



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS
LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA



TESIS:

ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE BIOSURFACTANTES BACTERIANOS
SOBRE HONGOS FITOPATÓGENOS DE INTERÉS AGRÍCOLA.

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MARÍA DEL ROSARIO BARRERA TAMARIZ

DIRECTOR:

DR. GUSTAVO YÁÑEZ OCAMPO.

CO DIRECTOR DR. JESÚS RICARDO SÁNCHEZ PALE, UAEMEX.

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

CONTENIDO

RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	6
2. MARCO TEÓRICO	9
2.1 <i>Agricultura en México.</i>	9
2.1.1 Problemas por hongos fitopatógenos en campos agrícolas de México.	10
2.1.2 Uso de fungicidas en el control de hongos fitopatógenos	11
2.1.3 Problemática del uso de fungicidas.....	11
2.2 <i>Biosurfactantes</i>	14
2.2.1 Propiedades de los biosurfactantes	14
2.2.2 Clasificación de los biosurfactantes	20
2.2.3 Biosíntesis de biosurfactantes bacterianos	27
2.2.4 Aplicaciones de los biosurfactantes	29
2.2.5 Biosurfactantes en control biológico de hongos fitopatógenos	31
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo General:	34
5. HIPÓTESIS	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS	35
6.1 <i>Origen de las cepas bacterianas productoras de biosurfactantes</i>	35
6.2 <i>Reactivación del cepario</i>	35
6.3 <i>Confirmación de producción de biosurfactantes</i>	36
6.4 <i>Cinéticas de crecimiento y producción de biosurfactantes</i>	36
6.5 <i>Producción de biosurfactantes totales por precipitación ácida.</i>	38
6.6 <i>Pruebas de actividad antagónica contra los hongos fitopatógenos Fusarium, Rhizoctonia y Botrytis.</i>	39
6.7 <i>Análisis estadístico</i>	40
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
7.1 <i>Prueba cualitativa de la producción de biosurfactantes en agar azul de metileno y aceite de soya al 2%.</i>	41

7.2	<i>Cinéticas de crecimiento y producción de biosurfactantes</i>	42
7.3	<i>Producción de biosurfactantes totales por precipitación ácida</i>	50
7.4	<i>Pruebas de actividad antagónica contra los hongos fitopatógenos Fusarium spp., Rhizoctonia spp. y Botrytis spp.</i>	54
8.	CONCLUSIONES	60
9.	REFERENCIAS	61

Índice de figuras

Figura 1.	Monómero de un biosurfactante.....	14
Figura 2.	Arreglo de moléculas biosurfactantes en la interfase de una mezcla heterogénea.....	15
Figura 3.	Estructura de una micela.....	15
Figura 4.	Pasos en la reducción de la tensión superficial debido a la adición de biosurfactantes hasta alcanzar la concentración micelar crítica y la formación de micelas.....	17
Figura 5.	Estructura química de la surfactina.....	23
Figura 6.	Cultivos de las diferentes cepas estudiadas durante la cinética microbiana.....	37
Figura 7.	Cultivos bacterianos para la producción de biosurfactantes (izquierda); Sobrenadante libre de células (medio); Concentrado final de biosurfactantes totales (derecha).....	39
Figura 8.	Crecimiento de las cepas 2, 4, 2214 y 27853, durante 16 días.....	43
Figura 9.	Índice de emulsificación de las cepas 2, 4, 2214 y 27853, durante 16 días.....	44
Figura 10.	Prueba de índice de emulsificación con el sobrenadante libre de células de las diferentes cepas bacterianas de interés.....	44
Figura 11.	Concentrado de biosurfactantes totales.....	51
Figura 12.	Inhibición del crecimiento de Rhizoctonia con la aplicación del biosurfactante en diferentes dosis. T: Testigo.....	56

Índice de Tablas

Tabla 1. Hongos fitopatógenos presentes en cultivos de importancia económica.	10
Tabla 2. Fungicidas de uso común en cultivos de importancia económica en México.	12
Tabla 3. Rangos de temperatura, pH y salinidad para los cuales diferentes biosurfactantes muestran efectividad (Somoza et al., 2020).....	18
Tabla 4. Valores de concentración inhibitoria media para biosurfactantes producidos por diferentes microorganismos. SDS: Dodecil sulfato de sodio.	19
Tabla 5. Descripción de la estructura química de algunos tipos de glicolípidos.	21
Tabla 6. Clasificación de biosurfactantes por peso molecular.	24
Tabla 7. Clasificación de biosurfactantes de acuerdo con su origen microbiano. ...	25
Tabla 8. Fuentes de carbono utilizadas en la obtención de diferentes tipos de biosurfactantes.	28
Tabla 9. Ejemplos de aplicaciones y funciones de algunos tipos de biosurfactantes en diversas industrias.	29
Tabla 10. Reportes de actividad antifúngica de diferentes biosurfactantes sobre hongos fitopatógenos diversos.	32
Tabla 11. Prueba cualitativa de la producción de biosurfactantes en agar azul de metileno suplementado con aceite de soya al 2%, por las cepas bacterianas 2, 4, 2214 y 27853.	41
Tabla 12. Rendimiento en la producción de biosurfactantes totales por las cepas bacterianas de interés con diferentes fuentes de carbono.	51
Tabla 13. Porcentaje de inhibición del biosurfactante producido por la cepa 4, en hongos fitopatógenos de los géneros <i>Botrytis</i> spp., <i>Fusarium</i> spp. y <i>Rhizoctonia</i> spp.. T: Testigo.....	54
Tabla 14. Inhibición promedio y desviación estándar de <i>Fusarium</i> y <i>Rhizoctonia</i> con distintas dosis de biosurfactante en dos intervalos distintos. Bt: Testigo (0 g/L); B1: 1 g/L; B1.5: 1.5 g/L; B2: 2 g/L.	55
Tabla 15. Porcentaje de inhibición de diversos hongos fitopatógenos por la acción de diferentes tipos de biosurfactantes.	58

RESUMEN

La agricultura, una actividad económica crucial, se ve amenazada por hongos fitopatógenos como del género *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Botrytis*, que causan pérdidas económicas y alimentarias. Si bien los fungicidas sintéticos son efectivos contra estos hongos, su uso perjudica al suelo, los ecosistemas y la salud de agricultores y comunidades. Para abordar este desafío, la biotecnología propone el empleo de biosurfactantes de origen microbiano, que, además de ser efectivos, presentan un enfoque más respetuoso con el medio ambiente y la salud humana. Los biosurfactantes tienen la capacidad para intercalarse en la membrana del organismo y causar lisis o cambios estructurales que conduzcan a la muerte del hongo. Además, son biodegradables, resisten condiciones extremas y no son tóxicos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antagónica de las cepas bacterianas 2, 4, 2214 y 27853 sobre los hongos fitopatógenos *Fusarium* spp., *Botrytis* spp. y *Rhizoctonia* spp., para determinar su efectividad en el control biológico de enfermedades causadas por estos hongos. Las cepas se cultivaron en agar azul de metileno con aceite de soya (2%), con lo cual se comprobó que las cepas de interés son productoras de biosurfactantes. Realizando una prueba de índice de emulsificación, se seleccionó aquella cepa cuyos biosurfactantes mostraron mayor eficacia en la generación de una emulsión estable. Con este resultado se realizó una producción de biosurfactantes utilizando la cepa 4. Por último, utilizando el concentrado de biosurfactantes totales, en distintas dosis, se realizaron pruebas para estudiar la respuesta de los hongos fitopatógenos de los géneros *Fusarium*, *Botrytis* y *Rhizoctonia* frente a la aplicación de estos compuestos. Como resultado, se obtuvo que la cepa 4 alcanza un índice de emulsificación del 52%, con un rendimiento de 31.6 g/L, lo cual la destaca como una cepa competitiva en cuestión de producción de biosurfactantes. Por otro lado, utilizando 2 g/L de biosurfactante, el crecimiento del hongo *Rhizoctonia* se inhibió en un 61.96%.

1. INTRODUCCIÓN

La agricultura es una actividad económica primaria de gran importancia en cada país. Su desarrollo enfrenta continuas dificultades, entre las que se encuentra la presencia de fitopatógenos, los cuales son organismos que atacan a los cultivos antes, durante y después de la cosecha (SEMINIS, 2015).

De los diversos microorganismos fitopatógenos que atacan a las plantas, como pueden ser los virus, hongos, bacterias y nemátodos, son los hongos el grupo que más enfermedades ocasiona y, por lo tanto, sobre el que más investigación se ha realizado. Se sabe que más de 8,000 especies de hongos pueden causar enfermedades en las plantas (Carreras, 2020). Todas las plantas superiores pueden ser infectadas y dañadas por más de una especie de hongo fitopatógeno, y una especie de hongo fitopatógeno puede atacar a más de una especie de planta (Muñiz, 2014).

Algunos géneros y especies presentan una gran capacidad de adaptación y se encuentran ampliamente distribuidos, mientras que otros presentan características de adaptación más limitadas. La importancia de los hongos fitopatógenos recae en los efectos económicos y en términos de seguridad alimentaria que trae consigo su presencia en cultivos de importancia. Destacan los géneros *Phytophthora*, *Fusarium*, *Phytium*, *Rhizoctonia* y *Botrytis* (Carreras, 2020).

Los tratamientos más comunes para el control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos suelen ser fungicidas sintéticos (Muñiz, 2014). Sin embargo, el uso cotidiano de estos compuestos, que por sus componentes resultan perjudiciales, contribuye a la crisis agrícola que dificulta la preservación de los ecosistemas, de los recursos naturales y, además, afecta la salud de los agricultores, de las comunidades rurales y los consumidores urbanos (Muñiz, 2014).

La aplicación de fungicidas sintéticos, como aquellos con base de bromuro de metilo, y las consecuencias que trae consigo hace necesaria la búsqueda de alternativas de solución al problema de la presencia de hongos fitopatógenos en los cultivos que, además, tengan como base el cuidado de la población, del suelo y del medio ambiente en general.

Mediante el empleo de herramientas biotecnológicas se plantea hacer uso de la aplicación de biosurfactantes, compuestos de origen microbiano y naturaleza anfipática que, por sus propiedades interfaciales, pueden tener un alto potencial como inhibidores del crecimiento de diversos organismos (Serrano *et al.*, 2007). Gracias a su capacidad para reducir la tensión superficial e interfacial, estos compuestos con actividad transmembranal pueden intercalarse y causar lisis o cambios estructurales que conduzcan a la muerte del fitopatógeno (Sarubbo *et al.*, 2022).

Las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* han sido estudiadas en la producción de biosurfactantes para su aplicación en el control biológico de fitopatógenos, arrojando resultados de gran valor (Muñiz, 2014). Los ramnolípidos y las surfactinas, producidas por *P. aeruginosa* y *B. subtilis*, respectivamente, han mostrado gran actividad como inhibidores del crecimiento de fitopatógenos importantes como *Phytophthora infestans* y *Botrytis cinérea* (Serrano *et al.*, 2007), bajo la premisa antes mencionada, que plantea la absorción de las moléculas de biosurfactante a través de la membrana del microorganismo, causando su disolución (Sarubbo *et al.*, 2022).

Los biosurfactantes, además, presentan la ventaja añadida, respecto a los tensoactivos sintéticos y otros agroquímicos, de que son biodegradables, resisten condiciones extremas de pH, salinidad y temperatura, además de no ser tóxicos (Fenibo, 2019). Así, los resultados de diversas investigaciones demuestran la idoneidad de los biosurfactantes para su aplicación en la industria agrícola. Es por lo antes expuesto que en el presente trabajo se pretende evaluar la actividad

antifúngica de biosurfactantes producidos por 4 cepas bacterianas de interés contra hongos fitopatógenos de los géneros *Fusarium*, *Botrytis* y *Rhizoctonia*, por su impacto en cultivos de importancia económica.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Agricultura en México.

La agricultura en México es una actividad económica de gran importancia. México es conocido por su rica diversidad de cultivos agrícolas, con una amplia gama de productos como el maíz, el trigo, café, tomate, chile, aguacate, mango, plátano, cítricos y muchos otros (Cruz, 2021).

De acuerdo con la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, el sector agropecuario representó en el 2018, el 10% del Producto Interno Bruto del país, siendo la actividad económica que genera mayor valor, con un 70% del total del sector primario (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2022)

La producción agrícola de México juega un papel importante también en el comercio agrícola internacional. México es el principal país productor de hortalizas en la región latinoamericana y ocupa la segunda posición en el cultivo de fruta, sólo por detrás de Brasil (Campillo, 2023). En 2022, la inversión extranjera directa, en términos de agricultura, superó los 22 millones de dólares estadounidenses sólo en el primer trimestre (El sector agrícola en México, 2023). Entre las exportaciones agrícolas que más generan ingresos a la economía nacional se encuentra el aguacate, cuyo valor de exportación alcanzó los 1, 600 millones de dólares en el primer trimestre de 2021. En el sector de hortalizas, las exportaciones de tomates fueron las que más ingresos generaron con alrededor de 1000 millones de dólares (Campillo, 2023).

En el caso de las importaciones, el maíz es el tipo de cereal más demandado en México, con un consumo *per capita* de más de 330 mil kilos al año (Campillo, 2023).

Por otro lado, en términos de seguridad alimentaria, la agricultura en México desempeña un papel fundamental. Particularmente, el maíz es un cultivo básico y tradicional en la dieta mexicana (Campillo, 2023). Otros cultivos, como el frijol y el

trigo, son también esenciales para el abastecimiento de alimentos en el país (Cruz, 2021).

2.1.1 Problemas por hongos fitopatógenos en campos agrícolas de México.

La agricultura en México enfrenta diversos desafíos, entre los que se encuentra la presencia de enfermedades, particularmente aquellas causadas por hongos fitopatógenos. Por su capacidad de adaptación y su amplia distribución, los hongos fitopatógenos representan un gran problema para la agricultura (Carreras, 2020). Las enfermedades causadas por hongos del género *Fusarium*, *Botrytis* y *Rhizoctonia*, originan pérdidas que ascienden a miles de millones de dólares al año (Carreras, 2000)

En la Tabla 1 se describen los efectos sintomáticos propios de las enfermedades causadas por hongos de los géneros *Fusarium*, *Botrytis* y *Rhizoctonia*. Resalta que, entre los cultivos afectados por los tres géneros, se encuentran el maíz, el tomate y el frijol que, como se ha mencionado anteriormente, forman parte de los cultivos principales en términos de economía y seguridad alimentaria, en México (Campillo, 2023).

Tabla 1. Hongos fitopatógenos presentes en cultivos de importancia económica.

Hongo fitopatógeno	Cultivo que afecta	Daños causados	Referencia
<i>Botrytis sp.</i>	Uva, fresa, tomate.	Pudrición, necrosis de tejidos.	Bi <i>et al.</i> , 2023
<i>Rhizoctonia sp.</i>	Maíz, frijol, tomate, chile, papa.	Pudrición de raíces, tallo y corona, manchas en los frutos	Yuan <i>et al.</i> , 2020
<i>Fusarium sp.</i>	Chile, tomate, maíz, frijol, plátano, papa.	Marchitez, amarillamiento y/o necrosis de las hojas, pudrición de las raíces, daños en los frutos.	Pegg <i>et al.</i> , 2019

Fuente: elaboración propia.

2.1.2 Uso de fungicidas en el control de hongos fitopatógenos

Los fungicidas químicos son sustancias que matan o previenen el crecimiento de hongos y sus esporas, con el fin de eliminar su presencia de los cultivos, evitando el daño e incluso muerte que pueden llegar a generar a la planta (Farm, 2020).

