

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

INFORME DE INVESTIGACIÓN
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

Biosurfactante producido por *Bacillus Spp.* aislados de suelo camaronero y su efecto sobre la biorremediación de fondos de piscinas acuícolas

Autores:

Patricia Alexandra Inca Gualacio

Diego Mauricio Salazar Zambrano

Director:

Mgs. Rafael Seleyman Lazo Sulca PhD.

Milagro, 2024

Derechos de autor

**Sr. Dr.
Fabricio Guevara Viejó**
Rector de la Universidad Estatal de Milagro
Presente.

Yo, Patricia Alexandra Inca Gualacio y Diego Mauricio Salazar Zambrano en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de Magíster en Biotecnología, como aporte a la Línea de Investigación Promoción del Desarrollo Económico: Economía Verde de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Proyecto de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 22 de mayo de 2024



Firmado electrónicamente por:
**PATRICIA ALEXANDRA
INCA GUALACIO**

Patricia Alexandra Inca Gualacio
C.I.: 0604957324



Firmado electrónicamente por:
**DIEGO MAURICIO
SALAZAR ZAMBRANO**

Diego Mauricio Salazar Zambrano
C.I.: 0604318626

Aprobación del tutor del trabajo de titulación

Yo, Rafael Seleyman Lazo Sulca en mi calidad de director del trabajo de titulación, elaborado por Patricia Alexandra Inca Gualacio y Diego Mauricio Salazar Zambrano, cuyo tema es “Biosurfactante producido por *Bacillus Spp.* aislados de suelo camaronero y su efecto sobre la biorremediación de fondos de piscinas acuícolas”, que aporta a la Línea de Investigación Promoción del Desarrollo Económico: Economía Verde, previo a la obtención del Grado Magíster en Biotecnología. Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo APRUEBO, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 22 de mayo de 2024



Mgs. Rafael Seleyman Lazo Sulca PhD.

C.I.: 0918859687

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
DIRECCIÓN DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. INCA GUALACIO PATRICIA ALEXANDRA**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "BIOSURFACTANTE PRODUCIDO POR BACILLUS SPP. AISLADOS DE SUELO CAMARONERO Y SU EFECTO SOBRE LA BIORREMEDIACIÓN DE FONDOS DE PISCINAS ACUÍCOLAS", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	60.00
SUSTENTACIÓN	39.17
PROMEDIO	99.17
EQUIVALENTE	Excelente



Firmado electrónicamente por:
**DENIS DARIO MENDOZA
CABRERA**

Mgti. MENDOZA CABRERA DENIS DARIO
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
**DENNY WILLIAM
MORENO CASTRO**

Mgs MORENO CASTRO DENNY WILLIAM
VOCAL



Firmado electrónicamente por:
**ALEXANDRA GABRIELA
VALENZUELA COBOS**

VALENZUELA COBOS ALEXANDRA GABRIELA
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
DIRECCIÓN DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. SALAZAR ZAMBRANO DIEGO MAURICIO**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "BIOSURFACTANTE PRODUCIDO POR BACILLUS SPP. AISLADOS DE SUELO CAMARONERO Y SU EFECTO SOBRE LA BIORREMEDIACIÓN DE FONDOS DE PISCINAS ACUÍCOLAS", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	60.00
SUSTENTACIÓN	40.00
PROMEDIO	100.00
EQUIVALENTE	Excelente



Firmado electrónicamente por:
**DENIS DARIO MENDOZA
CABRERA**

Mgti. MENDOZA CABRERA DENIS DARIO
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
**DENNY WILLIAM
MORENO CASTRO**

Mgs MORENO CASTRO DENNY WILLIAM
VOCAL



Firmado electrónicamente por:
**ALEXANDRA GABRIELA
VALENZUELA COBOS**

VALENZUELA COBOS ALEXANDRA GABRIELA
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

Dedicatoria

Este trabajo de titulación lo dedicamos a Dios, ya que gracias a él hemos logrado concluir satisfactoriamente el programa de Maestría, a nuestros padres que son la motivación más grande que Dios pudo concedernos, que con su ejemplo, apoyo incondicional y amor infinito nos han forjado y guiado siempre, quienes nos han inculcado que con esfuerzo y dedicación se puede lograr todo en la vida.

Patricia Alexandra Inca Gualacio

Diego Mauricio Salazar Zambrano

Agradecimientos

Nuestro más grande agradecimiento a Dios, por la fuerza y constancia para que nuestras metas y anhelos sean alcanzados a lo largo del tiempo y por esta nueva oportunidad de crecimiento profesional.

A nuestra familia por ser ese apoyo y motivación como pilares fundamentales en nuestras vidas.

A nuestro excelente tutor por toda su confianza, compromiso y conocimientos impartidos a lo largo de este tiempo para culminar este trabajo de titulación.

