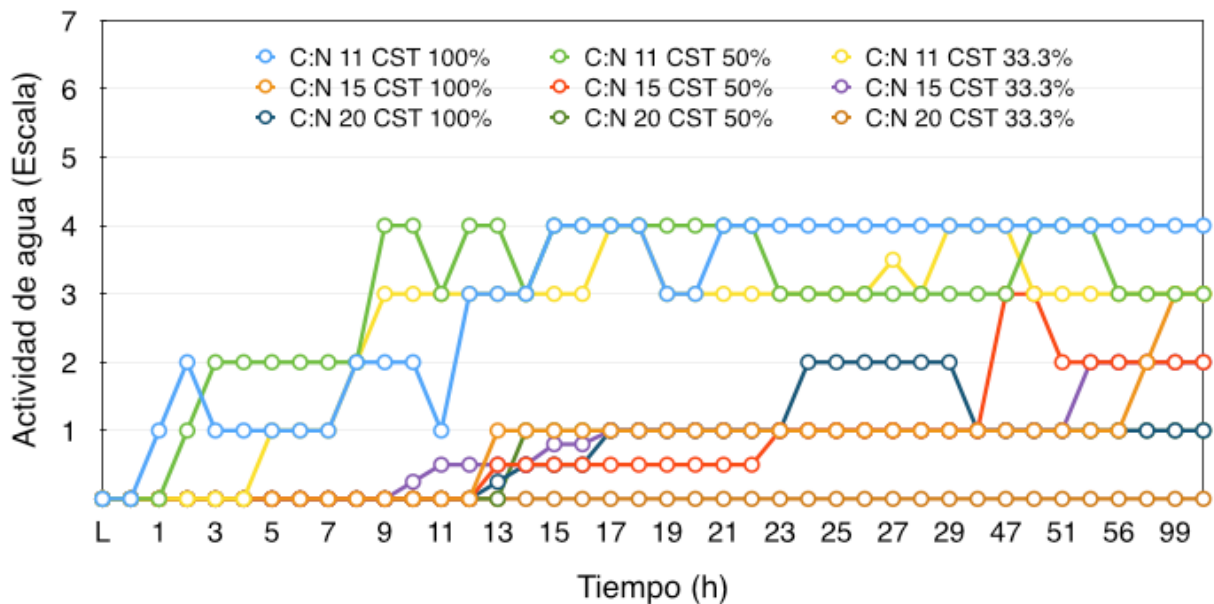


Figura 59. Actividades superficiales de *Bacillus subtilis* AQ en Landy con la técnica de colapso por gota.

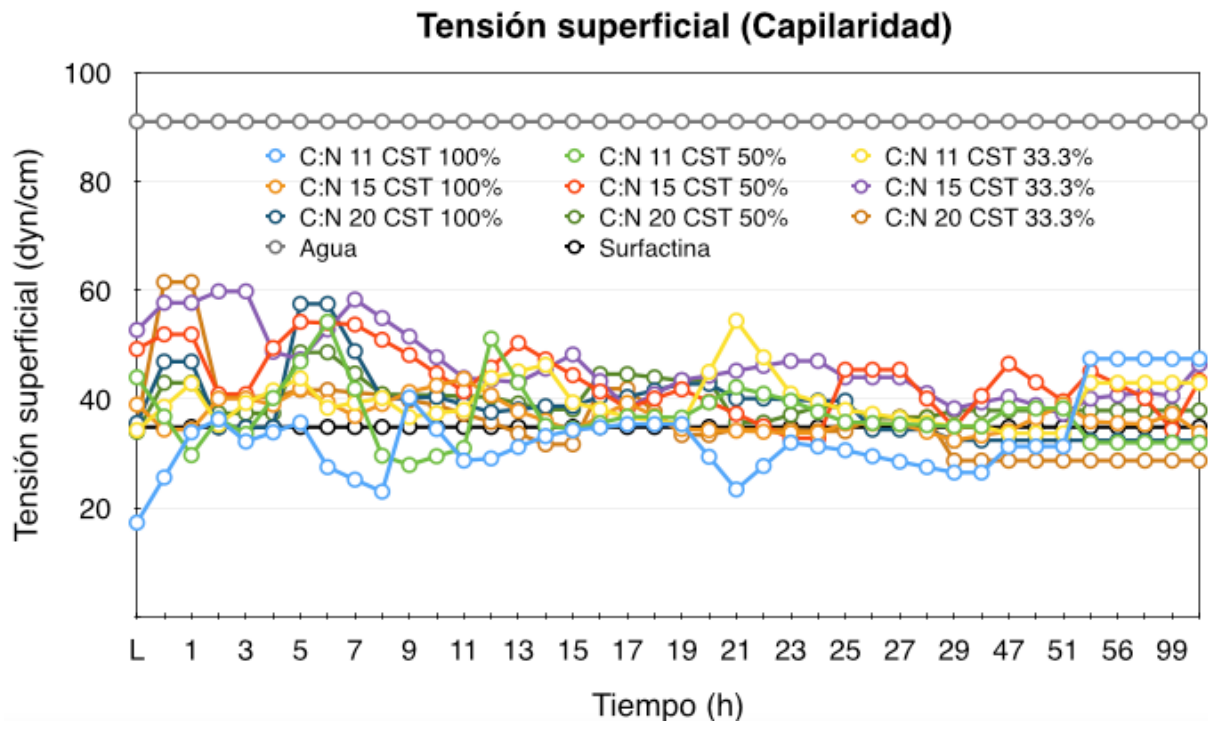


Figura 60. Tensiones superficiales de *Bacillus subtilis* AQ en Landy por la técnica de capilaridad.