Las enfermedades causadas por hongos son una ocurrencia común en las plantas y tienen un impacto económico significativo en el rendimiento y la calidad de muchos cultivos, por lo que su manejo es un componente esencial de la producción en el sector agrícola (Farm, 2020). Los fungicidas son utilizados para controlar una enfermedad causada por hongos, durante el establecimiento y desarrollo del cultivo, para aumentar la productividad del cultivo reduciendo las imperfecciones por síntomas, y para mejorar la vida de almacenamiento y calidad de productos cosechados (Farm, 2020). Es por estas razones que el uso de fungicidas toma relevancia en el desarrollo agrícola.

En México, entre los fungicidas empleados en el tratamiento de enfermedades en los cultivos, se encuentran el oxiclورو de cobre, isotiazolin, carbendazim, mancozeb, pentaclorofenol, tiabendazol, benzisotiazolin y clorotalonil (SENASICA, 2023).

2.1.3 Problemática del uso de fungicidas.

Si bien, los fungicidas son efectivos para combatir enfermedades causadas por hongos en cultivos, también es importante tener en cuenta sus posibles efectos en la salud humana. Los fungicidas como el oxiclورو de cobre, isotiazolin, carbendazim, dimetil ditiocarbamato de potasio, pentaclorofenol, tiabendazol, ciproconazol y clorotalonil, de uso en México (SENASICA, 2023), han sido estudiados por sus efectos adversos en la salud humana y ambiental.

La Tabla 2 describe diferentes fungicidas de uso común en campos de cultivo del país y los daños que ocasionan a la salud humana, según diversas fuentes.

Tabla 2. Fungicidas de uso común en cultivos de importancia económica en México.

Fungicida	Cultivos en los que se aplica	Daños a la salud
Clorotalonil	Maíz, frijol, chile, tomate, papa, uva, frutales	Posible carcinógeno, daño renal.
Carbendazim	Arroz, plátano, tomate.	Teratogénico, posible carcinógeno, provoca lesiones en órganos hematopoyéticos, disrupción endócrina.
Pentaclorofenol	Árboles frutales	Afectaciones al sistema nervioso central, riñones, hígado y sistema inmunológico.
Tiabendazol	Arroz, plátano, papa cítricos.	Posible carcinógeno, genotoxicidad, daño hepático
Ciproconazol	Maíz, arroz, trigo, uva, frutales, hortalizas	Falla orgánica, carcinógeno, mutagénico, efectos en la reproducción
Mancozeb	Tomate, papa, uva, cebolla, frutales y hortalizas	Predisposición tumoral, trastornos psiquiátricos, enfermedad de Parkinson, disfunción tiroidea y ovárica.

Fuente: elaboración propia

El uso de plaguicidas, como los fungicidas, no sólo genera daños a la salud humana (Tabla 2), sino que también tiene efecto contaminante en el suelo, agua, biota y sedimentos a través de descargas de sustancias tóxicas a los sistemas lagunares,

vía drenes, riego y lluvia, constituyendo un factor de riesgo de contaminación para los ecosistemas terrestres y marinos (Martínez, 2009).

En el estado de Sinaloa, se determinó el nivel de daño genotóxico en trabajadores agrícolas ocupacionalmente expuestos a plaguicidas, mediante técnicas citogenéticas y genéticas, y se observaron diferencias significativas en el nivel de afectación de la información genética de los grupos expuestos y no expuestos y una correlación entre el tiempo de exposición a los plaguicidas y la frecuencia de daño. Los resultados se vinculan a la exposición de los trabajadores a diferentes compuestos químicos propios de los plaguicidas (Martínez, 2009).

El uso de plaguicidas en la producción agrícola origina residuos en el ambiente donde se aplican. La aspersión aérea de estos compuestos es una fuente frecuente de exposición por parte de las personas dedicadas a las prácticas agrícolas y de las que viven en comunidades vecinas de campos asperjados. Investigaciones desarrolladas en México, muestran los efectos genotóxicos de los plaguicidas sobre los pilotos de aeronaves asperjadoras de mezclas complejas, que ocupacionalmente se exponen a estos productos químicos durante su aplicación en los campos agrícolas de Sinaloa, revelando que el daño evaluado través del ensayo de micronúcleos, correlaciona la exposición a éstos, como el factor principal para los resultados de anomalías nucleares y daños en la información genética (Martínez, 2009).

Por deriva, se entiende el movimiento de las gotas del plaguicida hacia un objetivo distinto al de la aplicación - evento que preocupa por el riesgo de causar daño directo o afectar la salud de animales o personas que llegan a estar en contacto con éstos (Massaro, 2013).

Aunque existe un conjunto de esfuerzos basados en buenas prácticas agrícolas e inocuidad para disminuir el riesgo a la salud por exposición a plaguicidas, continúan utilizándose compuestos químicos altamente peligrosos (Martínez, 2009).

2.2 Biosurfactantes

Los biosurfactantes son compuestos biológicos de naturaleza anfipática producidos por una gran diversidad de microorganismos (Anton, 2005). La Figura 1 muestra la estructura del monómero de un biosurfactante. Los restos no polares suelen ser cadenas hidrocarbonadas, mientras que los restos polares suelen ser moléculas catiónicas, aniónicas, no iónicas o anfóteras. Esta combinación de moléculas hidrófobas e hidrofílicas permiten que los biosurfactantes reduzcan la tensión superficial e interfacial y formen microemulsiones (Sarubbo *et al.*, 2022).

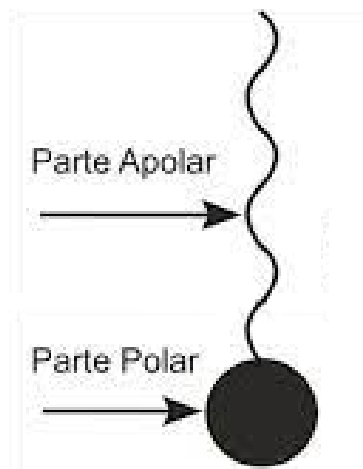


Figura 1. Monómero de un biosurfactante.

2.2.1 Propiedades de los biosurfactantes

- Actividad superficial e interfacial

La dualidad polar-apolar de los biosurfactantes supone la ubicación de estas moléculas en la superficie o interfase de un sistema, de tal forma que su grupo polar se encuentre rodeado de agua y su grupo apolar fuera de la misma (Martínez, 2011). Así se observa en la Figura 2, que muestra el acomodo de las moléculas biosurfactantes según la afinidad de sus componentes polares o apolares.

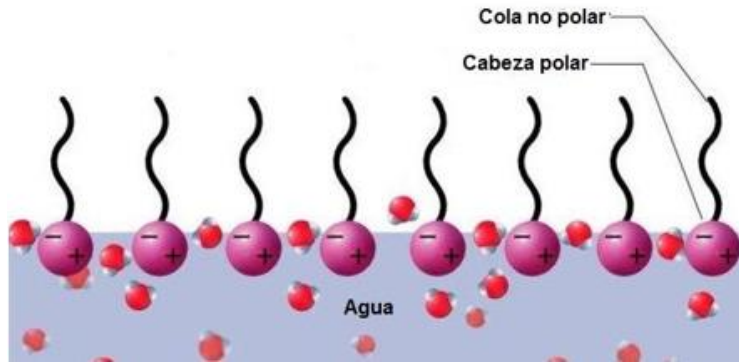


Figura 2. Arreglo de moléculas biosurfactantes en la interfase de una mezcla heterogénea.

La migración de las moléculas de los biosurfactantes en la superficie se conoce como adsorción. La adsorción puede deberse a efectos del grupo hidrófobo y a otros fenómenos fisicoquímicos. Por otro lado, la penetración de dichas moléculas hacia el seno de la fase dispersa es conocida como absorción (Plaza *et al.*, 2006).

La organización de los monómeros de biosurfactante puede ocurrir en forma de monocapa, como se ilustra en la Figura 2, o en forma de micelas, las cuales son agregados más o menos esféricos en cuyas estructuras, los extremos apolares de las moléculas de biosurfactante se anidan en repelencia al agua, dejando en la superficie exterior a los extremos polares en contacto con el medio acuoso (Figura 3) (Martínez, 2011).

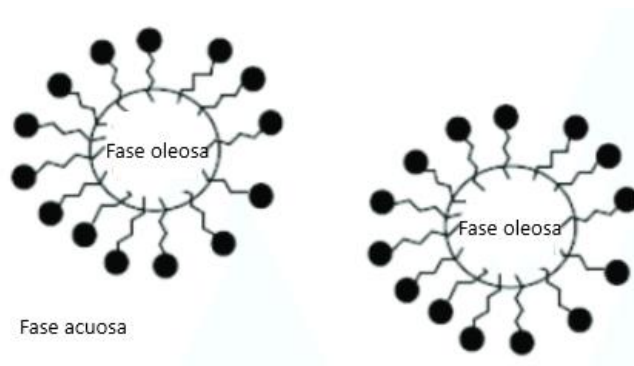


Figura 3. Estructura de una micela.

Esta propiedad les confiere a los biosurfactantes la capacidad de disminuir la tensión superficial y/o interfacial mediante el rompimiento de las interfaces de agua/aire y agua/aceite (Jimoh *et al.*, 2019). Además, los biosurfactantes funcionan como agentes espumantes y solubilizadores, gracias a su capacidad para reducir la viscosidad, logrando así una mayor movilidad y transporte de compuestos insolubles (Santos, 2017).

Se han reportado diversos biosurfactantes en la disminución de la tensión superficial en un medio acuoso, desde los 72 mNm⁻¹ hasta <30 mNm⁻¹. Estos valores dependen del compuesto que se encuentre mezclado en el medio. Un ejemplo de esto es el glicolípido H12A, que en un medio con hexano disminuyó la tensión superficial hasta 0.57 mNm⁻¹, y en un medio con decano, logró disminuir la tensión superficial hasta 0.02 mNm⁻¹ (Brown, 1991).

La manera más efectiva de caracterizar un biosurfactante es midiendo la fuerza de atracción entre las moléculas de los líquidos que componen una mezcla heterogénea, clasificando así el biosurfactante según su capacidad de afectar la tensión superficial o interfacial del mismo líquido. En este sentido, la concentración micelar crítica (CMC) se define como la concentración mínima de biosurfactante requerida para reducir al máximo la tensión superficial (Figura 4) (Sarubbo *et al.*, 2022).

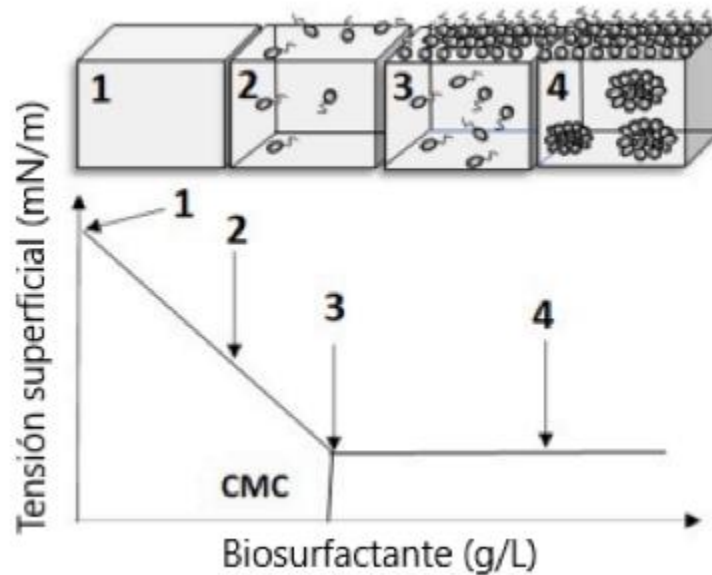


Figura 4. Pasos en la reducción de la tensión superficial debido a la adición de biosurfactantes hasta alcanzar la concentración micelar crítica y la formación de micelas.

La CMC es mucho menor en biosurfactantes que en los surfactantes sintéticos. Se han reportado valores de 0.0025% (p/v) para surfactina y 0.001% para ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa*. En el caso de la surfactina, se ha comparado su actividad interfacial con la del surfactante sintético lauril sulfato de sodio, obteniendo como resultado una tensión superficial de 27.9 mNm^{-1} para una solución de surfactina 0.005%, mientras que para el lauril sulfato de sodio se obtuvo una tensión de 56.5 mNm^{-1} con la misma concentración (Brown, 1991).

- Formación y ruptura de emulsiones

Los biosurfactantes pueden actuar como formadores de emulsiones, dispersando una fase en otra en forma de microgotas, manteniendo también la estabilidad de las emulsiones formadas (Roy, 2017). Es posible también lograr el proceso inverso, en el cual se rompe la estabilidad de dichas microgotas y, por lo tanto, se rompe la emulsión (Santos, 2017).

- Tolerancia de temperatura, pH y salinidad

Distintos parámetros ambientales, como la temperatura, el pH y la salinidad han mostrado tener poca o nula influencia tras ser probados con la mayor parte de los biosurfactantes conocidos (Fenibo *et al.*, 2019). Diversos estudios respaldan la estabilidad y la productividad de dichos biosurfactantes aún en condiciones extremas de estos parámetros (Mnif *et al.*, 2016). La Tabla 3 muestra algunos datos sobre los valores de temperatura, pH y salinidad a los que diferentes cepas microbianas tienen la capacidad de producir biosurfactantes de forma estable.

Tabla 3. Rangos de temperatura, pH y salinidad para los cuales diferentes biosurfactantes muestran efectividad (Somoza *et al.*, 2020).

Parámetro	Rango de eficacia / Cepa bacteriana		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptomyces sp</i>	<i>Candida sphaerica</i>
Temperatura (°C)	-20 - 120	30 - 100	30 - 100
pH	2-12	3-7	2-12
Salinidad (%)	0-20	3	2-10

- Agentes adherentes/antiadherentes.

En el establecimiento de una biopelícula, un factor importante de adherencia a la superficie por parte de los microorganismos es la hidrofobicidad de dicha superficie. Los biosurfactantes pueden emplearse como mediadores en esta etapa, al modificar la hidrofobicidad e influenciar la adhesión de ciertos microorganismos (Roy, 2017).

- Baja toxicidad.

Aludiendo a su origen natural, los biosurfactantes han sido estudiados en comparación con surfactantes sintéticos ampliamente utilizados en la industria, lo que ha permitido discernir las grandes ventajas ecológicas y médicas que implicarían el uso de estos compuestos (Rahman *et al.*, 2008).

Las especies *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Sphingobacterium detergens*, son parte de las cepas bacterianas productoras de biosurfactantes que han sido investigadas en contraposición a los surfactantes químicos, demostrando una menor citotoxicidad y menor perjuicio a órganos como pulmones, corazón, estómago e hígado, así como menores reacciones alérgicas, con respecto a sus antagonistas (Mnif *et al.*, 2016). De acuerdo con diversas investigaciones, los biosurfactantes en general demuestran nulidad de toxicidad, son pocos los que muestran un nivel escaso, sin embargo, la mayoría son aprobados para su desarrollo incluso en industrias relacionadas con la salud (Fenibo *et al.*, 2019). Así lo muestra la Tabla 4, para la cual la concentración inhibitoria media (IC50), que indica la concentración mínima a la cual una sustancia puede inhibir una función biológica resulta ser mucho menor para el caso del dodecilsulfato sódico (SDS) en comparación con los biosurfactantes (Mnif *et al.*, 2016).

Tabla 4. Valores de concentración inhibitoria media para biosurfactantes producidos por diferentes microorganismos. SDS: Dodecil sulfato de sodio.