*Patricia Alexandra Inca Gualacio
Diego Mauricio Salazar Zambrano*

Resumen

Con el fin de obtener una estrategia favorable para los productores acuícolas y amigable con el ambiente en la degradación de materia orgánica, se realizó la producción de biosurfactante con microorganismos autóctonos, aislados mediante un análisis microbiológico del suelo o fondo de una de las piscinas camaroneras de La Cooperativa de Productores Agropecuarios del Sur. "COOPAS", ubicado en la provincia de El Oro, sector de Arenillas vía a la Cuca, se tomó muestras del suelo para aislar cepas de *Bacillus spp.* con capacidad de producir biosurfactante que posteriormente fue evaluado en la biorremediación del mismo suelo, considerando que, debido a la acumulación de restos de alimento balanceado y excreta de los animales, los fondos acuícolas suelen presentar una capa fina de grasa que afecta la velocidad de biorremediación propia del suelo. La presente investigación abarcó las etapas de aislamiento, selección de la cepa, producción del biosurfactante, caracterización del biosurfactante y evaluación de su efecto en la biorremediación de suelos acuícolas. Para esta investigación, se escogió la cepa denominada como Morfotipo #1, pues esta dio el mejor resultado en la prueba de actividad hemolítica, el análisis estadístico concluyó que la producción del biosurfactante no se vio afectada por la fuente de carbono y finalmente, la evaluación del biosurfactante en la biorremediación del suelo tuvo resultados satisfactorios, ya que, logró acelerar la degradación de materia orgánica, mejorar la relación C/N y favorecer el crecimiento de microbiota nativa, en un tiempo de evaluación de 14 días.

Palabras clave: Acuicultura, Microorganismos, Biotecnología

Abstract

In order to obtain a favorable strategy for aquaculture producers and friendly to the environment in the degradation of organic matter, the production of biosurfactant was carried out with native microorganisms, isolated through a microbiological analysis of the soil or bottom of one of the shrimp ponds. of the Cooperative of Agricultural Producers of the South. "COOPAS", located in the province of El Oro, sector of Arenillas via Cuca, soil samples were taken to isolate strains of *Bacillus spp.* with the capacity to produce biosurfactant that was subsequently evaluated in the bioremediation of the same soil, considering that, due to the accumulation of remains of balanced feed and animal excreta, aquaculture beds usually present a thin layer of fat that affects the speed of bioremediation . own of the soil. The present investigation covered the stages of isolation, strain selection, production of the biosurfactant, characterization of the biosurfactant and evaluation of its effect on the bioremediation of aquaculture soils. For this research, the strain called Morphotype #1 was chosen, since it gave the best result in the hemolytic activity test, the statistical analysis concluded that the production of the biosurfactant was not affected by the carbon source and finally, the evaluation . of the biosurfactant in soil bioremediation had satisfactory results, since it managed to accelerate the degradation of organic matter, improve the C/N ratio and promote the growth of native microbiota, in an evaluation time of 14 days. Obligatorio, es el mismo resumen redactado en inglés y tiene las mismas características del resumen.

Key-words: Aquaculture, Microorganisms, Biotechnology

Lista de figuras

Figura 1. Perfil de COOPAS	21
Figura 2. Área de Piscina # 14 COOPAS.....	23
Figura 3. Procedimiento de extracción del biosurfactante.....	26
Figura 4. ANOVA de 1 factor	30
Figura 5. Prueba de comparación múltiple Tukey.....	31
Figura 6. Morfotipos resultantes de la siembra de la suspensión madre	32
Figura 7. Identificación microscópica de los morfotipos	32
Figura 8. Actividad hemolítica producida por el Morfotipo #1 y Morfotipo #3	33
Figura 9. Evaluación del efecto de aplicación del biosurfactante para la biorremediación del suelo acuícola.....	36

Lista de tablas

Tabla 1. Declaración de las variables.....	4
Tabla 2. Coordenadas de COOPAS.....	22
Tabla 3. Composición del Medio Líquido para la producción de Biosurfactante.....	25
Tabla 4. Condiciones de cultivo para la producción de biosurfactante	26
Tabla 5. Métodos analíticos para la caracterización del suelo	28
Tabla 6. Descripción de los tratamientos usados para la evaluación del efecto biorremediador del biosurfactante sobre el suelo camaronero	28
Tabla 7. Elementos del diseño factorial.....	29
Tabla 8. Resultados de la caracterización del biosurfactante.....	34
Tabla 9. Resultados del efecto del biosurfactante en la biorremediación del suelo...35	

Índice

Derechos de autor	i
Aprobación del tutor del trabajo de titulación	ii
Certificación de la defensa	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Resumen	vi
Abstract	vii
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	ix
Introducción	1
CAPÍTULO I: El problema de la investigación	2
1.1 Planteamiento del problema	2
1.2 Delimitación del problema.....	2
1.3 Formulación del problema	3
1.4 Preguntas de investigación.....	3
1.5 Determinación del tema.....	3
1.6 Objetivo general	4
1.7 Objetivos específicos.....	4
1.8 Hipótesis.....	4
1.9 Declaración de las variables (operacionalización).....	4
1.10 Justificación.....	4
1.11 Alcance y limitaciones	5
CAPÍTULO II: Marco teórico referencial.....	6
2.1 Antecedentes	6
2.2 Contenido teórico que fundamenta la investigación.....	8
2.2.1 Surfactantes	8
2.2.2 Aplicación de los biosurfactantes	9
2.2.3 Biosurfactantes	11
2.2.4 Caracterización de los biosurfactantes.....	12
2.2.5 Suelos Acuícolas.....	15
2.2.6 Biorremediación de fondos acuícolas.....	17
2.2.7 Microorganismo en la acuicultura.....	18
CAPÍTULO III: Diseño metodológico.....	21
3.1 Tipo y diseño de investigación.....	21