ANEXO 3

Análisis de varianza (Anova) de los resultados de tensión superficial (TensiónS) por la técnica de capilaridad de los tratamientos del medio KSAH en sus diferentes CST, realizado con el software SAS 9.4 en un diseño completamente al azar por comparación de medias de Tukey con un índice de confianza de 95%.

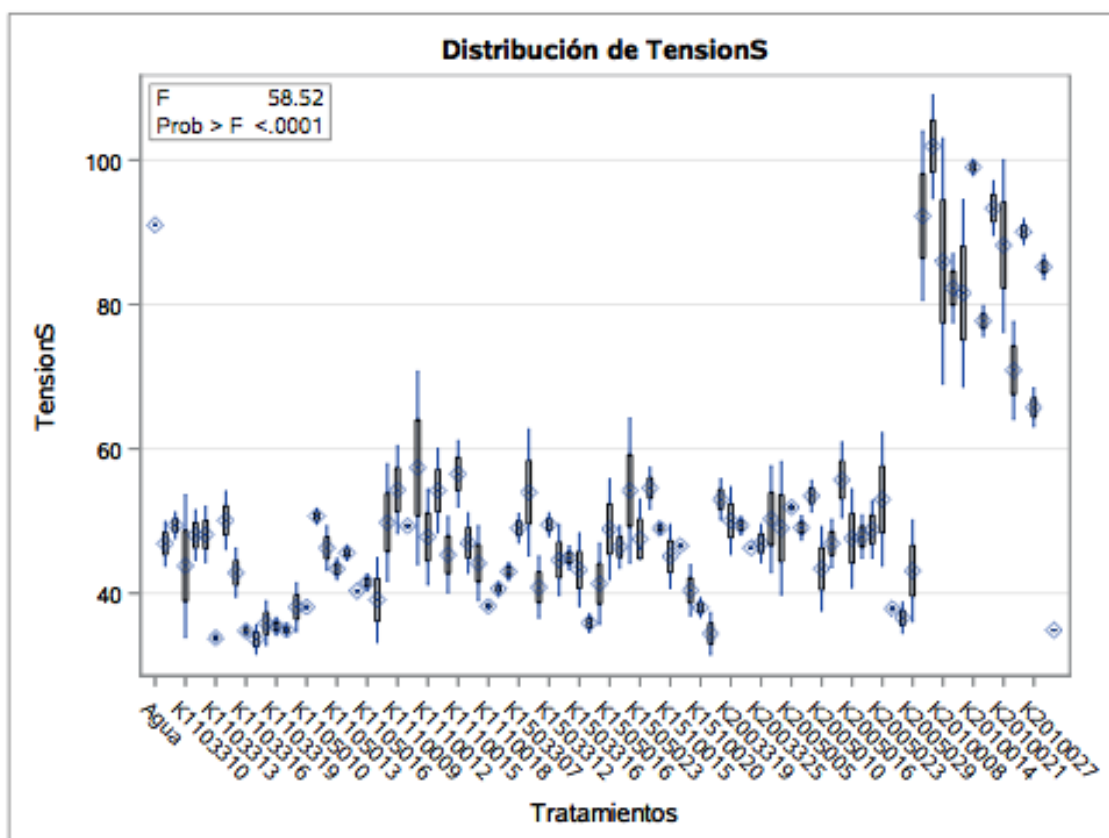
Procedimiento ANOVA

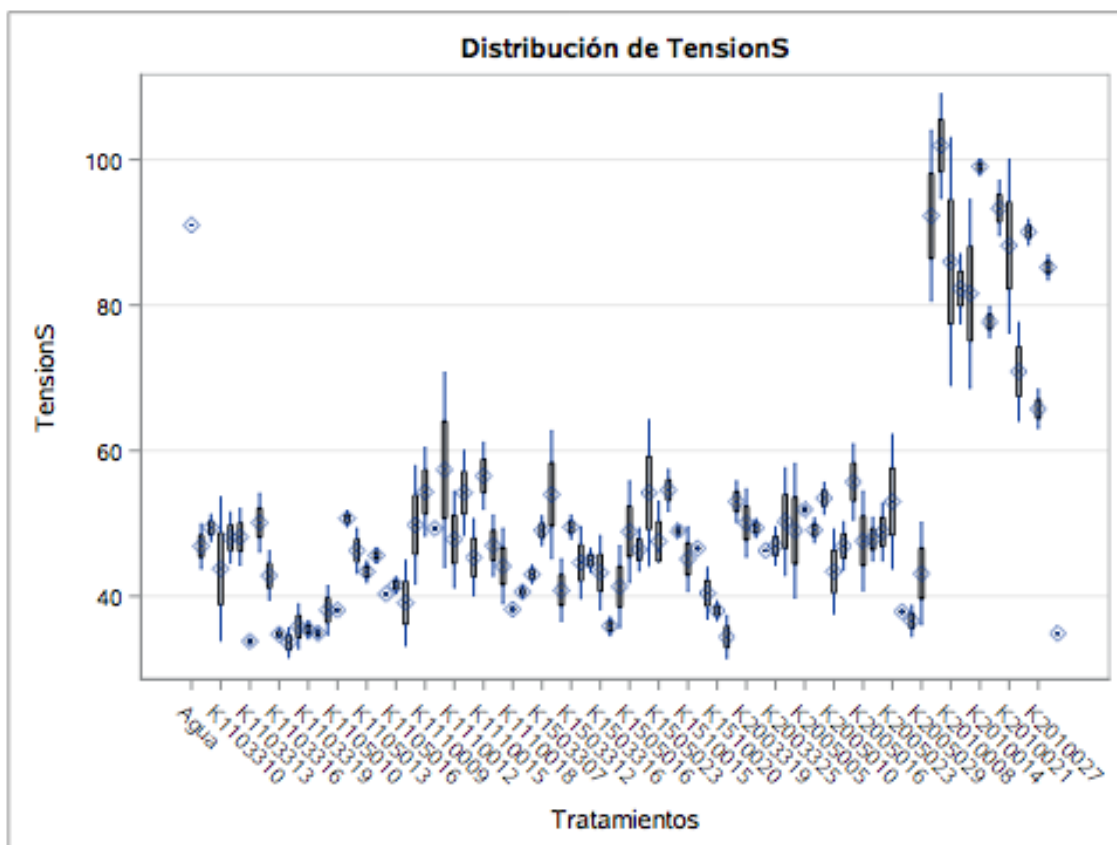
Variable dependiente: TensionS

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	89	94845.23121	1065.67676	58.52	<.0001
Error	270	4916.77750	18.21029		
Total corregido	359	99762.00871			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	TensionS Media
0.950715	8.248294	4.267351	51.73617

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamientos	89	94845.23121	1065.67676	58.52	<.0001





Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TensionS

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	270
Error de cuadrado medio	18.21029
Valor crítico del rango estudentizado	6.10254
Diferencia significativa mínima	13.021

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TensionS

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.													
Tukey Agrupamiento										Media	N	Tratamientos	
									A		101.925	4	K2010006
									A				
		B							A		99.025	4	K2010014
		B							A				
		B							A	C	93.325	4	K2010019
		B							A	C			
		B							A	C	92.250	4	K2010005
		B							A	C			
		B							A	C	91.000	4	Agua
		B							A	C			
		B	D						A	C	90.075	4	K2010025
		B	D							C			
		B	D							C	88.200	4	K2010021
			D							C			
			D							C	85.950	4	K2010008
			D							C			
			D							C	85.200	4	K2010029
			D							C			
			D						E	C	82.275	4	K2010010