IC50	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (µg/mL)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (µg/mL)	<i>Sphingobacterium detergens</i> (µg/mL)	SDS (µg/mL)
Fibroblastos	117.4	57	700	46.3
Queratinocitos	70	80	1041.6	31.4

Fuente: elaboración propia

Otros estudios han probado la interacción entre los biosurfactantes y organismos vegetales, tal es el caso de *Brassica oleracea*, *Chicoria intybus*, *Lactuca sativa* y

Solanum gilo, que han sido tratadas con biosurfactante producido por *C. sphaerica* como bioindicador, no demostrando toxicidad (Mnif *et al.*, 2016).

- Biodegradabilidad

A diferencia de los surfactantes sintéticos, los biosurfactantes tienen una gran capacidad de degradación. Reportes del compuesto tensoactivo producido por *Candida antarctica* han mostrado mayor eficiencia en su degradación, en comparación con, por ejemplo, alquilbencensulfonato (SCT) y dodecilsulfato sódico (SDS) (Mnif *et al.*, 2016). Además, los biosurfactantes han mostrado esta capacidad degradativa tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Mnif *et al.*, 2016).

2.2.2 Clasificación de los biosurfactantes

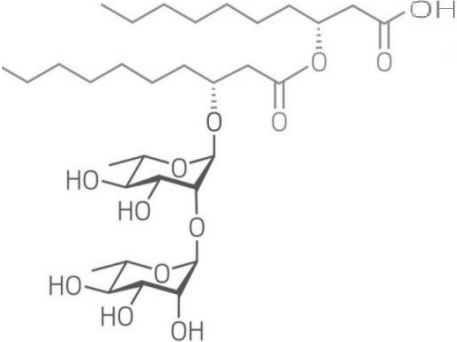
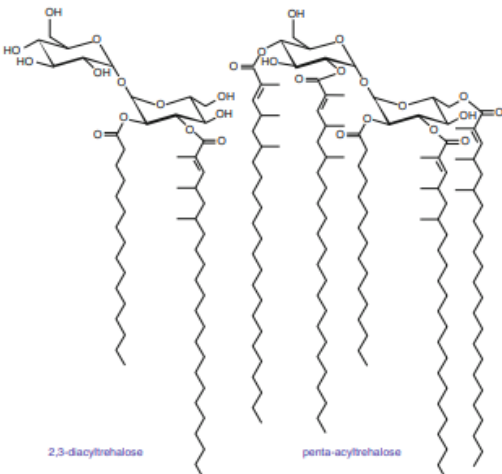
Los biosurfactantes pueden clasificarse con base en su peso molecular, composición química o tipo de microorganismo que lo produzca (Anton, 2005).

a) Clasificación por composición química

- Glicolípidos

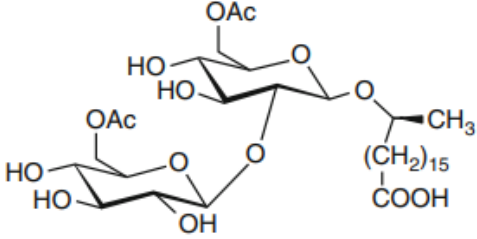
Están constituidos por carbohidratos, generalmente mono y oligosacáridos conteniendo glucosa, galactosa, xilosa o ramnosa, unidos a cadenas de ácidos grasos saturadas e insaturadas e hidroxilos, además de un grupo éter o éster. Los ramnolípidos, trehalolípidos y soforolípidos son ejemplos de glicolípidos (Tabla 5) (Sharma, 2016).

Tabla 5. Descripción de la estructura química de algunos tipos de glicolípidos.

Biosurfactantes glicolípidicos	Descripción	Estructura química
Ramnolípidos	<p>Carbohidratos de ramnosa asociados a ácidos β-hidroxidecanóicos. El enlace glucosídico se establece entre el grupo OH de los ácidos grasos (hidroxidecanóicos) y la ramnosa, así como con el grupo OH libre de otro ácido hidroxidecanóico.</p>	
Trehalolípidos	<p>Lípidos asociados a trehalosa, un tipo de azúcar no reductor, compuesto por dos unidades monoméricas de glucosa conectadas por un enlace α, α-1, 1-glucosídico.</p>	

Ramnolípidos. *Tomada de: Chemical and Engineering News*

Lípido de trehalosa. *Tomada de: Springer International Publishing Switzerland*

Soforolípidos	Molécula de sofrosa unida covalentemente a una cadena larga de ácidos grasos hidroxilos.	
---------------	--	--

Soforolípido. Tomada de: Springer International Publishing Switzerland

Nota: Esta tabla presenta tres ejemplos de biosurfactantes de naturaleza glicolípídica. Pueden observarse sus estructuras químicas esquematizadas (Sharma, 2016).

Estos compuestos, ramnolípidos, trehalolípidos y soforolípidos han mostrado gran capacidad y eficacia como agentes reductores de tensión superficial e interfacial (Sharma, 2016).

- Lipopéptidos y lipoproteínas

Consisten comúnmente en una gran cantidad de péptidos cíclicos unidos a ácidos grasos (Sharma, 2016). Los lipopéptidos exhiben diversas actividades biológicas tales como actividad superficial, y anti-enzimática (Maycelly, 2014); así pues, tienen la capacidad de disminuir la tensión superficial, además exhiben efectos antibióticos significativos (Sharma, 2016), por lo que han mostrado ser de gran utilidad en la industria petrolera, química y farmacéutica, entre otras (Maycelly, 2014).

El biosurfactante más importante de este tipo es la surfactina (Figura 5), producida principalmente por *Bacillus subtilis* (Sharma, 2016).

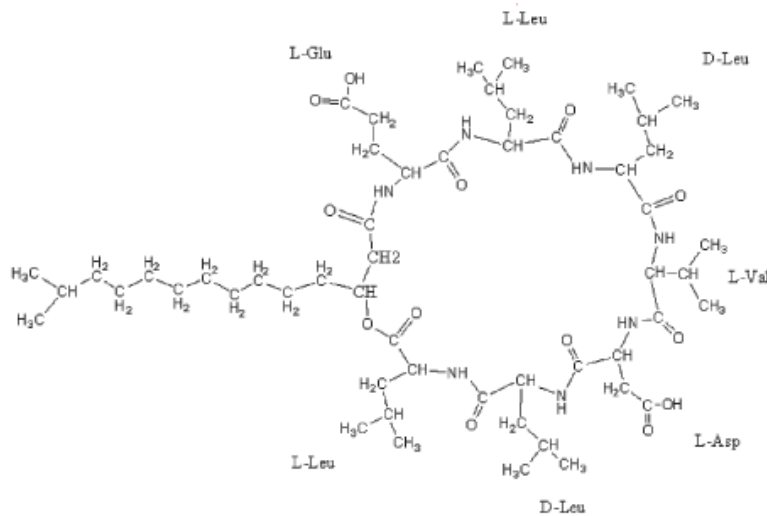


Figura 5. Estructura química de la surfactina.

- Ácidos grasos, fosfolípidos y lípidos neutrales

Diversos microorganismos bacterianos, hongos y levaduras, son capaces de crecer en medios hidrofóbicos. Esto origina que en el procesamiento de nutrientes produzcan gran cantidad de ácidos grasos, fosfolípidos y lípidos neutros (Sharma, 2016).

- Biosurfactantes poliméricos

Los biosurfactantes poliméricos están constituidos de una forma diversa. Los más estudiados son el liposan, el emulsan y las manoproteínas. De estas últimas se han derivado otros tensoactivos como el biodispersan y el alasan, con gran capacidad emulsificante (Sharma, 2016).

b) Clasificación por peso molecular

Los biosurfactantes poseen dos dominios, uno hidrofílico y otro hidrofóbico. Moléculas como péptidos cíclicos, mono o polisacáridos y fosfatos pueden conformar el dominio hidrofílico del compuesto, mientras que sus dominios

hidrofóbicos constan de cadenas de ácidos grasos largas o cortas, o derivados de estos (Panijiar, 2017).

- Biosurfactantes de bajo peso molecular

Son generalmente glicolípidos, lipopéptidos y fosfolípidos (Panijiar, 2017). Estos compuestos afectan las interacciones interfaciales dadas entre sustancias acuosas y aceites (Shah, 2016), disminuyendo la tensión superficial e interfacial. Dentro de esta clasificación se encuentran los ramnolípidos, trehalolípidos y soforolípidos, que son glicolípidos, disacáridos acilados con ácidos grasos de cadena larga y ácidos grasos hidroxilos (Shah, 2016). En la Tabla 6 se muestran algunos ejemplos de biosurfactantes de bajo peso molecular.

- Biosurfactantes de alto peso molecular

Son compuestos extracelulares, como los lipopolisacáridos, proteínas, lipoproteínas, polisacáridos o sus mezclas. Si bien, este tipo de biosurfactantes no pueden disminuir eficazmente la tensión superficial, tienen gran capacidad emulsificante (Maycelly, 2014). La Tabla 6 exhibe algunos ejemplos.

Tabla 6. Clasificación de biosurfactantes por peso molecular.

Origen microbiano	Biosurfactante	Referencia
Alto peso molecular		
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Alasan	Mujumdar <i>et al.</i> (2019)
<i>Candida lipolytica</i>	Liposan	Diniz <i>et al.</i> (2014)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Biodispersan	Ron y Rosenberg (2001)
<i>Pseudomonas putida</i>	Polisacárido extracelular	Bonilla <i>et al.</i> (2005)

Bajo peso molecular		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ramrólpidos	Monteiro <i>et al.</i> (2007)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter sp</i> , <i>Mycobacterium sp</i>	Lípidos de trehalosa	Martínez (2011)
<i>Candida bombicola</i>	Soforólpidos	Van Bogaert <i>et al.</i> (2011)
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	Lípidos de glucosa	Acuña (2019)
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactina	Pagadoy <i>et al.</i> (2005)

Nota: En esta tabla es posible observar diferentes tipos de biosurfactantes estipulados según su peso molecular, así como el o los microorganismos que lo producen (Maycelly, 2014).

c) Clasificación por origen microbiano

Los biosurfactantes producidos por una gran diversidad de microorganismos difieren en estructura y características químicas. En la Tabla 7 se detalla la clasificación de los biosurfactantes en función de su microorganismo de origen (Panijjar, 2017).

Tabla 7. Clasificación de biosurfactantes de acuerdo con su origen microbiano.

Origen microbiano	Tipo de biosurfactante	Referencia
Bacterias		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ramrólpidos	Jadhav <i>et al.</i> (2011)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Trehalólpidos	Muthusamy <i>et al.</i> , (2008)
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactina	Cao <i>et al.</i> (2009)
<i>Bacillus subtilis</i>	Iturina	Deng <i>et al.</i> (2016)

<i>Bacillus subtilis</i>	Fengicina	Sun <i>et al.</i> (2019)
<i>Bacillus subtilis</i>	Liquenisina	Joshi <i>et al.</i> (2016)
<i>Bacillus licheniformis</i>		Joshi <i>et al.</i> (2016)
<i>Serratia marcescens</i>	Serrawetina	Lai <i>et al.</i> (2009)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Viscosina	Banat <i>et al.</i> (2010)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Lípidos poliólicos	Amaral <i>et al.</i> (2009)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Emulsan	Ron and Rosenberg (2001)
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Alasan	Adetunji y Olaniran (2021)
Hongos		
<i>Candida batistae</i>	Soforolípidos	Morita <i>et al.</i> (2008)
<i>Trichosporon asaii</i>		Chandran y Das (2010)
<i>Candida antárctica</i>	Manosileritritol	Felse <i>et al.</i> (2007)
<i>Myroides sp.</i>	Ácidos biliares	Saimmai <i>et al.</i> (2012)

Nota: Esta tabla presenta la relación entre algunos biosurfactantes y sus microorganismos productores. Fuente: elaboración propia.

Los biosurfactantes también pueden clasificarse de una forma más general de acuerdo con su carga iónica. En este caso, los biosurfactantes aniónicos son aquellos que contienen moléculas cargadas negativamente, con grupos como carboxilatos, sulfonatos y fosfatos, combinadas con cadenas hidrocarbonadas hidrófobas. Cuando estas cadenas son cortas, estos biosurfactantes son hidrosolubles y actúan en sistemas no acuosos (Maycelly, 2014).

Por otro lado, están los biosurfactantes catiónicos, cuyas moléculas se encuentran cargadas positivamente y asociadas a amonios (Maycelly, 2014).

Los biosurfactantes también pueden ser iónicos o no iónicos. El primer caso define a los agentes surfactantes que se ionizan al encontrarse en solución; El grupo hidrófobo se carga positivamente, lo cual está vinculado a propiedades como humectación, emulsificación y formación de espuma. En el segundo caso, los biosurfactantes son neutros, con grupos alcoholes, azúcares o ácidos carboxílicos; No se disocian en iones hidratados en medio acuoso (Maycelly, 2014).

Por último, los biosurfactantes zwitteriónicos. Estos están conformados por moléculas que pueden contener cargas positivas y negativas. Estos agentes pueden tener cierta sensibilidad a pH, comportándose como sustancias aniónicas a pHs alcalinos, y como sustancias catiónicas a pH ácidos (Maycelly, 2014).

2.2.3 Biosíntesis de biosurfactantes bacterianos

Los biosurfactantes son producidos por una variedad de microorganismos, secretados extracelularmente o unidos a la célula, predominantemente durante su crecimiento en fase acuosa y sustratos inmiscibles (Lamilla, 2018).

Aunque la función de los biosurfactantes en células microbianas no está completamente entendida, se ha especulado sobre su participación en la emulsión de sustratos inmiscibles en agua (Lamilla, 2018). Estos compuestos también han demostrado estar involucrados en la adhesión celular, que imparte gran estabilidad bajo condiciones ambientales hostiles, en la desorción de la célula para encontrar nuevos hábitats de supervivencia (Lamilla, 2018).

a) Mecanismos y factores que regulan la producción de biosurfactantes

En la regulación de la producción de los biosurfactantes, operan principalmente tres mecanismos: inducción y/o represión de la fuente de carbono, cantidad de nitrógeno y la presencia de iones polivalentes en los cultivos. Además de parámetros químicos y físicos tales como la temperatura, pH, salinidad, agitación y oxígeno disponible.

Todos estos parámetros interfieren en la cantidad y tipo de biosurfactante producido. Destaca la fuente de carbono como uno de los principales factores estudiados en la producción de biosurfactantes (Rahman, 2008).

- Fuente de carbono

Uno de los factores más importantes en la producción del biosurfactante es la fuente de carbono, por inducción o represión. En algunos casos, la adición de sustratos inmiscibles en agua promueve la producción de biosurfactante (Shah, 2016). Así se ha descrito en diversos experimentos, donde la adición de ácidos grasos de cadena larga, hidrocarburos o glicéridos en medio de cultivo con *Rhodococcus erythropolis*, por ejemplo, indujo la síntesis de soforolípidos por dicha bacteria (Singh, 2018).

Como se observa en la Tabla 8, la glucosa, la sacarosa, el glicerol y algunos aceites han sido estudiados como fuentes de carbono importantes en la producción de biosurfactantes (Rahman, 2008).

Tabla 8. Fuentes de carbono utilizadas en la obtención de diferentes tipos de biosurfactantes.

Biosurfactante	Microorganismo	Fuente de carbono
Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aceite de soya, aceite de maíz, n-parafina, glucosa, glicerol
Trehalolípidos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	n-decano, n-hexadecano
Soforolípidos	<i>Bacillus subtilis</i>	Suero de leche, glucosa, esterres, aceite de canola, aceite de girasol
Manosil eritritol	<i>Candida antarctica</i>	Aceite de soya, glicerol, ácido oleico

Fuente: elaboración propia.