3.2	Población y muestra	21
3.2.1	Características de la población	21
3.2.2	Delimitación de la población.....	21
3.2.3	Tipo de muestra	22
3.2.4	Tamaño de la muestra	22
3.2.5	Proceso de selección de la muestra.....	23
3.3	Métodos y técnicas.....	24
3.3.1	Obtención del biosurfactante.....	24
3.3.2	Caracterización del biosurfactante	26
3.3.3	Aplicación en la biorremediación de fondos de piscinas acuícolas	27
3.4	Procesamiento estadístico de la información.....	29
3.4.1	Declaración de las variables	29
3.4.2	ANOVA	29
CAPÍTULO IV: Análisis e interpretación de resultados.....		32
4.1	Análisis de los resultados	32
4.1.1.	Aislamiento e identificación de <i>Bacillus spp</i>	32
4.1.2.	Producción y caracterización del biosurfactante.....	33
4.1.3.	Evaluación del biosurfactante en la biorremediación del suelo	35
4.2	Interpretación de los resultados.....	36
CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones		37
5.1	Conclusiones.....	37
5.2	Recomendaciones.....	37
Bibliografía.....		39

Introducción

Hoy en día, el cultivo de camarón en el Ecuador, es una actividad que tiene un crecimiento muy acelerado y año a año las libras de este crustáceo que se cultivan en el país van en aumento. El incremento del cultivo de camarón en nuestro país no solo se debe a la expansión de las tierras para la producción camaronera sino también al incremento de las densidades de siembra, con lo cual se ve una realidad de tener en sus inicios la mayoría de camaroneras en forma de cultivo extensivo a cultivos semi-intensivos e intensivos, y algunos empresarios camaroneros más arriesgados están dando un paso más grande en los cultivos súper intensivos.

Las sustancias tensioactivas son moléculas que tienden a disminuir o menorar la tensión superficial entre los fluidos, también tienen la capacidad de orientarse en la interfaz de dos compuestos inmiscibles. Los biosurfactantes son compuestos orgánicos que tienen propiedades hidrófilas e hidrófobas. Los dominios hidrófilos suelen ser de carbohidratos, aminoácidos y grupos fosfato. Los dominios hidrófobos suelen pertenecer a grasas de cadena larga. Su producción tiene origen de forma extracelularmente o como parte de las membranas celulares por una variedad de levaduras, bacterias y hongos filamentosos de diversas fuentes, incluidos azúcares, aceites y desechos.

En el ámbito de la acuicultura, los biosurfactantes pueden tener efecto en la biorremediación de suelos de piscinas de crianza de camarón ya que estos suelen tener una acumulación de materia orgánica con presencia de una capa superficial de grasa producto de la acumulación de restos de alimento balanceado o excreta de los animales.

La presente investigación se fundamenta en la búsqueda de una alternativa sostenible a la biorremediación de suelos acuícolas, garantizando la conservación de los ecosistemas y la integridad del patrimonio genético del Ecuador por medio de la utilización de consorcios microbianos autóctonos para el tratamiento de los suelos.

CAPÍTULO I: El problema de la investigación

1.1 Planteamiento del problema

La materia orgánica que se genera en los cultivos de camarón se deposita en el fondo de las piscinas acuícolas, esta es uno de los mayores problemas de los productores, ya que trae algunos inconvenientes como la disminución de oxígeno disponible en el agua y el aumento de las poblaciones microbianas patógenas, esto está relacionado con el desequilibrio ambiental y el incremento de enfermedades infecciosas en los cultivos, producto del desarrollo de este tipo de industrias debido a la intensificación de las densidades de siembra y técnicas de los cultivos. A pesar del aumento de áreas para camaroneras en el Ecuador, los cultivos se ven afectados con alta concentración de materia orgánica. Este es un problema que ya se ha venido presentando desde tiempo muy atrás y hoy en día existen formas amigables de tratarlo, ya que haciendo una comparación entre los tratamientos actuales que se aplican a los suelos de las piscinas con los que anteriormente se les daba, el porcentaje de materia orgánica de estos ha disminuido radicalmente, ya que antes las cantidades de materia orgánica (lodo) eran muy superiores a los que hoy se pueden presentar al final de cada corrida.