			D						E	C			
			D						E	C	81.575	4	K2010012
			D						E				
		F	D						E		77.700	4	K2010016
		F							E				
		F							E		70.875	4	K2010023
		F											
		F							G		65.725	4	K2010027
									G				
		H							G		57.375	4	K1110011
		H							G				
		H							G	I	56.525	4	K1110015
		H							G	I			
		H	J						G	I	55.700	4	K2005014
		H	J						G	I			
		H	J						G	I	54.575	4	K1510012
		H	J						G	I			
	K	H	J						G	I	54.325	4	K1110009

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TensionS

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.													
Tukey Agrupamiento									Media	N	Tratamientos		
K	H	J			G		I						
K	H	J			G		I	L	54.200	4	K1505020		
K	H	J			G		I	L					
K	H	J			G		I	L	54.200	4	K1110013		
K	H	J			G		I	L					
K	H	J			G		I	L	53.975	4	K1503309		
K	H	J			G		I	L					
K	H	J			G	M	I	L	53.475	4	K2005008		
K	H	J			G	M	I	L					
K	H	J	N		G	M	I	L	53.000	4	K2005023		
K	H	J	N		G	M	I	L					
K	H	J	N		G	M	I	L	53.000	4	K2003316		
K	H	J	N			M	I	L					
K	H	J	N	O		M	I	L	51.900	4	K2005005		
K	H	J	N	O		M	I	L					
K	H	P	J	N	O	M	I	L	50.675	4	K1105011		
K	H	P	J	N	O	M	I	L					
K	H	P	J	N	O	M	I	L	50.275	4	K2003327		
K	H	P	J	N	O	M	I	L					
K	H	P	J	N	O	M	I	L	50.100	4	K1103314		
K	H	P	J	N	O	M	I	L					
K	H	P	J	N	O	M	I	L	50.025	4	K2003319		
K	H	P	J	N	O	M	I	L					
K	H	P	J	N	O	M	I	L	49.800	4	K1105018		
K	H	P	J	N	O	M	I	L					
K	Q	H	P	J	N	O	M	I	L	49.500	4	K1503312	
K	Q	H	P	J	N	O	M	I	L				
K	Q	H	P	J	N	O	M	I	L	49.400	4	K1103309	
K	Q	H	P	J	N	O	M	I	L				
K	Q	H	P	J	N	O	M	I	L	49.375	4	K2003321	
K	Q	H	P	J	N	O	M	I	L				
K	Q	H	P	J	N	O	M	I	L	49.300	4	K1110010	
K	Q	H	P	J	N	O	M	I	L				
K	Q	H	P	J	N	O	M	I	L	49.075	4	K2005006	
K	Q	H	P	J	N	O	M	I	L				
K	Q	H	P	J	N	O	M	I	L	49.000	4	K2005003	
K	Q	H	P	J	N	O	M	I	L				