2.2.4 Aplicaciones de los biosurfactantes

El interés por los surfactantes de origen microbiano ha aumentado de manera constante en los últimos años, debido a su facilidad de obtención y su diversidad estructural, lo que amplía las posibilidades de diferentes aplicaciones, dado que, los surfactantes de origen biológico tienen varias ventajas sobre sus contrapartes sintéticas, ya que son biodegradables y no se acumulan en el ambiente, tienen bajo nivel de toxicidad y lo más importante es que presentan propiedades físicas y químicas (temperatura, capacidad emulsificante, tolerancia al pH y fuerza iónica) superiores a las de los surfactantes sintéticos (Shah, 2016). Sin embargo, hacen falta estudios para encontrar procesos eficientes de obtención para que puedan ser económicamente competitivos respecto a los surfactantes químicos de bajo costo (Shah, 2016). En la Tabla 9 se describen, a grandes rasgos, las aplicaciones y funciones de diferentes biosurfactantes a lo largo de diversas industrias.

Tabla 9. Ejemplos de aplicaciones y funciones de algunos tipos de biosurfactantes en diversas industrias.

Biosurfactante	Industria	Aplicación	Función
Ramnolípidos	Petrolera	Mejorar la recuperación de emulsiones generadas	Recuperación de petróleo y liberación de crudo atrapado en los capilares de las rocas
	Medio ambiental	Biorremediación de suelos contaminados por metales e hidrocarburos	Movilización de tóxicos adsorbidos a las partículas del suelo mediante biodegradación y emulsificación de

			estos
	Agrícola	Control biológico	Acción de pesticidas y herbicidas
Surfactina	Farmacéutica	Agentes terapéuticos	Antimicrobianos, antivirales y antifúngicos
	Petrolera	Tratamiento de aguas residuales y derrames de crudo	Biodegradación y emulsificación de contaminantes del suelo
Soforolípidos	Alimentaria	Ingrediente con formulaciones	Emulsificación y consistencia en alimentos preparados
	Farmacéutica	Productos de salud y belleza	Emulsionantes, espumantes, formación de vesículas, agentes humectantes
Lunasan	Cosmética	Agente antiadhesivo	Inhibición de la formación de biofilms en superficies
Succinóil-Trehalosa	Farmacéutica	Agentes terapéuticos	Antimicrobianos, antivirales,

			antifúngicos, inmunomoduladores
Heteropolisacáridos	Otras	Pintura, papel, textil, cerámica, detergentes, minería	Agente humectante, espesantes, entre otros

Fuente: elaboración propia.

2.2.5 Biosurfactantes en control biológico de hongos fitopatógenos

Los biosurfactantes constituyen una herramienta muy eficaz contra una amplia variedad de fitopatógenos. Así, los organismos microbianos productores de estos biotensoactivos se posicionan como alternativas ante los compuestos sintéticos para su aplicación en la industria agrícola (Singh, 2018).

- Surfactinas

Las surfactinas, generalmente producidas por bacterias del género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. spizizenii*), logran disminuir la tensión superficial y actúan como excelentes detergentes y emulsionantes. Estas propiedades las capacita para actuar como fuertes desestabilizantes de membranas biológicas, como las que podrían constituir a diversos organismos fitopatógenos (Krishnan *et al.*, 2019).

- Ramnolípidos

Diversos estudios han demostrado la actividad antimicrobiana de los ramnolípidos. Como antifúngicos, los ramnolípidos han sido probados contra especies devastadoras de plantas, como *Botrytis* spp., *Rhizoctonia* spp., *Phytium* spp., *Phytophthora* spp. y *Plasmopara* spp., además de *Mucor miehei* y *Neurospora crassa* (Malakar & Deka, 2021).

Los ramnolípidos han demostrado ser eficientes en sistemas vegetales *in vivo*. Tal es el caso de la planta de pimienta, tratada con estos biotensoactivos contra la enfermedad causada por el hongo *Phytophthora capsici*, así como la prevención ante la infección por *Colletotrichum orbiculare* en la planta de pepino (Adetunji *et al.*, 2022).

Otros estudios también han encontrado que las mezclas de estos biosurfactantes con otros compuestos como adyuvantes, por ejemplo, la siringomicina, es eficiente contra agentes patogénicos y oportunistas (Nalini *et al.*, 2023).

La Tabla 10 describe las propiedades antifúngicas de diferentes tipos de biosurfactantes.

Tabla 10. Reportes de actividad antifúngica de diferentes biosurfactantes sobre hongos fitopatógenos diversos.

Origen y tipo de biosurfactante	Hongo fitopatógeno que controla	Inhibición (%)	Referencia
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (lipopéptido)	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i>	>95%	Fernandes <i>et al.</i> (2020)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ramnolípidos)	<i>Fusarium verticillioides</i>	>90%	Borah <i>et al.</i> , (2016)
<i>Bacillus subtilis</i> (lipopéptido)	<i>Fusarium solani</i>	Hasta 78% <i>in vivo</i>	Mnif <i>et al.</i> (2015)
<i>Bacillus subtilis</i> (iturinas, fengicinas y surfactinas)	<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>	Dato cualitativo	Kim <i>et al.</i> (2010)

<i>Pseudomonas fluorescens</i> (ramnolípidos)	<i>Phytophthora infestans</i>	60% <i>in vitro</i>	Martínez <i>et al.</i> (2007)
--	-------------------------------	---------------------	----------------------------------

Fuente: elaboración propia.

La principal forma de acción de los biosurfactantes contra fitopatógenos formadores de zoosporas es la lisis directa de dichas zoosporas a través de su intercalamiento en la membrana plasmática (Nalini *et al.*, 2023). Otros estudios han mostrado que los biosurfactantes también tienen la capacidad de reducir el crecimiento del micelio de hongos como *Phytophthora myriophyllum* y *Botrytis cinerea*. Así se sabe que los efectos adversos de los biosurfactantes sobre organismos fitopatógenos persisten aún en aquellos protegidos por una pared celular (Nalini *et al.*, 2023).

3. JUSTIFICACIÓN

La agricultura es una de las actividades económicas con mayor relevancia en México. Es el sector productivo más importante desde el punto de vista económico, social y ambiental. La agricultura es la base importante para el desarrollo del país, funcionando como una herramienta que ayuda a fomentar la seguridad alimentaria (En México existen cerca de 200 productos agrícolas que son cultivados dentro del país, entre los que destacan, por su importancia en el consumo y la generación de divisas, el maíz, frijol, sorgo, caña de azúcar, tomate y chile (Shah, 2016).

Un problema importante que enfrentan los campos mexicanos es la presencia de hongos de los géneros *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Botrytis*, que figuran entre los fitopatógenos más notables por su concurrencia en los cultivos de chile, frijol y tomate (Serrano, 2017). El manejo de dichas plagas suele efectuarse con la aplicación de fungicidas con base, por ejemplo, de azoxistrobin, carbendazim, clorotalonil y/o sulfato de cobre pentahidratado, compuestos considerados citotóxicos, de efectos aún desconocidos, en su mayoría, y altamente recalcitrantes

(Muñiz, 2014). Así, el uso intensivo de agrotóxicos de este tipo genera una alta vulnerabilidad socioambiental y dispone una crisis agrícola cuyos estragos comienzan a ser tangibles (Carreras, 2020). Por esta razón, el presente trabajo se centra en la aplicación innovadora de biosurfactantes, los cuales son moléculas anfipáticas producidas por diversos microorganismos, que, por sus diversas propiedades, pero sobre todo por su capacidad para disminuir la tensión superficial, podrían intercalarse en la membrana de los hongos fitopatógenos aun en sus distintas etapas de desarrollo, causando daños importantes en las moléculas que la componen, hasta su disolución (SEMINIS, 2020). Con el aprovechamiento de las propiedades de los biosurfactantes, es posible innovar en el control biológico de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, como lo son *Fusarium*, *Botrytis* y *Rhizoctonia*, ofreciendo una alternativa que provea beneficios en diferentes niveles: control biológico, salud humana y vitalidad del suelo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

Evaluar la eficacia de los biosurfactantes bacterianos en el control biológico de enfermedades fúngicas de relevancia agrícola, a través de pruebas de actividad antagonica frente a hongos fitopatógenos.

4.2 Objetivos Específicos:

- Caracterizar la producción de biosurfactantes por las cepas bacterianas 2214, 2 y 4 en cinéticas en medio líquido, mediante la determinación del índice de emulsificación.
- Comparar la actividad antagonica *in vitro* de biosurfactantes bacterianos frente a hongos fitopatógenos de los géneros *Fusarium*, *Botrytis* y *Rhizoctonia*.

5. HIPÓTESIS

Los biosurfactantes generados por una cepa bacteriana que exhibe un rendimiento competitivo y un alto índice de emulsificación, se plantea que tienen la capacidad de suprimir el desarrollo de hongos fitopatógenos pertenecientes a los géneros *Fusarium* spp., *Botrytis* spp. y *Rhizoctonia* spp.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Origen de las cepas bacterianas productoras de biosurfactantes

Las cepas bacterianas 2 y 4 fueron aisladas del efluente de un biorreactor de procesamiento de residuos agrícolas. Las cepas 2214 y ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, fueron obtenidas comercialmente por el Dr. Arnoldo Wong Villarreal de la Universidad Tecnológica de la Selva, y el Dr. Gustavo Yáñez Ocampo, de la Universidad Autónoma del Estado de México, respectivamente.

6.2 Reactivación del cepario

Las cepas bacterianas 2, 4, 2214 y 27853 fueron cultivadas en agar nutritivo y posteriormente incubadas a una temperatura de 30 °C. Después de un periodo de incubación de 3 días, se pudo apreciar un significativo crecimiento microbiano.

6.3 Confirmación de producción de biosurfactantes

Las cepas bacterianas 2, 4, 2214 y 27853 se cultivaron en agar azul de metileno suplementado con aceite de soya al 2%. El calcio y el azul de metileno en la composición de este agar forman parte de una reacción aniónica con el biosurfactante, producto de la cual se forma blanco de metilo, que es posible observar como un anillo blanco alrededor de las colonias bacterianas productoras de biosurfactantes. Los cultivos se incubaron a 30 °C durante 4 días. Se observó crecimiento microbiano y se confirmó la producción de biosurfactantes por las cuatro cepas bacterianas.

6.4 Cinéticas de crecimiento y producción de biosurfactantes

Se preparó medio líquido peptona de caseína y levadura (PY) en matraces de 25 mL, previamente tratados con HCl 2.5 M, para la generación del inóculo. Se cultivaron las cepas 2, 4, 2214 y 27853, inoculando al 1% y se incubaron a 30 °C por 12 horas. Posteriormente, por cada cepa, se colectaron 10 mL del cultivo y se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 10 mL de solución salina estéril (0.8%), para centrifugar nuevamente. Este paso se repitió. Finalmente, se tomaron 2.5 mL de esta solución y se midió la densidad óptica a 600 nm. Mediante diluciones, se ajustó la concentración de biomasa de las cuatro cepas a 0.2 UA. Esto se llamó inóculo.

Las cepas bacterianas 2, 4, 2214 y 27853 se cultivaron en medio de sales minerales suplementado con aceite de soya al 2% (Figura 6), utilizando el inóculo.

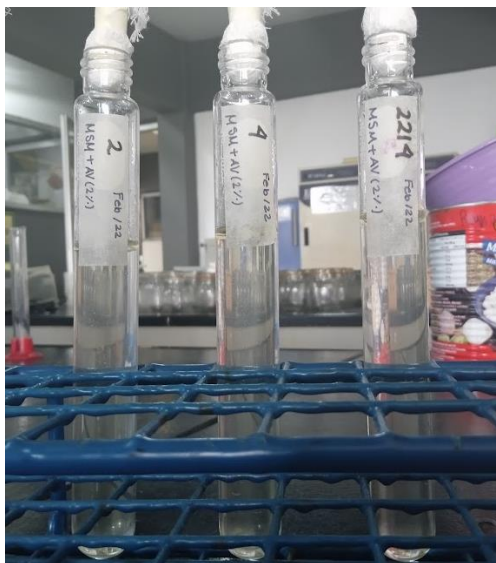


Figura 6. Cultivos de las diferentes cepas estudiadas durante la cinética microbiana.

Los cultivos se incubaron a 30 °C durante 15 días, monitoreando los parámetros Densidad óptica de la biomasa e Índice de emulsificación en los días 0, 2, 4, 8 y 16, como se describe:

a) Densidad óptica de la biomasa

Por cada cepa, se colectaron 2.5 mL del cultivo y se midió la absorbancia de la biomasa por densidad óptica a 600 nm.

b) Índice de Emulsificación 24 h (IE24).

Por cada cepa, se colectaron 2 mL del cultivo y se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante libre de células (SLC) se depositó en un tubo de ensayo previamente tratado con HCl 2.5 M, con 2 mL de aceite de soya. Así, cada tubo contenía el 50% de SLC y el 50% de aceite de soya como fuente hidrofóbica. Los tubos se agitaron en vórtex durante 1 minuto y se permitieron reposar durante 24 h. Posteriormente, se midió la altura de la emulsión generada, y se desarrolló el cálculo según la fórmula:

$$IE24 = \frac{HE}{HT} \times 100$$

Donde:

IE24: Índice/Porcentaje de emulsión a las 24 horas.

HE: Altura de la emulsión

HT: Altura total de la solución

Se utilizaron dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.2% y agua destilada como controles positivo y negativo, respectivamente.

Para esta parte experimental, se realizaron 3 repeticiones experimentales, con 2 réplicas.

6.5 Producción de biosurfactantes totales por precipitación ácida.

Siguiendo los pasos del procedimiento anterior para generar el inóculo, se cultivaron las cepas 2, 4, 2214 y 27853 en medio de sales minerales suplementado con aceite de soya y con glicerol al 2%, como fuentes de carbono, por separado, en matraces de 500 mL previamente tratados con HCl 2.5 M (Figura 7).

Los cultivos se incubaron a 30 °C durante 20 días. Posteriormente, se centrifugó la totalidad del cultivo, por cada cepa, a 2500 rpm durante 25 minutos (Figura 7). El SLC de cada cultivo se acidificó a pH 2 utilizando HCl [6 M] y se permitió reposar durante 12 h a 4 °C. El SLC se ajustó a pH 7 empleando NaOH [6 M]. Finalmente, el SLC se evaporó en estufa a 105 °C durante 5 días, con lo cual, se obtuvieron muestras semi-sólidas conteniendo al biosurfactante (Figura 7).



Figura 7. Cultivos bacterianos para la producción de biosurfactantes (izquierda); Sobrenadante libre de células (medio); Concentrado final de biosurfactantes totales (derecha).

Siguiendo el procedimiento anterior y con base en observaciones de rendimiento con cada fuente de carbono y cada cepa, se realizó una nueva producción de biosurfactantes utilizando la cepa 4, con la finalidad de obtener muestra suficiente para el desarrollo de las pruebas de actividad antagónica.

*6.6 Pruebas de actividad antagónica contra los hongos fitopatógenos *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Botrytis*.*

Con base en los resultados de rendimiento de la producción de biosurfactantes, se preparó agar papa dextrosa suplementado con el biosurfactante producido por la cepa 4 considerando las dosis: 0 g/L (testigo), 1 g/L, 1.5 g/L y 2 g/L. Los medios de cultivo suplementados se inocularon con los hongos fitopatógenos de los géneros *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. y *Botrytis* spp., y se incubaron a 28 °C durante 7 días, monitoreando el crecimiento de los microorganismos cada 24 h.

Para determinar el porcentaje de inhibición se midió el diámetro del crecimiento micelial de cada hongo, por cada dosis y se realizaron cálculos como se describe:

$$I\% = \frac{DP}{DT} \times 100$$

Donde:

I%: Porcentaje de inhibición

DP: Diámetro del crecimiento del hongo en prueba

DT: Diámetro del crecimiento del hongo en testigo

El diseño experimental implicó la realización de 4 réplicas por cada dosis, en 3 repeticiones experimentales.