Uno de los problemas que se tiene con el incremento de las densidades de cultivo es el de la generación de materia orgánica en el fondo de las piscinas acuícolas, esto se debe a que, con el aumento de número de animales, la cantidad de balanceado a ser suministrado subiría exponencialmente y con él también la cantidad de desperdicios y excretas. Hoy en día existen diferentes formas para remediar los desperdicios y es de mucha importancia ya que si no se los trata a su debido tiempo estos provocarían graves problemas en los cultivos, generalmente con el aumento de materia orgánica lo que principalmente se evidencia es el incremento de las enfermedades, debido a que los microorganismos patógenos que las causan aumentan, ya que están en el medio indicado para poder proliferar de manera descontrolada como son los *Vibrios spp.*

1.2 Delimitación del problema

El cultivo de camarón es una de las industrias más prometedoras y de más rápido crecimiento en Ecuador, esta industria manufacturera del país abarca un área

de 210000 hectáreas aproximadamente en las provincias costeras del país, teniendo así un gran impacto en el medio ambiente. Para el presente proyecto se determinó en base a bibliografía que en los suelos de piscinas camaroneras o también conocidos como fondos acuícolas están presentes bacterias que por sus condiciones se encargan de degradar la materia orgánica. Uno de los mayores problemas del cultivo de camarón es el aumento de desperdicios debido al incremento de las dietas alimenticias que se da a estos crustáceos en cultivo y a la cantidad de heces que este produce con las densidades que se está sembrando, por lo cual el tratamiento de la materia orgánica (sedimentos) es de gran importancia debido a que si no se tratan de una manera adecuada y tiempo el cultivo de camarones se alteraría y con eso traería un sin número problemas a los cultivos.

1.3 Formulación del problema

En los cultivos acuícolas de camarón se observa la falta de una estrategia que permita acelerar la descomposición de la materia orgánica que ejerce una alta demanda de oxígeno.

Esta materia en grandes cantidades puede conducir al agotamiento del oxígeno disuelto de la piscina muy rápidamente por lo que, esto es preocupante para la producción, ya que se genera estrés y vulnerabilidad a patógenos, lo que afecta a la producción y rentabilidad de esta industria.

1.4 Preguntas de investigación

- ¿Cuál es la característica del suelo de las piscinas de crianza de camarón?
- ¿Cuál es la técnica para tratar y recuperar los suelos de las piscinas de crianza de camarón?
- ¿Afecta la fuente de carbono en la producción de biosurfactante?
- ¿Un biosurfactante tiene efecto de acelerar la biorremediación de fondos acuícolas?

1.5 Determinación del tema

Biosurfactante producido por *Bacillus spp.* aislados de suelo camaronero y su efecto sobre la biorremediación de fondos de piscinas acuícolas.

1.6 Objetivo general

Obtener un biosurfactante con efecto acelerador en la degradación y biorremediación de lodos que constituyen los fondos acuícolas.

1.7 Objetivos específicos

- Aislar y seleccionar una cepa de *Bacillus spp.* con capacidad de producir biosurfactantes.
- Producir un biosurfactante en un medio de cultivo variando la fuente de carbono.
- Caracterizar el biosurfactante obtenido teniendo en cuenta las propiedades que debe poseer un tensioactivo.
- Formular una estrategia para lograr una rápida degradación de materia orgánica en los suelos de piscinas camaroneras.

1.8 Hipótesis

La aplicación de biosurfactante acelera el proceso para la degradación de materia orgánica en las muestras de fondos acuícolas.

1.9 Declaración de las variables (operacionalización)

Tabla 1. Declaración de las variables

Variable	Dependiente	Independiente
Morfotipo de cepa		X
Fuente de carbono		X
Cantidad de biosurfactante obtenido	X	

1.10 Justificación

La utilización de microorganismo benéficos para el uso en la biorremediación de los suelos de piscinas acuícolas es de mucha importancia, debido a que al tener una buena calidad de agua y suelo en las piscinas los animales podrán crecer o ganar peso de una manera idónea y las sobrevivencias serán mayores. Las consecuencias que nos dan un medio inadecuado de cultivo son: enfermedades las cuales

disminuiría las poblaciones en los estanques acuícolas y en algunos casos los crecimientos serían muy lentos y de esa manera nuestro factor de conversión acuícola FCA subiría y las ganancias que se obtendría no serían las mejores.

La materia orgánica que se almacena en el fondo de las piscinas acuícolas es uno de los mayores problemas que trae consigo el aumento de patógenos, aunque es un problema que ya se ha venido presentando desde tiempo hoy en día ya se lo ha podido solucionar en su mayor parte, ya que comparando los tratamientos que se le dan a los suelos de las piscinas con los que anteriormente se les daba la cantidad de estos ha disminuido radicalmente, ya que antes los niveles de materia orgánica (lodo) eran muy superiores a los que hoy se pueden presentar al final de cada cosecha.

1.11 Alcance y limitaciones

El presente trabajo llegó a término en la identificación de cómo afecta la aplicación de biosurfactante en la muestra de suelo acuícola que poseen un excesivo porcentaje de materia orgánica y grasas producto de los restos de alimentos y heces del camarón, las limitaciones son el tiempo y recursos económicos

CAPÍTULO II: Marco teórico referencial

2.1 Antecedentes

En la investigación de Badrul et al. (2019) investigó la producción de biosurfactante utilizando aceite de cocina usado (UCO) como materia prima renovable, a través de un aislado local de *Bacillus sp.* HIP3, con el propósito de eliminar metales pesados. *Bacillus sp.* HIP3, un aislado Gram positivo, demostró la capacidad de producir un biosurfactante con una tensión superficial mínima de 38 mN/m después de 7 días de cultivo en un medio de sal mineral con un 2% (v/v) de UCO, a una temperatura de 30°C y agitación a 200 rpm.