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TensionS

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.																			
Tukey Agrupamiento											Media	N	Tratamientos						
	K	Q	H	P	J		N		O	M	I	L	49.000	4	K1503307				
	K	Q	H	P	J		N		O	M	I	L							
	K	Q	H	P	J		N		O	M	I	L	48.975	4	K1510013				
	K	Q	H	P	J		N		O	M	I	L							
R	K	Q	H	P	J		N		O	M	I	L	48.875	4	K1505016				
R	K	Q	H	P	J		N		O	M	I	L							
R	K	Q	H	P	J		N		O	M	I	L	S	48.825	4	K2005021			
R	K	Q	H	P	J		N		O	M	I	L	S						
R	K	Q	H	P	J		N		O	M	I	T	L	S	48.125	4	K1103312		
R	K	Q	H	P	J		N		O	M	I	T	L	S					
R	K	Q	H	P	J		N		O	M	I	T	L	S	48.025	4	K1103311		
R	K	Q	H	P	J		N		O	M	I	T	L	S					
R	K	Q	H	P	J		N		O	M	U	I	T	L	S	47.825	4	K2005019	
R	K	Q	H	P	J		N		O	M	U	I	T	L	S				
R	K	Q	H	P	J		N		O	M	U	I	T	L	S	47.800	4	K1110012	
R	K	Q	H	P	J		N		O	M	U	I	T	L	S				
R	K	Q	H	P	J		N		O	V	M	U	I	T	L	S	47.600	4	K2005016
R	K	Q	H	P	J		N		O	V	M	U	I	T	L	S			
R	K	Q	H	P	J		N		O	V	M	U	I	T	L	S	47.525	4	K1505023
R	K	Q	H	P	J		N		O	V	M	U	I	T	L	S			
R	K	Q	H	P	J		N	W	O	V	M	U	I	T	L	S	46.975	4	K1110016
R	K	Q	H	P	J		N	W	O	V	M	U	I	T	L	S			
R	K	Q	H	P	J		N	W	O	V	M	U	I	T	L	S	46.900	4	K2005012
R	K	Q	H	P	J		N	W	O	V	M	U	I	T	L	S			
R	K	Q	H	P	J		N	W	O	V	M	U	I	T	L	S	46.900	4	K2003325
R	K	Q	H	P	J		N	W	O	V	M	U	I	T	L	S			
R	K	Q	H	P	J		N	W	O	V	M	U	I	T	L	S	46.875	4	K1103308
R	K	Q	H	P	J		N	W	O	V	M	U	I	T	L	S			
R	K	Q	H	P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S	46.575	4	K1510016
R	K	Q	H	P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S			
R	K	Q	H	P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S	46.400	4	K1505018
R	K	Q	H	P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S			
R	K	Q	H	P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S	46.275	4	K2003323
R	K	Q	H	P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S			
R	K	Q	H	P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S	46.275	4	K1105012
R	K	Q	H	P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S			
R	K	Q	H	P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S	45.600	4	K1105014

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Tensiones

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.																			
Tukey Agrupamiento														Media	N	Tratamientos			
R	K	Q	H	P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S			
R	K	Q	H	P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S	45.325	4	K1110014
R	K	Q	H	P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S			
R	K	Q	H	P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S	45.100	4	K1510015
R	K	Q	H	P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S			
R	K	Q	H	P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S	44.900	4	K1503315
R	K	Q	H	P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S			
R	K	Q	H	P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S	44.600	4	K1503313
R	K	Q		P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S			
R	K	Q		P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S	44.125	4	K1110017
R	K	Q		P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S			
R	K	Q		P	J	X	N	W	O	V	M	U	I	T	L	S	43.775	4	K1103310
R	K	Q		P	J	X	N	W	O	V	M	U		T	L	S			
R	K	Q		P	J	X	N	W	O	V	M	U		T	L	S	43.400	4	K2005010
R	K	Q		P	J	X	N	W	O	V	M	U		T	L	S			
R	K	Q		P	J	X	N	W	O	V	M	U		T	L	S	43.375	4	K1105013
R	K	Q		P	J	X	N	W	O	V	M	U		T	L	S			
R	K	Q		P	J	X	N	W	O	V	M	U		T	L	S	43.225	4	K1503316
R	K	Q		P	J	X	N	W	O	V	M	U		T	L	S			
R	K	Q		P	J	X	N	W	O	V	M	U		T	L	S	43.100	4	K2005029
R	K	Q		P	J	X	N	W	O	V	M	U		T	L	S			
R	K	Q		P	J	X	N	W	O	V	M	U		T	L	S	43.000	4	K1110020
R	K	Q		P	J	X	N	W	O	V	M	U		T	L	S			
R	K	Q		P	J	X	N	W	O	V	M	U		T	L	S	42.825	4	K1103315
R	K	Q		P		X	N	W	O	V	M	U		T	L	S			
R	K	Q		P		X	N	W	O	V	M	U		T	L	S	41.500	4	K1105016
R		Q		P		X	N	W	O	V	M	U		T	L	S			
R		Q		P		X	N	W	O	V	M	U		T	L	S	41.300	4	K1503320
R		Q		P		X	N	W	O	V	M	U		T		S			
R		Q		P		X	N	W	O	V	M	U		T		S	40.825	4	K1503310
R		Q		P		X	N	W	O	V	M	U		T		S			
R		Q		P		X	N	W	O	V	M	U		T		S	40.600	4	K1110019
R		Q		P		X	N	W	O	V		U		T		S			
R		Q		P		X	N	W	O	V		U		T		S	40.400	4	K1510018
R		Q		P		X	N	W	O	V		U		T		S			
R		Q		P		X	N	W	O	V		U		T		S	40.300	4	K1105015
R		Q		P		X		W	O	V		U		T		S			