6.7 Análisis estadístico

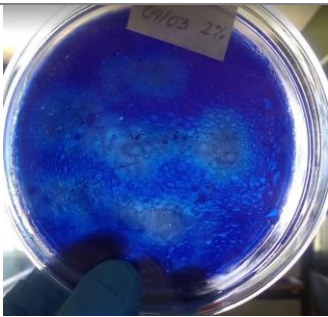
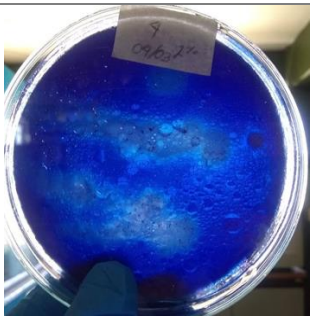
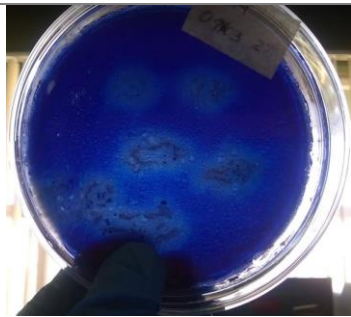
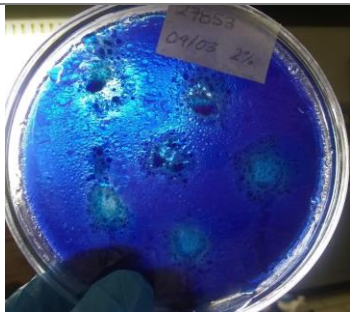
Los datos recopilados y del desarrollo de las pruebas de actividad antagónica fueron sometidos a análisis estadístico mediante el método de análisis de varianza (ANOVA de dos vías). Las diferencias significativas entre los tratamientos se basaron en las medias y se calcularon utilizando la prueba de LSD (diferencia mínima significativa) con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$, utilizando el software Statgraphics Centurion.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Prueba cualitativa de la producción de biosurfactantes en agar azul de metileno y aceite de soya al 2%.

Con el cultivo de las cepas 2, 4, 2214 y 27853 en agar azul de metileno suplementado con aceite de soya al 2%, se observó en la Tabla 11 que las cuatro cepas de interés son productoras de biosurfactantes.—Es posible observar el crecimiento de las distintas cepas bacterianas, y es notoria la presencia de un halo blanco alrededor de las colonias.

Tabla 11. Prueba cualitativa de la producción de biosurfactantes en agar azul de metileno suplementado con aceite de soya al 2%, por las cepas bacterianas 2, 4, 2214 y 27853.

Cepa	2	4	2214	27853
Imagen				

El agar azul de metileno suplementado con aceite de soya al 2%, es un medio de cultivo selectivo y diferencial, esto quiere decir que, a través de sus componentes, este medio de cultivo es capaz de inhibir y/o favorecer el crecimiento de ciertos microorganismos, como las bacterias productoras de biosurfactantes, y

proporcionar características distintivas, permitiendo su identificación (Liu *et al.*, 2013).

Con el objetivo de identificar bacterias productoras de biosurfactantes, en particular ramnolípidos, es crucial destacar que estos compuestos poseen una estructura molecular que incluye un grupo de ácido carboxílico, otorgándoles una carga negativa en soluciones acuosas.

Así, con la presencia de grupos carboxilato (-COO-) en la estructura del ramnolípido, el compuesto puede ionizarse en solución acuosa (Jiang *et al.*, 2020).

La relevancia de lo mencionado radica en que la metodología empleada en esta fase experimental se fundamenta en la característica del ramnolípido como un tensioactivo aniónico. Los tensioactivos aniónicos en soluciones acuosas pueden ser determinados mediante la formación de un par iónico insoluble con varias sustancias catiónicas, por ejemplo, sales metálicas inorgánicas, aminas solubles, colorantes básicos y tensioactivos catiónicos (Fischer, 1967). Así lo demuestran Siegmund y Wagner (1991), estandarizando la técnica que permite evidenciar el crecimiento de bacterias productoras de biosurfactantes a través de su cultivo en agar azul de metileno, suplementado con diferentes compuestos catiónicos.

En el caso del presente trabajo, el agar azul de metileno se preparó utilizando CaCl_2 , una sal metálica de carga catiónica, que en presencia de ramnolípidos, los cuales tienen carga aniónica, genera una reacción de precipitación tras la ionización de estos compuestos, que es posible observar como el halo blanco alrededor de la colonia bacteriana productora de biosurfactantes (Tabla 11) (Siegmund y Wagner, 1991). Con esto, es posible afirmar que las cepas bacterianas 2, 4, 2214 y 27853 son productoras de biosurfactantes.

7.2 Cinéticas de crecimiento y producción de biosurfactantes

Los resultados de las cinéticas de crecimiento y producción de biosurfactantes, pueden observarse en las Figuras 8 y 9. Las cuatro cepas bacterianas de estudio

mostraron un crecimiento microbiano típico. La fase exponencial comienza a los 2 días y finaliza a los 5 días de incubación, momento en el cual las bacterias entran en la fase estacionaria.

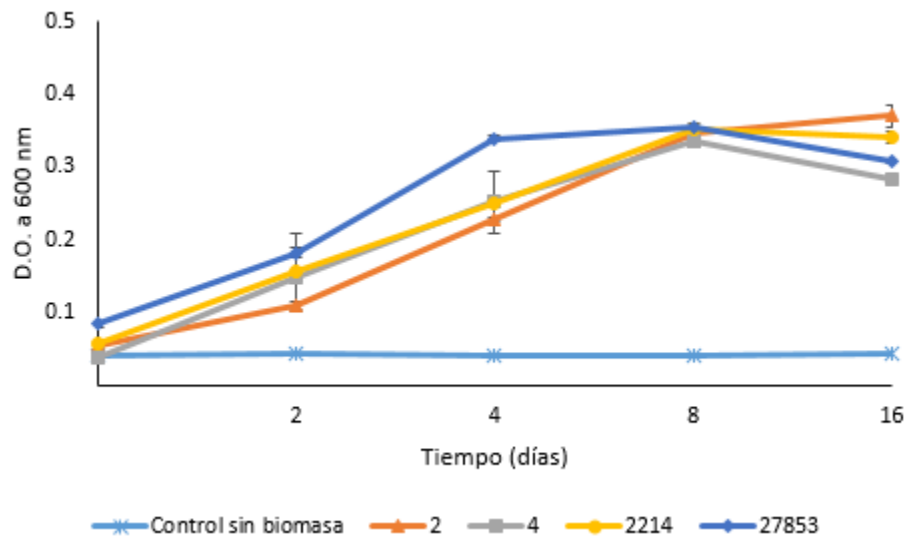


Figura 8. Crecimiento de las cepas 2, 4, 2214 y 27853, durante 16 días.

El índice de emulsificación (Figura 9) obtenido para cada cepa de estudio durante 16 días, alcanza porcentajes de emulsión que oscilan en el 40%. La cepa 4 destaca, ya que alcanza el porcentaje de emulsión más alto, en comparación con el resto de las cepas, alcanzando su valor más alto alrededor del 50% (Figura 9).

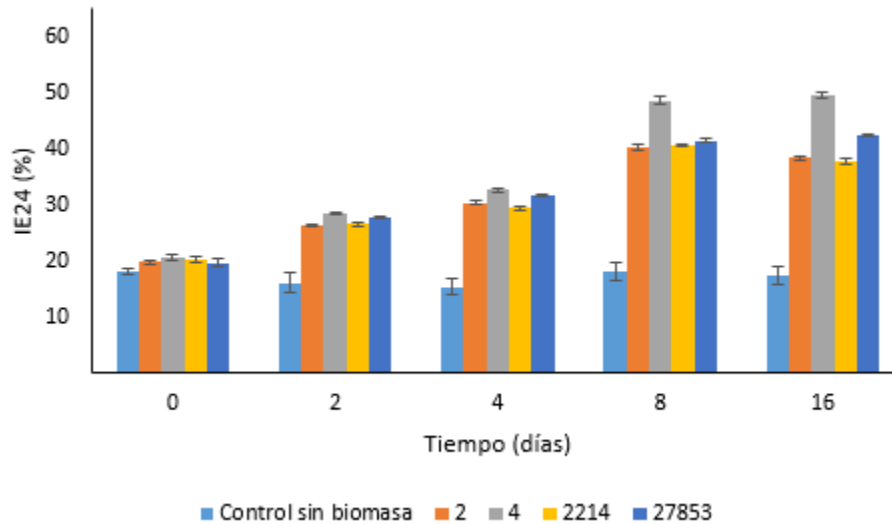


Figura 9. Índice de emulsificación de las cepas 2, 4, 2214 y 27853, durante 16 días.

El índice de emulsificación (IE24), como se muestra en la Figura 10, representa una medida cuantitativa que evalúa la habilidad de un biosurfactante para crear una emulsión estable en un período de 24 horas entre dos líquidos que generalmente no se mezclan, como agua y aceite. Esta métrica proporciona una vía indirecta para determinar la capacidad de un microorganismo en la producción de biosurfactantes, tal como se ha indicado previamente (Ribeiro et al., 2020).

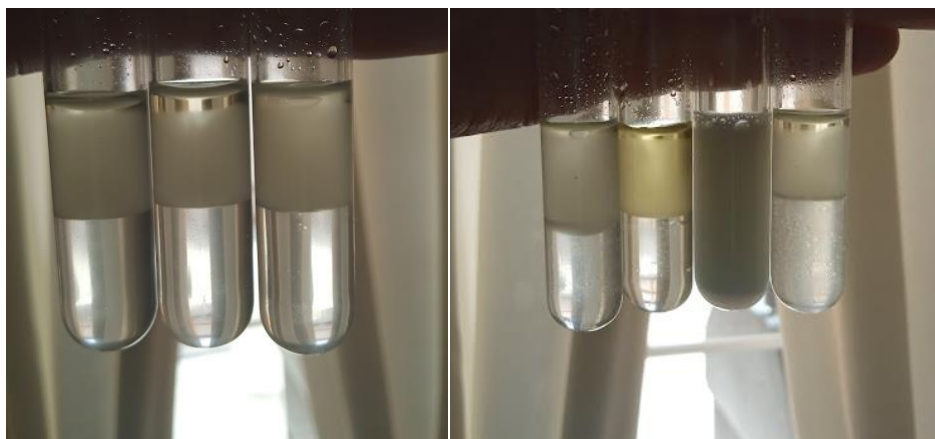


Figura 10. Prueba de índice de emulsificación con el sobrenadante libre de células de las diferentes cepas bacterianas de interés.

La cepa 4, al final de la cinética, obtuvo un IE24 del 52% (Figura 9), esto indicaría que produjo una mayor cantidad de biosurfactantes, en comparación con las cepas 2, 2214 y 27853.

El porcentaje de emulsión alcanzado por las cuatro cepas de estudio muestra una tendencia similar a lo largo de la fase exponencial. Es conocido que, durante esta fase, la población microbiana experimenta un crecimiento exponencial y la tasa de crecimiento celular es máxima (Christian, 2023). Las células, al estar en su fase de crecimiento activo, buscan aprovechar los nutrientes del medio, que, en este caso, para la fuente de carbono, al encontrarse de forma inmiscible en solución acuosa, es decir, no accesible en su totalidad, fomenta la producción de biosurfactantes por parte de las cepas bacterianas, a fin de utilizar el aceite de soya como fuente de carbono y continuar con su crecimiento (Singh, 2018).

Bagheri (2022) y Gharaei-Fathabad (2011), aluden a que la producción de biosurfactantes no está ligada al crecimiento microbiano, sino que se trata de un metabolito secundario, incrementando considerablemente su producción durante la fase estacionaria. Respecto a esto, la Figura 8 muestra el comienzo de la fase estacionaria a partir del día 5, y al analizar esta información en conjunto con la Figura 9, se observa que el porcentaje de emulsión aumenta considerablemente con el avance de esta etapa en la cinética.

Sería posible decir entonces que, de acuerdo con diversos autores, la producción de ramnolípidos, si bien es fundamental para el crecimiento microbiano óptimo en un medio con fuente de carbono inaccesible, y esto se denota al observar el aumento en el porcentaje de emulsión durante los primeros 4 días, a partir del día 5 el porcentaje de emulsión incrementa de forma notoria en el caso de la cepa 4, indicando que el sobrenadante libre de células obtenido de este cultivo contiene una mayor cantidad de biosurfactantes. Dichos biosurfactantes estarían siendo producidos como metabolitos secundarios (Bagheri, 2022 y Rahman *et al.*, 2003).

En un estudio realizado por Castillo (2022) se determinó que los biosurfactantes obtenidos de la producción por *Bacillus subtilis* estarían siendo producto del metabolismo primario, en acuerdo también con lo reportado por Vaz *et al.* (2012) y De Andrade y Pastore (2016). Esto contrastó con lo reportado por Kluge *et al.* (1988) quien postula que la surfactina de *B. subtilis*, por ejemplo, es producida durante la fase exponencial. Adicionalmente, Rahman *et al.* (2003) describe a la surfactina producida por *B. subtilis* como un compuesto con propiedades antimicrobianas y por tanto como un producto del metabolismo secundario, es decir, que se produce durante la fase estacionaria. Estas observaciones podrían ser debidas a las altas concentraciones del biosurfactante alcanzadas al final de la etapa exponencial de crecimiento (Castillo, 2022). Por otro lado, la atribución de propiedades antimicrobianas al biosurfactante producido por *B. subtilis*, deriva de que es capaz de fluidizar la membrana microbiana causando lisis y muerte celular y a que impide la formación de biopelículas de otros microorganismos (Seydlová, 2008, Rautela *et al.*, 2014 y Liu *et al.*, 2019).

Se conoce que las bacterias producen biosurfactantes por varias razones, entre las que cuales están: 1) Obtener nutrientes, aumentando la solubilidad de compuestos insolubles en agua, facilitando su absorción y utilización por parte de las bacterias; 2) Defensa y competencia, ya que los biosurfactantes pueden alterar la tensión superficial de su entorno, lo que dificulta la adherencia y colonización de otras bacterias; asimismo, 3) Movilidad y adherencia, aprovechando la misma propiedad de disminución de la tensión superficial gracias a la acción de los biosurfactantes, las bacterias adquieren mayor movilidad a través de medios acuosos (Adetunji, 2021).

Al considerar los roles naturales de los biosurfactantes, es importante enfatizar que son producidos por una amplia variedad de microorganismos diversos y tienen estructuras químicas y propiedades de superficie muy diferentes. Por lo tanto, es razonable suponer que diferentes grupos de biosurfactantes tienen diferentes roles

naturales en el crecimiento de los microorganismos productores (Markande *et al.*, 2021).

Así pues, la regulación de la producción de biosurfactantes se ha investigado a nivel molecular, para el caso de los ramnolípidos, que son producidos mayormente por bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*. En estas bacterias, se ha demostrado que la producción de biosurfactantes es inducida por señales moleculares relacionadas con el *Quorum sensing*, esto, de acuerdo con Banat (2019).

Según lo reportado por Brint y Ohman (1995), así como Pearson (1997), la producción de biosurfactantes se encuentra mediada por el *Quorum sensing*. El *Quorum sensing* se activa en las bacterias para regular diversos procesos biológicos en respuesta a la densidad de población microbiana (Miller y Bassler, 2001). En el caso de la producción de ramnolípidos, se activaría para coordinar la producción y liberación de estos compuestos surfactantes cuando hay una alta concentración de células bacterianas en el entorno (Sharma, 2021).