Mediante un método de extracción utilizando cloroformo: metanol (2:1) como solventes, se obtuvo un rendimiento máximo de biosurfactante de 9,5 g/L. El análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) confirmó que el biosurfactante producido por *Bacillus sp.* HIP3 consistía en un lipopéptido similar a la surfactina estándar.

Además, se demostró que este biosurfactante tenía la capacidad de eliminar significativamente el cobre, plomo, zinc, cromo y cadmio del agua contaminada artificialmente, con un potencial prometedor para la biorremediación.

En la revisión sistemática de Hlordzi et al. (2020) investigó sobre el papel de *Bacillus sp.* en la modulación de la calidad del agua, abordando parámetros físicos y químicos, así como la reducción de microbios patógenos y la gestión de metales pesados y derrames de petróleo.

La eficacia de *Bacillus sp.* en esta tarea está influenciada por varios factores, como el método de aplicación, el entorno físico y químico, la fuente de nutrientes y la cepa específica utilizada. La revisión también explora las actividades acuícolas que pueden provocar contaminación y los posibles mecanismos empleados por *Bacillus sp.* para mejorar la calidad del agua y suelo.

Se sugiere la identificación de condiciones óptimas para maximizar la eficiencia de *Bacillus sp.* en esta función, así como un mayor conocimiento genético de estos microorganismos y el desarrollo de herramientas genéticas para mejorar su capacidad de modulación de la calidad del agua y suelo.

En la investigación de Gogoi et al. (2022) desarrolló un sistema de biopelículas basado en *Bacillus albus* (ASSF01) para eliminar el amoníaco de las aguas residuales de la acuicultura, superando las limitaciones de los métodos de tratamiento convencionales.

Este microorganismo formó biopelículas estructuradas rápidamente, lo que se demostró mediante diversas técnicas de análisis. La inmovilización de ASSF01 en biopelículas permitió un rápido desarrollo del sistema, con un tiempo de generación de 15 minutos y 36 segundos. La optimización del tratamiento de las aguas residuales en un reactor de biopelícula reveló una concentración óptima de amoníaco (3,2 mg/L), nitrato (6,89 mg/L) y fosfato (1,17 mg/L) en el afluente, que se reduciría al nivel requerido por la acuicultura con un tiempo de retención hidráulica de 14 horas.

Durval et al. (2020) investigó el cultivo de *Bacillus cereus* en un medio mineral que contenía aceite para freír y peptona, con el objetivo de producir un biosurfactante. La producción se llevó a cabo en biorreactores de diferentes tamaños, desde matraces hasta un biorreactor de 50 L, logrando una disminución en la tensión superficial y un aumento en la concentración de biosurfactante a medida que aumentaba el volumen del biorreactor.

El biosurfactante producido fue identificado como aniónico y de naturaleza lipopeptídica mediante diversas técnicas de análisis. Las pruebas de toxicidad realizadas en peces y bivalvos demostraron una alta tasa de supervivencia, indicando la posibilidad de usar este biosurfactante en la descontaminación del medio marino.

Además, se observó que el biosurfactante estimuló el crecimiento de microorganismos autóctonos en bioensayos realizados en agua de mar, incluso en presencia de aceite de motor.

Irigoin (2021) realizó una revisión bibliográfica, en donde encontró que el grupo de *Bacillus*, particularmente las cepas bacterianas Gram positivas, se destaca como el principal candidato para la producción de biosurfactantes, siendo *Bacillus subtilis* la cepa más utilizada, según lo señalado en el estudio.

Estas bacterias influyen significativamente en las características fisicoquímicas del suelo contaminado por metales pesados, como el pH, la capacidad de retención de agua, la actividad deshidrogenasa y el carbono orgánico total.

La presencia de biosurfactantes altera estas propiedades, afectando la actividad enzimática y la liberación de moléculas reguladoras o inhibidoras. La relación entre los parámetros del suelo y la presencia de biosurfactantes muestra un impacto positivo en la biorremediación del suelo, donde la disminución o aumento de los parámetros indica la eficacia del biosurfactante producido por *Bacillus sp.*

Es importante destacar que los biosurfactantes elaborados por cepas bacterianas Gram positivas exhiben una mayor capacidad de remoción de metales pesados en comparación con los producidos por bacterias Gram negativas, con tasas de remoción que varían entre el 50% y el 80% y entre el 20% y el 50%, respectivamente.

2.2 Contenido teórico que fundamenta la investigación

2.2.1 Surfactantes

Los surfactantes son compuestos orgánicos que constan de dos partes químicas con polaridades diferentes: un grupo cabeza con afinidad por fases polares y un grupo cola que se ve atraído por fases no polares (Shaban et al., 2020).