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TensionS

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.												
Tukey Agrupamiento										Media	N	Tratamientos
R	Q	P	X	W	O	V	U	T	S	39.075	4	K1105017
R	Q	P	X	W		V	U	T	S			
R	Q	P	X	W		V	U	T	S	38.200	4	K1110018
R	Q	P	X	W		V	U	T	S			
R	Q	P	X	W		V	U	T	S	38.075	4	K1105010
R	Q	P	X	W		V	U	T	S			
R	Q	P	X	W		V	U	T	S	38.075	4	K1105009
R	Q	P	X	W		V	U	T	S			
R	Q	P	X	W		V	U	T	S	38.000	4	K1510020
R	Q	P	X	W		V	U	T	S			
R	Q	P	X	W		V	U	T	S	37.875	4	K2005025
R	Q		X	W		V	U	T	S			
R	Q		X	W		V	U	T	S	36.600	4	K2005027
R			X	W		V	U	T	S			
R			X	W		V	U	T	S	35.875	4	K1503318
			X	W		V	U	T	S			
			X	W		V	U	T	S	35.825	4	K1103318
			X	W		V	U	T				
			X	W		V	U	T		35.400	4	K1103319
			X	W		V	U					
			X	W		V	U			34.900	4	K1103320
			X	W		V	U					
			X	W		V	U			34.880	4	Surfctin
			X	W		V						
			X	W		V				34.775	4	K1103316
			X	W								
			X	W						34.400	4	K1510023
			X									
			X							33.800	4	K1103313
			X									
			X							33.600	4	K1103317

ANEXO 4

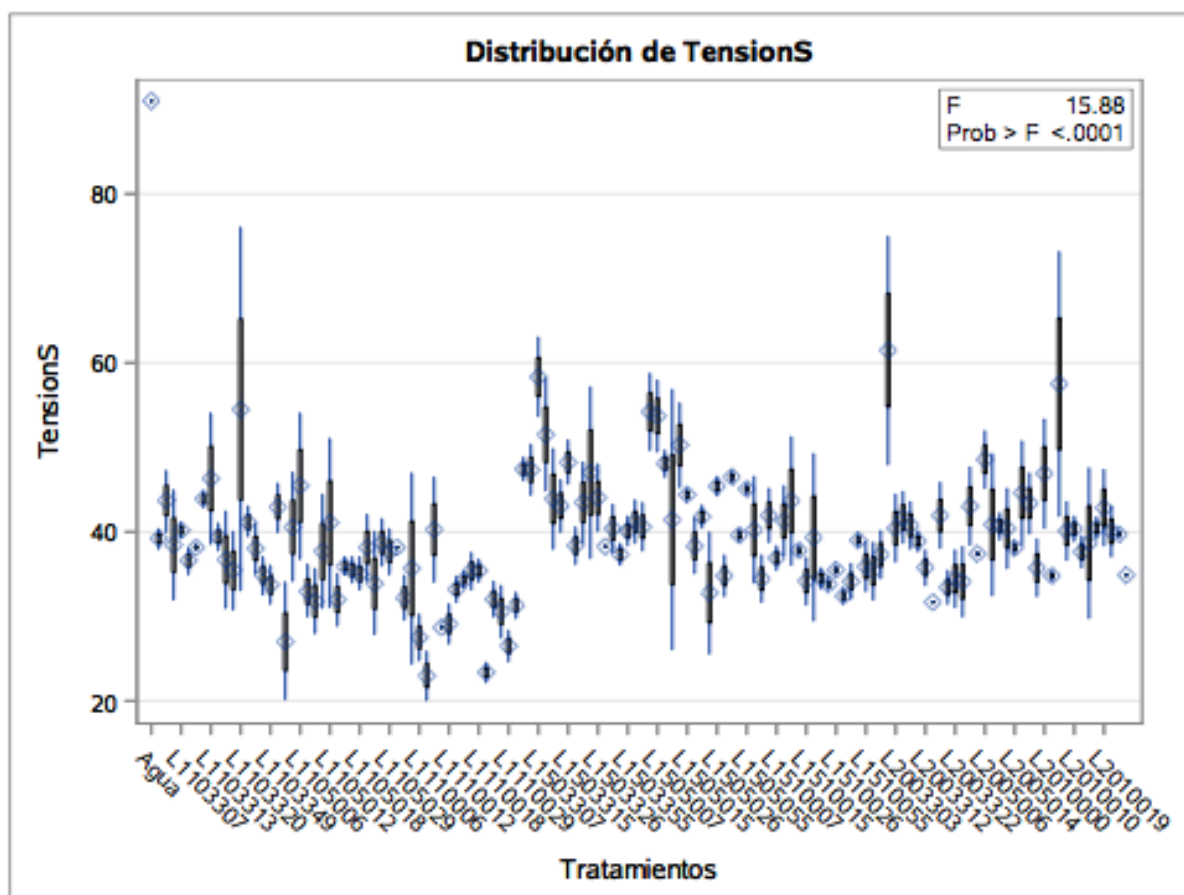
Análisis de varianza (Anova) de los resultados de tensión superficial (TensiónS) por la técnica de capilaridad de los tratamientos del medio Landy en sus diferentes CST, realizado con el software SAS 9.4 en un diseño completamente al azar por comparación de medias de Tukey con un índice de confianza de 95%.