El *Quorum sensing* permite que las bacterias detecten y respondan a las señales químicas producidas por ellas mismas o por otras bacterias de la misma especie (Miller y Bassler, 2001). En el caso de los ramnolípidos, el sistema regulador RhIR-RhII, que forma parte del *Quorum sensing*, desempeña un papel crucial en la activación de la producción de estos compuestos (Sharma, 2021).

Ya que la producción de ramnolípidos está asociada con diversas funciones bacterianas, como la formación de biofilms, la virulencia y la competencia con otras especies bacterianas, estos compuestos ayudan a las bacterias a colonizar superficies, a movilizar moléculas hidrofóbicas y a regular la adhesión y separación de las células bacterianas (Revathi *et al.*, 2022).

Como ya se ha mencionado anteriormente, en el presente trabajo las distintas cepas bacterianas fueron cultivadas en medio de sales minerales suplementado con aceite

de soya al 2%, como única fuente de carbono. Este compuesto es inmiscible en el agua, por lo que, aun encontrándose en agitación constante, el aceite de soya no se encontraba soluble en el medio, disminuyendo así su disponibilidad para aprovechamiento de las bacterias. Bajo esta condición, se conduciría a que las cepas bacterianas produjeran biosurfactante con la finalidad de acceder a la fuente de carbono y continuar reproduciéndose (Revathi *et al.*, 2022).

Ahora bien, aunque los biosurfactantes son producidos por un gran número de microorganismos y son claramente significativos en muchos aspectos del crecimiento, es difícil generalizar sobre sus roles en la fisiología microbiana (Meghana *et al.*, 2022). En el caso de los ramnolípidos, son considerados exoproductos asociados a la virulencia de *P. aeruginosa*, ya que su producción se lleva a cabo y se regula en correlación con otros factores de virulencia (Soberón *et al.*, 2020).

Es interesante notar que las cepas 2, 2214 y 27853, de acuerdo con la Figura 9, muestran un comportamiento similar respecto a su índice de emulsificación. Por otro lado, la cepa 4 muestra porcentajes más elevados, sobre todo a partir del día 8 de incubación. Las cepas bacterianas pueden diferenciarse debido a mutaciones en su material genético que pueden ocurrir de manera natural o por exposición a diferentes agentes, como antibióticos, radiación o productos químicos (Habibi, 2013). Estas mutaciones pueden afectar la expresión de ciertos genes en la bacteria, lo que puede llevar a diferencias en su comportamiento y características. Por estas razones, las cepas bacterianas pueden presentar diferentes niveles de virulencia, resistencia a antibióticos y otros factores que pueden afectar su capacidad para causar enfermedades (Habibi, 2013).

La Figura 9 describe el índice de emulsificación obtenido por las cepas 2, 4, 2214 y 27853, durante 16 días. Se observan porcentajes de emulsión similares alcanzados entre una cepa y otra, desde el día 0 hasta el día 4. A partir del día 8, es notorio un incremento en el porcentaje de emulsión alcanzado por la cepa 4. Este incremento

se mantiene hasta el día 16, indicando que la cepa 4 tiene un mayor alcance en el índice de emulsificación, con respecto a las cepas 2, 2214 y 27853.

El índice de emulsificación es una medida cuantitativa de la capacidad de un compuesto, en este caso los biosurfactantes, para formar una emulsión estable entre dos líquidos que normalmente no se mezclan, como agua y aceite (Ribeiro *et al.*, 2020).

Podría decirse que, a mayor índice de emulsificación, el compuesto emulsificante posee una mayor capacidad de disrupción de la bicapa que se forma por la polaridad de los compuestos presentes en la mezcla (Ribeiro *et al.*, 2020). Esto es de gran importancia, pues acuerdo con los fines que se busque aplicar el compuesto emulsificante, en este caso los biosurfactantes, el mayor porcentaje de emulsión conllevaría a un resultado más eficaz en su aplicación.

La cepa 4 demostró tener una tendencia hacia una mayor capacidad emulsificante, de acuerdo con lo observado en la Figura 9. Esto sería atribuible a una mayor producción en cantidad de biosurfactantes, lo cual sucede a partir del día 6 de la cinética, donde sería posible afirmar que las cepas bacterianas entraron en etapa de latencia, para lo cual fue necesaria la secreción de estos compuestos con fines de supervivencia (Singh, 2018). Así se observa en las Figuras 8 y 9, donde se muestra el crecimiento de la biomasa, al tiempo que se producen biosurfactantes, por cada cepa.

La cepa 4, que presenta un índice de emulsificación superior en comparación con las cepas 2, 2214 y 27853, exhibe una tendencia hacia una mayor eficiencia en la producción de biosurfactantes. Esto se refleja en su índice de emulsificación más alto, como se muestra en la Figura 9. En consecuencia, se puede llegar a una conclusión parcial de que esta cepa demuestra una mayor capacidad y eficacia en la producción de biosurfactantes.

7.3 Producción de biosurfactantes totales por precipitación ácida.

Una reacción de precipitación es un proceso químico que ocurre cuando dos sustancias se combinan en un medio acuoso y generan un producto que no es soluble en el agua. Estas reacciones se caracterizan por la formación de un sólido, conocido como "precipitado", que se separa del líquido circundante. En su mayoría, las reacciones de precipitación involucran compuestos iónicos, como se describe en la fuente de Khan Academy (2015).

Hay dos puntos claves en una reacción de precipitación:

1. Los reactivos se han disuelto en el disolvente, por lo que existen como iones en solución.
2. Los reactivos se combinan para formar una especie insoluble en agua, por lo que se forma un precipitado.

Este es el fundamento de la técnica empleada en este trabajo para la obtención de biosurfactantes totales, producidos por las cepas bacterianas de interés que, como se ha descrito en secciones anteriores, se cultivaron en medio de sales minerales, por lo que los biosurfactantes producidos se encontrarían disueltos en el agua destilada propia del medio de cultivo.

Es importante recordar que los ramnolípidos tienen una estructura molecular que incluye un grupo de ácido carboxílico que les confiere una carga negativa en solución acuosa. Así, con la presencia de grupos carboxilato (-COO-) en la estructura del ramnolípidos, el compuesto puede ionizarse en solución acuosa (Jiang *et al.*, 2020).

Lo anterior es importante ya que el ensayo utilizado en esta parte experimental se basa, precisamente, en la propiedad del ramnolípidos de ser un tensioactivo aniónico. Los tensioactivos aniónicos en soluciones acuosas pueden ser determinados mediante la formación de un par iónico insoluble con varias sustancias catiónicas, por ejemplo, sales metálicas inorgánicas, aminas solubles, colorantes básicos y

tensioactivos catiónicos (Fischer, 1967). En este trabajo, la reacción de precipitación se efectuó utilizando HCl, en el cual el hidrógeno está parcialmente cargado positivamente y el cloro está parcialmente cargado negativamente. Esto es importante, ya que al adicionar este compuesto en disolución con los biosurfactantes, se generaría una reacción anión-catión entre los iones solubles, de manera que se formó el precipitado y, con esto, después de evaporar el líquido del medio de cultivo, se obtuvo el concentrado de los biosurfactantes totales (Figura 11).



Figura 11. Concentrado de biosurfactantes totales.

Tras realizar la extracción de biosurfactantes totales por la técnica de precipitación ácida, el rendimiento obtenido para los biosurfactantes producidos por las cepas de interés se describe en la Tabla 12, que muestra los valores totales de gramos de biosurfactante por cada litro de medio de cultivo.

Tabla 12. Rendimiento en la producción de biosurfactantes totales por las cepas bacterianas de interés con diferentes fuentes de carbono.

Cepa	Rendimiento (g/L)	
	Aceite de soya	Glicerol
2	0.59	14.71
4	3.92	31.6
2214	1.09	15.23

27853	1.45	16.73
--------------	------	-------

Se observa que las cepas de interés 2, 4, 2214 y 27853, obtuvieron distintos rendimientos. Los biosurfactantes producidos por las cepas 2, 2214 y 27853 oscilan entre los 1.5 y 1.5 g/L, y entre los 14 y 16 g/L con aceite de soya y con glicerol, respectivamente, mientras que la cepa 4 destaca con una producción de 3.92 g/L y 31.6 g/L con las mismas fuentes de carbono, a los 30 días de incubación.

El rendimiento, en el contexto de la producción de metabolitos por bacterias, se refiere a la cantidad de metabolito producido por unidad de tiempo o de biomasa (Mukherjee *et al.*, 2008). Es una medida de la eficiencia de la producción y se expresa generalmente en términos de concentración o volumen del metabolito producido. Esta medida es importante para evaluar la eficiencia de un proceso de producción de metabolitos y para optimizar las condiciones de cultivo con el fin de aumentar la producción (Mukherjee *et al.*, 2008).

El rendimiento de un metabolito producido por una bacteria puede estar influenciado por una serie de factores, como la genética de la bacteria, el medio y condiciones de cultivo, la señalización celular bajo condiciones de estrés, el metabolismo intermedio. Estos factores pueden interactuar entre sí y su influencia en el rendimiento de un metabolito puede variar dependiendo del sistema bacteriano y del metabolito específico que se esté estudiando, en este caso, biosurfactantes (Déziel *et al.*, 1996).

Para la producción de biosurfactantes, destaca la fuente de carbono como uno de los factores principales, al ser necesaria para el crecimiento microbiano y la síntesis de compuestos tensioactivos, la fuente de carbono es el sustrato para la producción del tensioactivo. Algunas fuentes de carbono pueden ser fácilmente utilizadas por los microorganismos en mayor o menor grado, lo que promueve un crecimiento más acelerado con una mayor producción de biosurfactantes (Ray *et al.*, 2022). En el caso de este experimento con las cepas 2, 4, 2214 y 27853, las fuentes de carbono utilizadas fueron aceite de soya y glicerol, ambas sustancias insolubles en el agua destilada del medio de cultivo líquido. Al encontrarse inaccesibles, la supervivencia

de las bacterias llevaría a la producción de biosurfactantes, con el objetivo de solubilizar el aceite de soya o el glicerol y hacerlo más accesible para procesarlo (Ribeiro *et al.*, 2020).

Diferentes estudios se han llevado a cabo sobre la producción de biosurfactantes por parte de distintos organismos utilizando diferentes fuentes de carbono. Los más comunes son las investigaciones realizadas con *Pseudomonas aeruginosa*. Según Liu *et al.* (2017), el uso de glucosa como fuente de carbono genera un rendimiento de producción de biosurfactante variado, al igual que el glicerol, como fuente de carbono. Por otro lado, en el caso de utilizar aceites vegetales, como el aceite de oliva, el rendimiento se encuentra entre los 6.9 g/L y los 13.3 g/L, dependiendo de las condiciones de cultivo. Para lo estudiado por Tellez (2007), los valores obtenidos para glucosa y glicerol son considerablemente inferiores, aunque la producción de este último es mayor. La producción de biosurfactante por parte de *Klebsiella pneumoniae*, por ejemplo, aumenta al utilizar glicerol, en vez de glucosa (Nwaguma, Chikere y Okpokwasili, 2016). En el caso del crecimiento con aceite de oliva la producción fue óptima, generando un rendimiento en el rango esperado de 6.9 a 13.3 g/L, de acuerdo con Téllez (2007).

En este trabajo, se utilizó glicerol como fuente de carbono, con base en estudios previos como el de Somoza (2016), donde se profundiza en el rendimiento de la producción de biosurfactantes utilizando diferentes fuentes de carbono, y respondiendo a la tendencia de los resultados obtenidos con el ensayo de índice de emulsificación y los valores de rendimiento totales de la producción de biosurfactantes.

Las diferencias en el rendimiento de los biosurfactantes producidos por las cepas de interés son notorias (Tabla 12). Sería difícil hacer atribuibles estas diferencias a algún parámetro particular puesto que, como ya se ha mencionado, son diversos los factores que influyen en la producción de un metabolito (Déziel *et al.*, 1996). Ya que el tratamiento para la producción de biosurfactantes, para cada cepa, se realizó de forma igualitaria, es decir, todas las cepas se incubaron en las mismas

condiciones de temperatura y agitación, podría suponerse que las diferencias de rendimiento entre una cepa y otra, pero muy particularmente, entre la cepa 4 y el resto de las cepas bacterianas, se debe a características genéticas propias.

7.4 Pruebas de actividad antagónica contra los hongos fitopatógenos *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. y *Botrytis* spp.

Los resultados obtenidos del desarrollo de las pruebas de actividad antagónica contra los hongos fitopatógenos de los géneros *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. y *Botrytis* spp., se describen en la Tabla 13, que muestra el porcentaje de inhibición logrado por el biosurfactante en dilución, de acuerdo con las dosis correspondientes, para cada hongo fitopatógeno en estudio.

Tabla 13. Porcentaje de inhibición del biosurfactante producido por la cepa 4, en hongos fitopatógenos de los géneros *Botrytis* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. T: Testigo

Hongo fitopatógeno	Porcentaje de inhibición según las dosis (%)			
	T (0 g/L)	1 g/L	1.5 g/L	2 g/L
<i>Botrytis</i> sp	0	0.24	0.24	0.25
<i>Fusarium</i> sp	0	4.36	6.01	7.08
<i>Rhizoctonia</i> sp	0	31.26	34.76	61.96

Se observó para los hongos *Fusarium* spp. y *Botrytis* spp., un porcentaje de inhibición escaso (Tabla 13), en comparación con el porcentaje alcanzado para el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia* spp., en cuyo caso el porcentaje se eleva. Es posible notar, también, que el porcentaje de inhibición aumenta en función de la

dosis de biosurfactante, siendo mayor con la dosis 2 g/L. Estas afirmaciones se respaldan con lo analizado en la Tabla 14, donde se observa que existen diferencias significativas entre las dosis aplicadas para los diferentes hongos.

Tabla 14. Inhibición promedio y desviación estándar de *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. con distintas dosis de biosurfactante en dos intervalos distintos. Bt: Testigo (0 g/L); B1: 1 g/L; B1.5: 1.5 g/L; B2: 2 g/L.

Dosis	3 días			7 días		
		F	Valor de P		F	Valor de P
<i>Fusarium</i>						
Bt						
B1	3.40 ± 2.73 ^b	6.9	0.003	4.36 ± 1.08 ^b	30.91	0.001
B1.5	4.39 ± 3.18 ^{ab}			6.0 ± 0.69 ^{ab}		
B2	7.32 ± 2.91 ^a			7.07 ± 2.14 ^a		
<i>Rhizoctonia</i>						
Bt						
B1	29.42 ± 1.01 ^c	1135.7	0.001	31.26 ± 0.83 ^c	817.65	0.001
B1.5	55.71 ± 1.29 ^b			34.75 ± 1.28 ^b		
B2	32.54 ± 2.54 ^a			61.95 ± 3.65 ^a		

Las letras diferentes señalan diferencias estadísticamente significativas. F = valor crítico de Fisher, P = probabilidad. Prueba de LSD con $p < 0.001$.

La Tabla 14 muestra la variación en los porcentajes de inhibición alcanzados en función de la dosis aplicada, según lo determinado en el experimento. De acuerdo con lo observado, para los hongos *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp., puede rechazarse la hipótesis nula que establece que el biosurfactante no tiene efecto inhibitorio en el crecimiento de estos hongos. Destaca la interacción con *Rhizoctonia* spp., que arroja porcentajes de inhibición por encima del 50%. Así se observa en la Figura 12, donde se presenta el descenso en el crecimiento radial del hongo *Rhizoctonia* spp., según aumenta la dosis de biosurfactante.