Dada su estructura única, los surfactantes tienen una amplia gama de aplicaciones para disminuir la tensión superficial e interfacial entre dos o más fases, poseen la capacidad para formar estructuras auto ensambladas en solución puede resultar en la creación de micelas de diferentes tamaños, desde nanómetros hasta micras. Debido a su naturaleza anfifílica, son apropiados para una variedad de aplicaciones industriales, incluyendo el desarrollo de medicamentos (Zhang et al., 2019).

2.2.1.1 Surfactantes Sintéticos

Los surfactantes sintéticos son compuestos químicos fabricados artificialmente que tienen propiedades similares a los surfactantes naturales. Estos compuestos se utilizan en una variedad de aplicaciones industriales y de consumo, como productos

de limpieza, cosméticos, detergentes, productos farmacéuticos y agrícolas, entre otros. Su diseño y síntesis se realizan con el propósito de cumplir con requisitos específicos de rendimiento y aplicación, ofreciendo ventajas como estabilidad, eficacia y control sobre sus propiedades físico-químicas (Da Silva & Sarubbo, 2022).

Los surfactantes sintéticos, debido a su baja biodegradabilidad, tienden a ser persistentes en el medio ambiente. Esto significa que pueden permanecer en el entorno durante períodos prolongados de tiempo sin descomponerse completamente, lo que puede plantear preocupaciones sobre su impacto a largo plazo en los ecosistemas acuáticos y terrestres (Johnson et al., 2021).

2.2.1.2 Surfactantes Naturales o Biológicos

Los surfactantes naturales son compuestos orgánicos que se encuentran en la naturaleza y desempeñan funciones importantes en varios organismos y procesos biológicos. Estos surfactantes son producidos por plantas, animales y microorganismos, y pueden incluir lípidos, proteínas y carbohidratos (Abo, 2021).

Ejemplos comunes de surfactantes naturales incluyen fosfolípidos como los encontrados en las membranas celulares, así como también las saponinas presentes en algunas plantas.

Estos compuestos tienen propiedades surfactantes que les permiten interactuar con interfaces entre diferentes fases, como el agua y el aceite, facilitando procesos como la emulsificación, la formación de espuma y la estabilización de dispersiones. Los surfactantes naturales son importantes en una variedad de aplicaciones industriales y biológicas, incluyendo la alimentación, la agricultura, la cosmética y la biotecnología (Jahan et al., 2020).

2.2.2 Aplicación de los biosurfactantes

2.2.2.1 Biorremediación

Las características únicas de los biosurfactantes, junto con su menor toxicidad, los convierten en una opción potencialmente más atractiva que los surfactantes sintéticos en diversas aplicaciones, como la biorremediación ambiental (Jahan et al., 2020).

En el ámbito de la biorremediación, las bacterias son organismos ampliamente empleados debido a su rápido tiempo de regeneración, su capacidad para aprovechar varios sustratos para su crecimiento y su tamaño reducido (Rodríguez, 2022). Los microorganismos poseen diversas capacidades metabólicas que les permiten utilizar una variedad de sustratos para obtener energía y, en ocasiones, transformarlos. El cadmio es uno de los metales pesados que pueden ser inmovilizados o transformados por estos organismos cuando actúa como sustrato (Castebianco, 2018).

Mishra et al. (2021) menciona que los biosurfactantes muestran una amplia variedad de estructuras químicas y presentan una amplia capacidad de unión a metales, lo que aumenta su eficacia en la eliminación de contaminantes. Poseen una afinidad particular por los metales pesados, formando complejos biosurfactante-metal que facilitan su remoción.

Además de reducir la tensión superficial, estos compuestos pueden formar micelas, mejorando así la biodisponibilidad y movilización de metales pesados en el medio ambiente contaminado. Microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, *Burkholderia sp.*, *Citrobacter freundii*, *Candida tropicalis* y *Candida sp.* han sido identificados como productores potenciales de biosurfactantes, demostrando una alta eficacia en la eliminación de metales pesados.

2.2.2.2 Industria de alimentos

Poseen actividad superficial, reduciendo la tensión interfacial y actúan como detergentes y emulsionantes. Algunos tienen propiedades antimicrobianas, útiles en la conservación de alimentos. Son biodegradables, poco tóxicos y compatibles con organismos vivos.

Un ejemplo notable es la surfactina, producida por *B. subtilis*. Estos tensioactivos pueden aplicarse en productos frescos como recubrimiento natural o desinfectante diluido en agua.

También pueden prevenir la formación de películas bacterianas. Se ha demostrado la eficacia de los tensioactivos biológicos para inhibir la adhesión y

formación de biopelículas en superficies como acero inoxidable y poliestireno (Cruz, 2022).

2.2.2.3 Cosméticos

Los biosurfactantes microbianos, como los glicolípidos, han encontrado un nicho en la industria cosmética, destacando entre ellos los lípidos de manosileritritol (MEL), producidos principalmente por diversas levaduras basidiomicetosas como *Pseudozyma*.

Estos compuestos han sido aplicados en diversos productos cosméticos para el cuidado de la piel, como la hidratación de la piel seca, así como en tratamientos capilares para reparar el cabello dañado (Moldes et al., 2021).