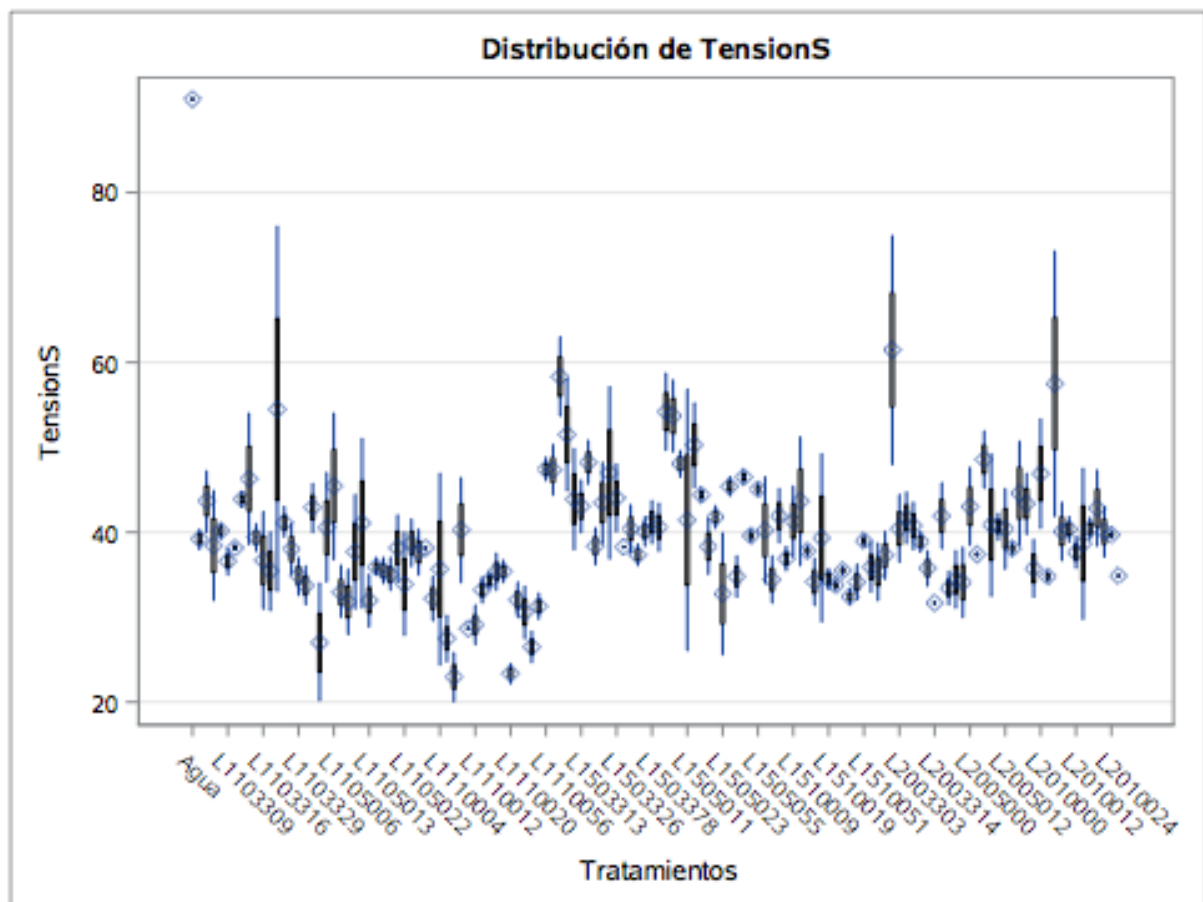
Variable dependiente: TensionS

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	131	32628.38400	249.07163	15.88	<.0001
Error	396	6211.00000	15.68434		
Total corregido	527	38839.38400			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	TensionS Media
0.840085	9.995845	3.960346	39.61992

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamientos	131	32628.38400	249.07163	15.88	<.0001





Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TensionS

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	396
Error de cuadrado medio	15.68434
Valor crítico del rango estudentizado	6.31493
Diferencia significativa mínima	12.505