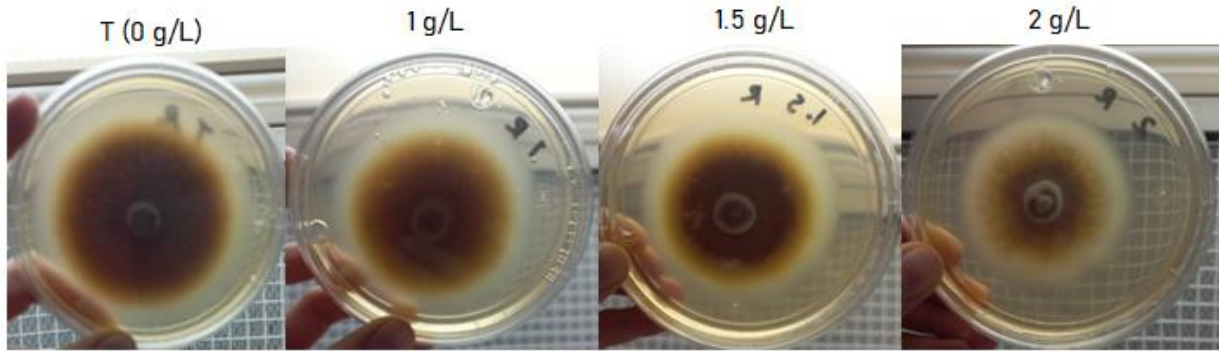


Figura 12. Inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia* spp. con la aplicación del biosurfactante en diferentes dosis. T: Testigo.

La membrana es una de las estructuras vegetativas más importantes de un hongo, ya que, además de proteger a la célula fúngica, juega un papel esencial en la reproducción y diseminación del hongo. Con esto, cualquier daño a la integridad de la membrana es de importancia para la patogenicidad del hongo (Borah, 2016).

Las células fúngicas contienen en su membrana un componente llamado ergosterol, rodeado por una pared celular compuesta de quitina. La pared celular de los hongos es una estructura con gran plasticidad, que da la forma a la célula, controla la permeabilidad celular y protege a la célula de los cambios osmóticos (Zaragoza, 2018). Además de estas importantes funciones, constituye el lugar de interacción con el medio externo, localizándose en ella las adhesinas y un gran número de receptores que, tras su activación, desencadenarán una compleja cascada de señales en el interior de la célula (Zaragoza, 2018).

Dada su localización en el exterior de la célula, la pared es el primer lugar de interacción con el hospedador, jugando un papel muy importante en el desarrollo de la acción patógena fúngica (Pontón, 2008).

La pared celular es una estructura esencial para los hongos y su eliminación o los defectos en su formación tienen efectos profundos en el crecimiento y la morfología de la célula fúngica, pudiendo causar la muerte celular por lisis. Su contenido de quitina varía según la fase morfológica del hongo y está en función de cada tipo de hongo (Zaragoza, 2018).

Por otro lado, la pared contiene lípidos, proteínas y carbohidratos, de los cuales destaca el glucano, que es el polisacárido estructural más importante de la pared y representa el 50-60% del peso seco de esta estructura. La mayoría de los polímeros de glucano están compuestos de unidades de glucosa con uniones β -1,3 (65-90%), aunque también hay glucanos con enlaces β -1,6, β -1,4, -1,3 y -1,4. El β -1,3-D-glucano es el componente estructural más importante de la pared, al que se unen covalentemente otros componentes de esta estructura. El β -1,3-D-glucano se sintetiza por un complejo de enzimas situado en la membrana plasmática, denominadas glucano sintetetasas. Estas enzimas catalizan la formación de cadenas lineales de glucano compuestas por aproximadamente 1,500 residuos de glucosa unidos por enlaces β -1,3. En estas cadenas, cada 40-50 residuos de glucosa se unen nuevas unidades de glucosa por enlaces β -1,3 para dar lugar a una estructura ramificada. Estas ramificaciones pueden unirse a otros glucanos, a la quitina o a las manoproteínas, proporcionando a la pared una gran resistencia mecánica esencial para mantener la integridad celular (Pontón, 2008).

Esto es importante, ya que, en algunos estudios como en el de Pontón (2008), al inhibir la actividad de las enzimas glucano sintetasa con la aplicación de equinocandinas, un tipo de lipopéptido, se inhibe la formación del β -1,3-D-glucano y produce, según el tipo de hongo, un efecto fungicida o fungistático.

En el caso de los biosurfactantes, se plantea que, si bien estos pueden tener interacción con estructuras de la membrana fúngica y de esta forma impedir la progresión de cascadas de señalización importantes para la integridad del hongo, tal como lo describe Devendra (2010) y aludiendo a su relación con el fenómeno de *Quorum sensing*, el supuesto más relevante para sustentar la acción de los biosurfactantes sobre los hongos es aquella que resalta la capacidad de estos compuestos para intercalarse en la membrana de los organismos y causar su disrupción.

De acuerdo con Shen *et al.* (2010), los biosurfactantes actúan como sustancias desestabilizadoras de membranas, lo que causaría la lisis celular del organismo, de la misma forma que sucede con el fenómeno de hemólisis. En acuerdo con esto, Borah (2016), reporta efectos inhibitorios contra hongos del género *Fusarium* (Tabla 15) aludiendo al daño causado por los ramnolípidos que, por su naturaleza aniónica conduce a la disrupción de la membrana fosfolipídica.

En los resultados de diversos estudios, como los que ejemplifica la Tabla 15, se ha encontrado la capacidad de diferentes biosurfactantes para hacer frente a diversos tipos de hongos fitopatógenos.

Tabla 15. Porcentaje de inhibición de diversos hongos fitopatógenos por la acción de diferentes tipos de biosurfactantes.

Biosurfactante	Hongos fitopatógenos que inhibe	Inhibición (%)	Referencia
Lipopéptido	<i>Fusarium sp</i>	50	Mnif (2015)
	<i>Rhizoctonia sp</i>	50	Cortés (2021)
Ramnolípidos	<i>Fusarium verticillioides</i>	50	Borah (2016)
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	42.8	Goswami (2019)
Lipopéptidos	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	41.2	Goswami (2019)
	<i>Corynespora cassicola</i>	33.8	Goswami (2019)
	<i>Fusarium verticillioides</i>	29.9	Goswami (2019)

<i>Fusarium oxysporum</i>	22.9	Goswami (2019)
-------------------------------	------	----------------

Como se muestra en la Tabla 15, diferentes tipos de biosurfactantes han mostrado efectos inhibitorios frente a una diversidad de hongos fitopatógenos. Es el caso de los lipopéptidos, que son mayormente conocidos por su capacidad para permeabilizar membranas. Gracias a esta capacidad, pueden inducir la formación de poros en la bicapa lipídica, desestabilizando la membrana y su permeabilidad, lo que causaría una inestabilidad que conduciría a la muerte del hongo fitopatógeno (Goswami, 2019). Sería posible sustentar que, para los resultados obtenidos en este trabajo, la interacción entre los biosurfactantes y la membrana fúngica es clave en la inhibición del crecimiento de los hongos fitopatógenos.

8. CONCLUSIONES

- Las cepas bacterianas 2, 4 y 2214 producen biosurfactantes con rendimientos que tienden a ser distintos entre una cepa y otra.
- La cepa 4 mostró porcentajes de emulsión totales más altos que las cepas 2 y 2214, por lo que esta cepa produciría una mayor cantidad de biosurfactantes, esto es más evidente con los valores de rendimiento obtenidos de la producción de biosurfactantes, en cuyo caso, el rendimiento total de la cepa 4 es mayor a los valores totales de rendimiento de las cepas 2 y 2214.
- Los biosurfactantes producidos por la cepa 4 tienen efectos inhibitorios sobre el crecimiento *in vitro* de los hongos *Fusarium* y *Rhizoctonia*. De acuerdo con lo observado, la dosis más alta, 2 g/L, tiene un efecto mayor sobre el crecimiento de los hongos.
- Los biosurfactantes producidos por la cepa 4 no mostraron inhibir el crecimiento del hongo *Botrytis* con ninguna de las dosis probadas.

9. REFERENCIAS

Acuña, D. (2019). *Optimización en la producción de biosurfactante bacteriano en efluente de trampa de grasas de cocina*. Tesis de grado. Universidad de los Andes, Colombia.

Adetunji, A. I., & Olaniran, A. O. (2021). *Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview*. Saudi Journal of Biological Sciences, 28(1), 669-679. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.058>

Adetunji, C. O., Olaniyan, O. T., Anani, O. A., Inobeme, A., Samson, A. O., Oloke, J. K., Palnam, W. D., & Ali, S. (2022). *Role of biosurfactant in the destruction of pores and destabilization of the biological membrane of pathogenic microorganisms*. En Elsevier eBooks (pp. 175-188). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85146-6.00014-0>

Altmajer-Vaz, D., Gudiña, E. J., Alameda, E. J., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2012). *Performance of a biosurfactant produced by a Bacillus subtilis strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 89, 167-174. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.009>

Téllez, A. (2007). *Análisis y evaluación de la producción de biosurfactante por una Klebsiella pneumoniae aislada de una trampa de grasas*. Universidad de los Andes.

Anton, R. (2005). *Tensión interfacial: Módulo de Enseñanza de Fenómenos Interfaciales* (pp. 1-5). Venezuela: Universidad de Los Andes.

Amaral, P., Ferreira, T. F., Fontes, G. C., & Coelho, M. (2009). *Glycerol valorization: new biotechnological routes*. *Food and Bioprocess Processing*, 87(3), 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.03.008>

Bagheri, H., Mohebbi, A., Amani, F. S., & Naderi, M. (2022). *Application of low molecular weight and high molecular weight biosurfactant in medicine/biomedical/pharmaceutical industries*. En Elsevier eBooks (pp. 1-60). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85146-6.00027-9>

Banat, I., Kwienien., M., Cobice, D. & Tripathi, L. (2019). *Quorum sensing as a potencial target for increased production of rhamnolipid biosurfactant in Burkholderia thailandensis E264*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, doi: 10.1007/s00253-019-09942-5

Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., Smyth, T. J., & Marchant, R. (2010). *Microbial biosurfactants production, applications and future potential*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 427-444. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0>

Bonilla, M. (2005). *Production and characterization of a new bioemulsifier from Pseudomonas putida ML2*. *Journal of Applied Microbiology*, 98(2), <https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/98/2/456/6722526?login=false>. <https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/98/2/456/6722526?login=false>

Borah, S. N., Goswami, D., Sarma, H. K., Cameotra, S. S., & Deka, S. (2016). *Rhamnolipid biosurfactant against fusarium verticillioides to control stalk and ear rot disease of maize*. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01505>

Bi, K., Liang, Y., Mengiste, T., & Sharon, A. (2023). *Killing Softly: A Roadmap of Botrytis cinerea Pathogenicity*. Trends in Plant Science, 28(2), 211-222. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.08.024>

Brint, J. M., & Ohman, D. E. (1995). *Synthesis of multiple exoproducts in pseudomonas aeruginosa is under the control of RHLR-RHLI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LUXR-LUXI family*. Journal of Bacteriology, 177(24), 7155-7163. <https://doi.org/10.1128/jb.177.24.7155-7163.1995>

Bullon, J., Salager, J. & Rojas, O. (2007). *Fenómenos interfaciales y surfactantes en la industria papelera*. Módulo de enseñanza en fenómenos interfaciales en español 3, 19. 2020, Septiembre 25, De ResearchGate Base de datos.

Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G. A., Uad, I., & González-López, J. (2009). *Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes*. Future prospects. Science of The Total Environment, 407(12), 3634-3640. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.07.008>

Campillo, M., (2023). *El sector agrícola en México*. Statista Research Department. Sitio web: <https://es.statista.com/temas/7029/el-sector-agricola-en-mexico/#topicOverview>

Cao, X., Liao, Z., Wang, C., Yang, W., & Lu, M. (2009). *Evaluation of a lipopeptide biosurfactant from Bacillus natto TK-1 as a potential source of anti-adhesive, antimicrobial and antitumor activities*. Brazilian Journal of Microbiology, 40(2), 373-379. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822009000200030>

Carreras, N., Hernández, E. & Sánchez, D. (2020). *Conociendo a los hongos fitopatógenos*. Enero 15, 2020, de Instituto de Ecología del CONACYT Sitio web: <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/2013-06-05-10-34-10/17-ciencia->

hoy/1042-conociendo-a-los-hongos-

fitopatogenos#:~:text=En%20la%20sociedad%2C%20los%20hongos,son%20de%20los%20m%C3%A1s%20importantes.

Castillo, E. (2022, marzo). *Producción y evaluación de un biosurfactante para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. Universidad Autónoma Metropolitana.

Chandran, P. (2010). *Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeasts species Trichosporon asahii isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil*. International Journal of Engineering Science and Technology 2(12), 6942-6953. https://www.researchgate.net/profile/Nilanjana-Das-7/publication/50384241_Biosurfactant_production_and_diesel_oil_degradation_by_yeast_species_Trichosporon_asahii_isolated_from_petroleum_hydrocarbon_contaminated_soil/links/0deec531f0a7c2f3ee000000/Biosurfactant-production-and-diesel-oil-degradation-by-yeast-species-Trichosporon-asahii-isolated-from-petroleum-hydrocarbon-contaminated-soil.pdf

Christian, J. (2023). *Análisis del crecimiento microbiano*. Microbiología. <https://microbiologia.net/microbiologia/analisis-crecimiento-microbiano/>

Cortés, S., Acuña, P. E., Arrieta, D., Montañez, B., Morato, A., Sanz, J. L., & Barragán, B. E. (2021). *Biosurfactant production by Bacillus tequilensis ZSB10: Structural characterization, physicochemical, and antifungal properties*. Journal of Surfactants and Detergents, 24(5), 773-782. <https://doi.org/10.1002/jsde.12515>

Cruz, I. (2021). Using microorganisms for a sustainable agriculture in Mexico: considerations and challenges. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas* v, 12(5), Scielo. <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v12n5/2007-0934-remexca-12-05-899-en.pdf>

De Andrade, C., Pastore, G., Jauregi, P. (2016) *Ultrafiltration based purification strategies for surfactin produced by Bacillus subtilis LB5A using cassava wastewater as substrate*. J Chem Technol Biotechnol 91:3018–3027. <https://doi.org/10.1002/jctb.4928>

Deng, M., Li, J., Hong, Y., Xu, X., Chen, W., Yuan, J., Peng, J., Yi, M., & Wang, J. (2016). *Characterization of a novel biosurfactant produced by marine hydrocarbon-degrading bacterium Achromobacter sp. HZ01*. Journal of Applied Microbiology, 120(4), 889-899. <https://doi.org/10.1111/jam.13065>

De Sanidad Inocuidad Y Calidad Agroalimentaria, S. N. (2023). Registro de Plaguicidas Agrícolas. gov.mx. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/registro-de-plaguicidas-agricolas?state=published>

Devendra, D. H., Zinjarde, S., Venugopalan, V., McLean, R., Weber, M. M., & Rahman, P. (2010). Quorum sensing: Implications on rhamnolipid Biosurfactant production. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 27(1), 159-184. <https://doi.org/10.1080/02648725.2010.10648149>

Déziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lépine, F., & Bisailon, J. (1996). *Biosurfactant production by a soil Pseudomonas strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(6), 1908-1912. <https://doi.org/10.1128/aem.62.6.1908-1912.1996>

Diniz, R., Moura, J., De Campos, G. & Asfora, L. (2014). *Characterization and properties of the biosurfactant produced by Candida lipolytica UCP 0988*, *Electronic Journal of Biotechnology*, 17 (34-38), <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2013.12.006>

Farm, B. (2020). *¿Qué es un fungicida y para qué sirve?* | Basic Farm. Laboratorio veterinario Basic Farm. <https://basicfarm.com/blog/que-es-fungicida->

eConference. <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=ae5bbd43a3ca75e5b2de1aec6b98ecd9068baefc#page=640>

Jadhav, M. U., Kalme, S., Tamboli, D. P., & Govindwar, S. P. (2011). *Rhamnolipid from Pseudomonas desmolyticum NCIM-2112 and its role in the degradation of brown 3REL*. Journal of Basic Microbiology, 51(4), 385-396. <https://doi.org/10.1002/jobm.201000364>

Jiang, J., Jin, M., Li, X., Meng, Q., Niu, J., & Long, X. (2020). *Recent progress and trends in the analysis and identification of rhamnolipids*. Applied Microbiology and Biotechnology, 104(19), 8171-8186. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10841-3>

Jimoh, A. & Lin, J. (2019, Agosto 22). *Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 184, 19. 2020, Septiembre 17, De ELSEVIER Base de datos.