2.2.2.4 Agricultura

Los compuestos surfactantes biológicos son empleados en el ámbito agrícola con el propósito de erradicar agentes patógenos que afectan a las plantas de una manera antagónica, al mismo tiempo que incrementan la disponibilidad de nutrientes esenciales para los microorganismos beneficiosos del suelo.

La aplicación de biosurfactantes en la restauración de suelos agrícolas puede significativamente mejorar la calidad de los mismos. Cada año, alrededor de 0,2 millones de toneladas de tensioactivos son utilizados en formulaciones de pesticidas y en la protección de cultivos (Purwasena et al., 2019).

2.2.3 Biosurfactantes

Los biosurfactantes son compuestos tensioactivos producidos por microorganismos, principalmente bacterias y hongos, como parte de su metabolismo o en la superficie celular.

Estos microorganismos aerobios utilizan diversas fuentes de carbono, como hidrocarburos y polisacáridos, para sintetizar biosurfactantes como ramnolípidos, surfactinas y otros. Estos compuestos desempeñan funciones fisiológicas clave al permitir el crecimiento microbiano en sustratos insolubles, promover el crecimiento de la biomasa y proporcionar resistencia a condiciones adversas y patógenos (Fenibo et al., 2019).

El mecanismo de acción de los tensioactivos implica la formación de micelas en soluciones con una concentración suficiente de surfactante. Las cabezas hidrófilas de las moléculas de surfactante se orientan hacia el agua, mientras que las colas hidrófobas se agrupan en el núcleo de la micela, rodeando y atrapando contaminantes. Esto facilita la eliminación de suciedad y grasa de las superficies, ayudando a limpiarlas (Ni'matuzahroh et al., 2020).

Para aislar biosurfactantes, es crucial obtener cultivos puros de microorganismos productores. Los métodos de aislamiento incluyen el uso de cultivos de enriquecimiento en superficies hidrofóbicas y el empleo de medios de cultivo específicos, como el medio mínimo de sal.

Una vez obtenido el sobrenadante libre de células, se ajusta el pH y se realizan técnicas como la cromatografía de interacción hidrofóbica para obtener el biosurfactante crudo. Aunque este proceso puede ser laborioso y requiere examinar numerosos aislamientos, es una estrategia efectiva para identificar nuevas bacterias productoras de biosurfactantes (Gayathiri et al., 2022).

2.2.4 Caracterización de los biosurfactantes

Se llevan a cabo varias pruebas preliminares, como la actividad hemolítica, el método de la gota colapsada, la dispersión de aceite y el Índice de emulsificación, para verificar la actividad superficial de los compuestos.

Sin embargo, los resultados positivos o negativos de estas pruebas no son concluyentes para confirmar la presencia de compuestos que reduzcan la tensión superficial e interfacial. Por lo tanto, se requieren técnicas cuantitativas, como la medición de la tensión superficial e interfacial mediante tensiómetros (Figuroa, 2021).

2.2.4.1 Actividad hemolítica

La membrana de los glóbulos rojos está compuesta por lípidos (40%), proteínas (52%) y carbohidratos (8%), formando el citoesqueleto celular. La hemólisis por surfactantes puede ocurrir mediante solubilización de la membrana y lisis osmótica.

En la solubilización, los monómeros de surfactante interactúan con los lípidos, formando micelas mixtas. En la lisis osmótica, los monómeros perturban las interacciones lipídicas y proteicas, alterando la fluidez y permeabilidad de la membrana, lo que lleva a la entrada de iones y eventual lisis.

La resistencia de los glóbulos rojos a la hemólisis depende del tipo de surfactante, las condiciones de cultivo y el tipo de glóbulo rojo (Figuroa, 2021).

2.2.4.2 Actividad lipolítica

La actividad lipolítica se manifiesta cuando los microorganismos encuentran sustratos insolubles en agua, lo que desencadena la producción de lipasas y biosurfactantes. Estas enzimas y sustancias de naturaleza tensioactiva son esenciales para facilitar el contacto con estos compuestos, los cuales no pueden ser metabolizados directamente por los microorganismos.

En lugar de ello, requieren de la acción de las lipasas para hidrolizar los sustratos y prepararlos para su posterior degradación y asimilación. Para identificar microorganismos productores de lipasas, se emplea el método de la placa con agar rodamina B, donde, la detección de la actividad lipolítica se logra al irradiar las placas de cultivo con luz ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 350 nm.

Estas enzimas catalizan la hidrólisis de triglicéridos en componentes solubles como ácidos grasos, mono- y diglicéridos, en la interfaz aceite-agua, facilitando así su asimilación por parte de los microorganismos (Figuroa, 2021).

2.2.4.3 Gota colapsada

El método de la gota colapsada se basa en la capacidad de los surfactantes para desestabilizar las gotas líquidas en una superficie que contiene aceite, lo que está relacionado con la tensión superficial. Al agregar un sobrenadante sobre la superficie del aceite, si el líquido no contiene tensoactivos, las gotas permanecen estables debido a la repulsión de las moléculas de agua.

Sin embargo, si el líquido contiene biosurfactantes, las gotas se expanden hasta colapsar debido a la reducción de la tensión interfacial. La concentración de

tensoactivo influye en la estabilidad de las gotas y está correlacionada con la tensión superficial e interfacial (Figueroa, 2021).