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TensionS

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.																		
Tukey Agrupamiento													Media	N	Tratamientos			
												A	91.000	4	Agua			
												B	61.475	4	L2003300			
												B						
												C	58.325	4	L1503307			
												C						
												C						
												C	57.500	4	L2010006			
												C						
												C	54.475	4	L1103320			
												C						
												C	54.200	4	L1505005			
												C						
												C	53.700	4	L1505007			
												C						
												C	51.500	4	L1503309			
												C						
												C	50.275	4	L1505013			
												C						
												C	48.575	4	L2005006			
												C						
												C	48.225	4	L1503315			
												C						
												C	48.075	4	L1505009			
												C						
M	F	L	C	K	E	I	J	H	D	G			47.425	4	L1110056			
M	F	L	C	K	E	I	J	H	D	G								
M	F	L	C	K	E	I	J	H	D	G	N		47.325	4	L1503305			
M	F	L	C	K	E	I	J	H	D	G	N							
M	F	L	C	K	E	I	J	H	D	O	G	N	47.000	4	L1503323			
M	F	L	C	K	E	I	J	H	D	O	G	N						
M	F	L	C	K	E	I	J	H	P	D	O	G	N	46.900	4	L2010000		
M	F	L	C	K	E	I	J	H	P	D	O	G	N					
M	F	L	C	K	E	I	J	Q	H	P	D	O	G	N	46.500	4	L1505047	
M	F	L	C	K	E	I	J	Q	H	P	D	O	G	N				
M	F	L	C	K	E	I	R	J	Q	H	P	D	O	G	N	46.300	4	L1103313
M	F	L		K	E	I	R	J	Q	H	P	D	O	G	N			
M	F	L	S	K	E	I	R	J	Q	H	P	D	O	G	N	45.450	4	L1105006

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Tensiones

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.																								
Tukey Agrupamiento															Media	N	Tratamientos							
M	F	L	S	K	E	I	R	J	Q	H	P	D	O	G	N									
M	F	L	S	K	E	T	I	R	J	Q	H	P	D	O	G	N	45.400	4	L1505026					
M	F	L	S	K	E	T	I	R	J	Q	H	P	D	O	G	N								
M	F	L	S	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	D	O	G	N	45.075	4	L1505055				
M	F	L	S	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P		O	G	N							
M	F	L	S	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	44.600	4	L2005017				
M	F	L	S	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N							
M	F	L	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	44.400	4	L1505015			
M	F	L	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N						
M	F	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	44.025	4	L1503326		
M	F	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N					
M	F	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	43.900	4	L1103312		
M	F	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N					
M	F	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	43.900	4	L1503311		
M	F	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N					
M	F	Y	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	43.700	4	L1103304	
M	F	Y	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N				
M	F	Y	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	43.675	4	L1510011	
M	F	Y	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N				
M	F	Y	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	43.475	4	L1503319	
M	F	Y	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N				
M	F	Y	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	43.375	4	L2005019	
M	F	Y	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N				
M	Z	F	Y	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	43.075	4	L1503313
M	Z	F	Y	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N			
M	Z	F	Y	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	43.025	4	L2005000
M	Z	F	Y	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N			
M	Z	F	Y	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	42.925	4	L1103356
M	Z	F	Y	L	X	S	W	K	U	E	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N			
M	Z	F	Y	L	X	S	W	K	U		T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	42.825	4	L2010019
M	Z	F	Y	L	X	S	W	K	U		T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	41.925	4	L1510005
M	Z	F	Y	L	X	S	W	K	U		T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N			
M	Z	F	Y	L	X	S	W	K	U		T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	41.925	4	L2003317
M	Z	F	Y	L	X	S	W	K	U		T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N			
M	Z	F	Y	L	X	S	W	K	U		T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	41.800	4	L1505019
M	Z	F	Y	L	X	S	W	K	U		T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N			

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Tensiones

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.																Media	N	Tratamientos						
Tukey Agrupamiento																								
M	Z	F	Y	L	X	S	W	K	U		T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	41.700	4	L2003306
M	Z		Y	L	X	S	W	K	U		T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N			
M	Z		Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	41.425	4	L1505011
M	Z		Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N			
M	Z		Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	41.300	4	L1510009
M	Z		Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N			
M	Z		Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	G	N	41.200	4	L1503378
M	Z		Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N			
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N	41.125	4	L1103322
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N			
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N	41.075	4	L1105012
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N			
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N	40.875	4	L2005008
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N			
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N	40.775	4	L2003308
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N			
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N	40.675	4	L2005010
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N			
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N	40.600	4	L1503399
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N			
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N	40.550	4	L1105004
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N			
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N	40.425	4	L2003303
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N			
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N	40.425	4	L2010017
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N			
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N	40.400	4	L2005012
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N			
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N	40.400	4	L1503347
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N			
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N	40.375	4	L2010010
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N			
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N	40.275	4	L1110009
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N			
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N	40.225	4	L1505078
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N			
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O		N	40.175	4	L1103307

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TensionS

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.																										
Tukey Agrupamiento															Media	N	Tratamientos									
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	N						
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	N	40.100	4	L2010008			
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	N						
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	N	40.100	4	L1503355			
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	N						
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	N	40.075	4	L2010022			
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	N						
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	C	N	39.700	4	L2010024		
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	C	N					
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	C	N	39.600	4	L1505051		
M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	C	N					
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	C	N	39.400	4	L1103315	
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	C	N				
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	C	N	39.325	4	L1510017	
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	C	N				
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	C	N	39.225	4	L1103303	
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	C	N				
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q	H	P	V	O	C	N	E	39.000	4	L1510051
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E	38.900	4	L2003310
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E	38.725	4	L1105024
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E	38.675	4	L2010014
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E	38.425	4	L1103306
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E	38.375	4	L1503317
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E	38.325	4	L1505017
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E	38.275	4	L1503329
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E	38.150	4	L1105020
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E	38.150	4	L1105049
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E			