Joshi, S., Al-Wahaibi, Y., Al-Bahry, S., Elshafie, A. E., Al-Bemani, A., Al-Bahri, A. K., & Al-Mandhari, M. (2016). *Production, characterization, and application of Bacillus licheniformis W16 biosurfactant in enhancing oil recovery*. Frontiers in Microbiology, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01853>

Kluge, B., Vater, J., Salnikow, J., Eckart, K. (1988) *Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from Bacillus subtilis ATCC 21 332*. FEBS Lett 231:107–110

Krishnan, N., Velramar, B., & Velu, R. K. (2019). *Investigation of antifungal activity of surfactin against mycotoxigenic phytopathogenic fungus Fusarium moniliforme and its impact in seed germination and mycotoxicosis*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 155, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.01.010>

Lai, C. C., Huang, Y. C., Wei, Y. H., & Chang, J. S. (2009). *Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil*. *Journal of Hazardous Materials*, 167(1-3), 609-614. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.017>

Lamilla, C. (2011). *Biosurfactantes producidos por cepas bacterianas aisladas desde la Antártica con potencial uso biotecnológico*. Tesis de grado. Universidad de la Frontera, Chile.

Liu, J., Yi-Tong, C., Xu, R., & Yun-Peng, J. (2013). *Screening and evaluation of Biosurfactant-Producing strains isolated from oilfield wastewater*. *Indian Journal of Microbiology*, 53(2), 168-174. <https://doi.org/10.1007/s12088-013-0379-y>

Wu, S., Liu, G., Zhou, S., Sha, Z., & Sun, C. (2019). *Characterization of antifungal lipopeptide biosurfactants produced by marine bacterium Bacillus Sp. CS30*. *Marine Drugs*, 17(4), 199. <https://doi.org/10.3390/md17040199>

Malakar, C., & Deka, S. (2021). *Biosurfactants Against Drug-Resistant Human and Plant Pathogens*. *Biosurfactants for a Sustainable Future: Production and Applications in the Environment and Biomedicine*, 353-372. <https://doi.org/10.1002/9781119671022.ch16>

Manual de Plaguicidas de Centroamérica Base de datos (2023). Sitio web: <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/529-tiabendazol>

Markande, A. R., Patel, D. D., & Varjani, S. (2021). *A review on biosurfactants: properties, applications and current developments*. *Bioresource Technology*, 330, 124963. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124963>

Martínez, X. (2011). *Producción de biosurfactantes por microorganismos aislados de sitios extremos y contaminados con hidrocarburos*. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del IPN, Ciudad de México, México.

Martínez, C., Gómez, S., Villalobos, R., Waliszewski, S. M., Calderón, M. E., Félix, R., & Álvarez, A. (2009). *Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico*. *Environment International*, 35(8), 1155-1159. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.07.010>

Massaro, R. (2013). *Aplicación de plaguicidas: un concepto poco aplicado*. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*, 116, 41-46.

Maycelly, M. (2014). *Obtención de un biosurfactante para el recobro mejorado de petróleo*. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.

Meghana, K., Anuradha, S. (2022). *Understanding mechanisms underlying genes regulating the production of biosurfactant*. En Elsevier eBooks (pp. 245-262). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822921-7.00008-8>

Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). *Quorum sensing in bacteria*. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 165-199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>

Mnif, I. & Ghribi, D. (2016). *Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agricultura and food industry*. *Journal of Science or Food and Agriculture*, 96, 10, 2020, Octubre 15, De Wiley Online Library Base de datos

Mnif, I., Grau-Campistany, A., Coronel-León, J., Hammami, I., Triki, M. A., Manresa, A., & Ghribi, D. (2015). *Purification and identification of Bacillus subtilis SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against rhizoctonia bataticola and Rhizoctonia solani*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(7), 6690-6699. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5826-3>

Monteiro, S. A., Sasaki, G. L., De Souza, L. M., Meira, J. A., De Araújo, J. M., Mitchell, D. A., Ramos, L. P., & Krieger, N. (2007). *Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa DAUPE 614*. *Chemistry and Physics of Lipids*, 147(1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2007.02.001>

Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T., Yamamoto, S., Kitagawa, M., Sogabe, A., & Kitamoto, D. (2008). *Identification of Pseudozyma graminicola CBS 10092 as a producer of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids*. *Journal of Oleo Science*, 57(2), 123-131. <https://doi.org/10.5650/jos.57.123>

Mukherjee, S., Das, P., Sivapathasekaran, C., & Sen, R. (2008). *Enhanced production of biosurfactant by a marine bacterium on statistical screening of nutritional parameters*. *Biochemical Engineering Journal*, 42(3), 254-260. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.07.003>

Mujumdar, S., Joshi, P. & Karve, N. (2019). *Production, characterization, and applications of bioemulsifiers (BE) and biosurfactants (BS) produced by Acinetobacter spp.: A review*. *Journal of Basic Microbiology*. 59(3) <https://doi.org/10.1002/jobm.201800364>

Muñiz, H. (2014) *Control de hongos fitopatógenos de importancia agrícola utilizando como agente a Bacillus thuringiensis*. Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, Nuevo León, México.

Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T. K., & Sivachidambaram, P. (2008). *Biosurfactants: Properties, commercial production and application*. *Current Science*, 94(6), 736–747. <http://www.jstor.org/stable/24100627>

Nalini, S., Sathiyamurthi, S., Dhas, T. S., & Revathi, M. (2023). *Lipopeptide and Rhamnolipid Biosurfactant as Biopesticides*. En Multifunctional Microbial Biosurfactants (pp. 171-187). https://doi.org/10.1007/978-3-031-31230-4_8

Pinilla, G. D., Manriquez, E. F., Caballero, A. J., Gómez, E., Marín, L. R., Portilla, Álvaro, Sierr-Avenida, J. A. (2014). *Neurotoxicología de plaguicidas prevalentes en la región Andina Colombiana*. Médicas UIS, 27(3), 57–67. Recuperado a partir de <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistamedicasuis/article/view/4885>

Nie, M., Yin, X., Ren, C., Wang, Y., Xu, F., & Shen, Q. (2010). *Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium pseudomonas aeruginosa strain NY3*. Biotechnology Advances, 28(5), 635-643. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.05.013>

Nwaguma, I. V., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016). *Isolation, characterization, and application of biosurfactant by Klebsiella pneumoniae strain IVN51 isolated from hydrocarbon-polluted soil in Ogoniland, Nigeria*. Bioresources and Bioprocessing, 3(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-016-0118-4>

Pagadoy, M., Peypoux, F., & Wallach, J. (2005). *Solid-Phase synthesis of surfactin, a powerful biosurfactant produced by Bacillus subtilis, and of four analogues*. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 11(3), 195-202. <https://doi.org/10.1007/s10989-005-6790-4>

Panijjar, N., Sachan, S. & Sachan, A. (2017). *Biosurfactants: A Multifunctional Microbial Metabolite*. *Microbial Applications*. 2, 1-17, 2020, Octubre 19, De Springer International Publishing Base de Datos

Pearson, J. (1997). *Roles of Pseudomonas aeruginosa las and rhl quorum sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis*. J Bacteriology 179: 5756-5767.

Pegg, K. G., Coates, L. M., O'Neill, W. T., & Turner, D. W. (2019). *The epidemiology of Fusarium wilt of banana*. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01395>

Plaza, G., Zjawiony, I. & Banat, I. (2006). *Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils*. Septiembre 15, 2020, de *Journal of Petroleum Science and Engineering Base de Datos*

Pontón, J. (2008). *La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina*. *Reviberoammicol.com*. <http://www.reviberoammicol.com/2008-25/078082.pdf>

Prtr-España. (2022). *Pentaclorofenol (PCP) | PRTR España*. <https://prtr-es.es/Pentaclorofenol-PCP,15636,11,2007.html#:~:text=A%20efectos%20de%20una%20exposici%C3%B3n,t%C3%B3xicos%20en%20la%20reproducci%C3%B3n%20humana>.

Rahman, P. & Gakpe, E. (2008). *Production, Characterization and Applications of Biosurfactants Review*. *Asian Network for Scientific Information*, 2, 10. 2020, Septiembre 26, De *ANSInet Base de datos*.

Ray, M., Kumar, V., & Banerjee, C. (2022). *Kinetic modelling, production optimization, functional characterization and phyto-toxicity evaluation of biosurfactant derived from crude oil biodegrading pseudomonas SP*. *IITISM 19. Journal of environmental chemical engineering*, 10(2), 107190. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107190>

Reacciones de precipitación. (2015, Febrero 26). *Khan Academy*. <https://es.khanacademy.org/science/ap-chemistry/chemical-reactions-ap/types-of-chemical-reactions-ap/v/chem09-precipitation-reactions#:~:~s%23%B3n>

Revathi, K., Meghana, G., Anuradha, S., & George, K. S. (2022). *Understanding mechanisms underlying genes regulating the production of biosurfactant*. Elsevier eBooks (pp. 649-663). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85146-6.00035-8>

Rahman, K. S., Rahman, T., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., & Banat, I. M. (2003). *Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients*. *Bioresource Technology*, 90(2), 159-168. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(03\)00114-7](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(03)00114-7)

Ribeiro, B. G., Santos, M. M. D., Da Silva, I. A., Meira, H. M., De Medeiros, A. O., Guerra, J. M. C., & Sarubbo, L. A. (2020). *Study of the biosurfactant production by Saccharomyces cerevisiae URM 6670 using agroindustrial waste*. *Chemical engineering transactions*, 79, 61-66. <https://doi.org/10.3303/cet2079011>

Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2001). *Natural Roles of Biosurfactants*. *minireview*. *Environmental Microbiology*, 3(4), 229-236. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x>

Roy, A. (2017). *A Review on the Biosurfactants: Properties, Types and its Applications*. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*, 8, 5. 2020, Octubre 15, De LongDom Open Access Base de Datos

Saimmai, A., Tani, A., Sobhon, V., & Maneerat, S. (2012). *Mangrove sediment, a new source of potential biosurfactant-producing bacteria*. *Annals of Microbiology*, 62(4), 1669-1679. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0424-9>

Santos, D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V. & Sarubbo, L. (2016). *Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 1-31, 2020, Octubre 18, De MDPI Base de Datos

Santos, O. (2017) *Detección e Identificación de Biosurfactantes y/o Bioemulsificantes producidos por Aislados Bacterianos asociados a una Fosa Petrolera de la Faja Petrolífera del Orinoco*. Facultad de Ciencias de la UCV, Caracas, Venezuela.

Sarubbo, L. A., Da Gloria C Silva, M., Durval, I. J. B., Bezerra, K. G. O., Ribeiro, B. G., Silva, I. A., Twigg, M. S., & Banat, I. M. (2022). *Biosurfactants: production, properties, applications, trends, and general perspectives*. *Biochemical Engineering Journal*, 181, 108377. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377>

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Gobierno. Sitio web: Gob.mx. (2022). <https://www.gob.mx/agricultura>

SEMINIS. (2015) *¿Qué Son Los Fitopatógenos?* Enero 17, 2020, de Seminis de BAYER Sitio web: <https://www.seminis.mx/blog-que-son-los-fitopatogenos/>

Serrano, L. & Galindo, E. (2007, Marzo). *Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario*. *Revista Mexicana de Ciencias del CONACYT*, 58, -.

Seydlová, G. & Svobodová, J. (2008). *Review of Surfactin chemical properties and the potential biomedical applications*. *Open Medicine*, 3(2), 123-133. <https://doi.org/10.2478/s11536-008-0002-5>

Shah, N., Nikam, R., Gaikwad, S., Sapre, V. & Kaur, J. (2016). *Biosurfactant: Types, Detection Methods, Importance and Applications*. *Indian Journal of Microbiology* 3(1), 5-10, 2020, Octubre 19, De Innovative Publication Base de Datos

Sharma, D. (2016). *Classification and Properties of Biosurfactants*. *SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition* Base de Datos

Sharma, J., Sundar, D., & Srivastava, P. (2021). *Biosurfactants: potential agents for controlling cellular communication, motility, and antagonism*. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.727070>

Siegmund, I., & Wagner, F. (1991). *New method for detecting rhamnolipids excreted by Pseudomonas species during growth on mineral agar*. *Biotechnology Techniques*, 5(4), 265-268. <https://doi.org/10.1007/bf02438660>

Singh, P., Patil, Y. & Rale, V. (2018). *Biosurfactant Production: Emerging Trends and Promising Strategies*. *Journal of Applied Microbiology*, 126, 13. 2020, Septiembre 17, De Society for Applied Microbiology Base de datos

Singh, A. K., Rautela, R., & Cameotra, S. S. (2014). *Substrate dependent in vitro antifungal activity of bacillus SP strain AR2*. *Microbial Cell Factories*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-67>

Soberón, G., González, A., Soto, M. P., & Cocotl, M. (2020). *Rhamnolipids produced by Pseudomonas: From Molecular Genetics to the Market*. *Microbial biotechnology*, 14(1), 136-146. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13700>

Somoza, G., Wong, A., Blanco, C., & Yañez, G. (2016). *Selección de bacterias nativas del estado de Chiapas, productoras de biosurfactantes a partir de aceite usado de cocina*. *Mexican journal of biotechnology*, 1(2), 57–66. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2016.1.2.57>

Somoza, G., Wong, A., Blanco, C., Pérez, B. Y., Mora, M. E., Mora, S. I., Rivas, R. R., De La Portilla, N., Lugo, J., Vaca, R., Del Águila, P., & Yañez, G. (2020). *A bacterial strain of Pseudomonas aeruginosa B0406 pathogen opportunistic, produce a biosurfactant with tolerance to changes of pH, salinity and temperature*. *Microbial Pathogenesis*, 139, 103869. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103869>

Sun, S., Wang, Y., Zang, T., Wei, J., Wu, H., Wei, C., Qiu, G., & Li, F. (2019). A biosurfactant-producing *pseudomonas aeruginosa* S5 isolated from coking wastewater and its application for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 281, 421-428. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.087>

Van Bogaert, I., Zhang, J. & Soetaert, W. (2011). *Microbial synthesis of sophorolipids*, *Process Biochemistry*, 46(4). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.010>

Yuan, D. P., Xu, X., Hong, W. J., Wang, S. T., Jia, X., Liu, Y., Li, S., Li, Z. M., Qi-Zhong, S., Mei, Q., Li, S., Jung, K., Wei, S., & Xuan, Y. (2020). *Transcriptome analysis of rice leaves in response to Rhizoctonia solani infection and reveals a novel regulatory mechanism*. *Plant Biotechnology Reports*, 14(5), 559-573. <https://doi.org/10.1007/s11816-020-00630-9>

Zaragoza, O. (2018). *Los hongos microscópicos, ¿amigos o enemigos?* Ministerio de Ciencia e Innovación de España