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TensionS

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.																										
Tukey Agrupamiento																Media	N	Tratamientos								
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E	38.150	4	L1103310
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E	38.100	4	L2005014
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E	38.025	4	L1103324
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T	I	R	J	Q		P	V	O	C	N	E	37.800	4	L1510013
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	J	Q		P	V	O	C	N	E	37.700	4	L1105010
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	J	Q		P	V	O	C	N	E	37.675	4	L1105029
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	J	Q		P	V	O	C	N	E	37.625	4	L2010012
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	J	Q		P	V	O	C	N	E	37.400	4	L2005003
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	J	Q		P	V	O	C	N	E	37.325	4	L1503351
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	J	Q		P	V	O	C	N	E	37.300	4	L1510099
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	J	Q		P	V	O	C	N	E	36.900	4	L1510007
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	J	Q		P	V	O	C	N	E	36.700	4	L1103316
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	J	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	J	Q		P	V	O	C	N	E	36.600	4	L1103309
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R		Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R		Q		P	V	O	C	N	E	35.900	4	L1510055
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R		Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R		Q		P	V	O	C	N	E	35.900	4	L1105015
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R		Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	F	Q		P	V	O	C	N	E	35.775	4	L2003312
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	F	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W	K	U	A	T		R	F	Q		P	V	O	C	N	E	35.725	4	L2005022
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W		U	A	T		R	F	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	L	X	S	W		U	A	T		R	F	Q		P	V	O	C	N	E	35.675	4	L1110004
D	M	Z	B	Y		X	S	W		U	A	T		R	F	Q		P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y		X	S	W		U	A	T		R	F	Q		P	V	O	C	N	E	35.500	4	L1510026

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Tensiones

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.																							
Tukey Agrupamiento															Media	N	Tratamientos						
D	M	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	P	V	O	C	N	E				
D	M	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E	35.450	4	L1103318
D	M	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E	35.450	4	L1105016
D	M	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E	35.400	4	L1110018
D	M	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E	35.375	4	L1510078
D	M	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E	35.375	4	L1110016
D	M	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E			
D	M	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E	35.000	4	L1105018
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E			
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E	34.900	4	L1103329
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E			
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C	N	E	34.880	4	Surfctin
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C		E			
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C		E	34.800	4	L1505029
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C		E			
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C		E	34.800	4	L2010003
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C		E			
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V	O	C		E	34.500	4	L1510019
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V		C		E			
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V		C		E	34.425	4	L1505099
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V		C		E			
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G	P	V		C		E	34.425	4	L2003322
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G		V		C		E			
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G		V		C		E	34.300	4	L1110015
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G		V		C		E			
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G		V		C		E	34.175	4	L1510015
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G		V		C		E			
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G		V		C		E	34.125	4	L1510047
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G		V		C		E			
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F	Q	G		V		C		E	34.100	4	L2003324
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F		G		V		C		E			
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	R	F		G		V		C		E	33.875	4	L1105022
D		Z	B	Y	X	S	W	U	A	T		F		G		V		C		E			

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TensionS

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.																	
Tukey Agrupamiento												Media	N	Tratamientos			
D	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	F	G	V	C	E	33.775	4	L1510023
D	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	F	G	V	C	E			
D	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	F	G	V	C	E	33.725	4	L1103349
D	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	F	G	V	C	E			
D	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	F	G	V	C	E	33.425	4	L2003319
D	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	F	G	V	C	E			
D	Z	B	Y	X	S	W	U	A	T	F	G	V	C	E	33.200	4	L1110013
D	Z	B	Y	X		W	U	A	T	F	G	V	C	E			
D	Z	B	Y	X		W	U	A	T	F	G	V	C	E	32.925	4	L1105007
D	Z	B	Y	X		W	U	A		F	G	V	C	E			
D	Z	B	Y	X		W	U	A		F	G	V	C	E	32.775	4	L1505023
D	Z	B	Y	X		W		A		F	G	V	C	E			
D	Z	B	Y	X		W		A		F	G	V	C	E	32.425	4	L1510029
D	Z	B	Y	X		W		A		F	G	V	C	E			
D	Z	B	Y	X		W		A		F	G	V	C	E	32.200	4	L1110003
D	Z	B	Y	X		W		A		F	G		C	E			
D	Z	B	Y	X		W		A		F	G		C	E	32.025	4	L1110022
D	Z	B	Y	X		W		A		F	G		C	E			
D	Z	B	Y	X		W		A		F	G		C	E	31.975	4	L1105013
D	Z	B	Y	X				A		F	G		C	E			
D	Z	B	Y	X				A		F	G		C	E	31.800	4	L1105009
D	Z	B	Y	X				A		F	G		C	E			
D	Z	B	Y	X				A		F	G		C	E	31.675	4	L2003314
D	Z	B	Y					A		F	G		C	E			
D	Z	B	Y					A		F	G		C	E	31.300	4	L1110049
D	Z	B						A		F	G		C	E			
D	Z	B						A		F	G		C	E	30.575	4	L1110024
D		B						A		F	G		C	E			
D		B						A		F	G		C	E	29.100	4	L1110012
D		B								F	G		C	E			
D		B								F	G		C	E	28.675	4	L1110010
D										F	G		C	E			
D										F	G		C	E	27.500	4	L1110006
D										F	G			E			
D										F	G			E	27.000	4	L1105003
										F	G			E			
										F	G			E	26.500	4	L1110029

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TensionS

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.																		
Tukey Agrupamiento														Media	N	Tratamientos		
														F	G			
														F	G	23.375	4	L1110020
															G			
															G	22.975	4	L1110007