2.2.4.4 Índice de emulsificación

El Índice de Emulsificación es una medida de la capacidad de estabilización de una emulsión, la cual requiere reducir la tensión superficial e interfacial entre dos fases. La evaluación de la actividad emulsificante consiste en la capacidad de una sustancia para estabilizar y formar una emulsión con una mezcla de sustancias inmiscibles.

Este índice se calcula mediante la división de la altura de la emulsión por la altura total de la columna de líquido, conocido como E24. Además de ser un método de detección de la producción de biosurfactantes, el E24 se correlaciona con la concentración de tensoactivo (Figueroa, 2021).

2.2.4.5 Baja toxicidad y biodegradabilidad

Los biosurfactantes han surgido como una alternativa preferida para la biorremediación debido a su bajo impacto ambiental en comparación con los tensoactivos sintéticos.

Aunque existen algunos informes limitados sobre los posibles efectos adversos de los biosurfactantes, se ha encontrado que los ramnolípidos tienen una concentración letal (CL50) aproximadamente diez veces mayor que la de los tensoactivos sintéticos cuando se evalúan contra *Photobacterium phosphoreum*.

Además, al analizar la toxicidad de los biosurfactantes, se observó que tienen una degradación más lenta en comparación con los surfactantes sintéticos, como el estearato de sacarosa.

Un estudio comparativo entre un surfactante sintético, Marlon A-350, y un biosurfactante producido por *Pseudomonas aeruginosa* reveló que el surfactante sintético mostró una alta toxicidad en todos los ensayos, mientras que el biosurfactante no mostró toxicidad (Gayathiri et al., 2022).

Un estudio indicó que el biosurfactante obtenido de *Candida sphaerica* demostró reducir la tensión superficial en semillas de *Brassica oleracea*, *Cichorium intybus* y *Solanum gilo*.

Por otro lado, el ramnolípido producido por *Pseudomonas aeruginosa* PG1 exhibió actividad citotóxica contra la línea celular L292, pero también se reconoce como una clase prometedora de biosurfactantes con propiedades antimicrobianas, lo que lo convierte en una opción valiosa para la biorremediación de suelos y derrames de petróleo (Santos et al., 2019).

Además, al analizar la aplicabilidad de la surfactina producida por *Bacillus subtilis* HSO121, se encontró que es un compuesto seguro, no tóxico y no irritante, lo que lo hace adecuado para su uso en formulaciones de detergentes (Fei et al., 2020).

2.2.5 Suelos Acuícolas

Los suelos acuícolas son esenciales en la práctica de la acuicultura, pues constituyen el lecho sobre el cual se desarrollan diversas actividades de cría y cultivo de organismos acuáticos. Su importancia radica en su capacidad para influir en la calidad del agua y proporcionar un hábitat adecuado para la vida acuática.

En primer lugar, actúan como filtros naturales, reteniendo partículas en suspensión y contribuyendo así a mejorar la transparencia del agua.

Además, desempeñan un papel crucial en la descomposición de la materia orgánica, gracias a la actividad de microorganismos presentes en el sustrato, lo que libera nutrientes esenciales y ayuda a mantener un equilibrio en la demanda de oxígeno.

Además, algunos organismos acuáticos encuentran en el suelo una fuente de alimento, como es el caso de las lombrices de tierra, enriqueciendo aún más la biodiversidad presente en estos ecosistemas acuáticos (FAO, 2020).

2.2.5.1 Características de los suelos acuícolas camaroneros

Los suelos acuícolas destinados a la producción de camarones presentan características específicas que los hacen idóneos para esta actividad. Estos suelos

suelen ser ricos en materia orgánica y nutrientes, proporcionando un ambiente propicio para el crecimiento y desarrollo de los camarones.

Además, suelen tener una textura adecuada, preferiblemente limo-arcillosa, que favorece la retención de agua y nutrientes necesarios para el cultivo (Krebs, 2019).

La humedad del suelo es crucial para la actividad biológica y la respiración del mismo. Los suelos anegados disminuyen la tasa de respiración al ocupar los espacios porosos, limitando la entrada de oxígeno atmosférico. Sin embargo, un exceso de agua también puede crear condiciones anaeróbicas. Por otro lado, una disminución excesiva de la humedad inhibe la actividad biológica.

La respiración del suelo es óptima cuando la humedad está entre el 60% y el 80% de su capacidad de retención. Esta varía según la textura del suelo y el tipo de arcilla presente.

Investigaciones en suelos de estanques de cultivo de bagre en Alabama y en suelos de estanques de cultivo de camarón en Honduras mostraron que la composición y el área superficial de las partículas de arcilla afectan la retención de agua y la disponibilidad para la actividad microbiana (Serrano, 2021).

El pH del suelo es fundamental para la vida acuática. Afecta el metabolismo y las funciones de los organismos. La mayoría de los suelos de acuicultura tienen un pH superior a 6,5, siendo ideal para la descomposición bacteriana entre 7 y 8. Sin embargo, cada especie de microorganismo tiene un pH óptimo particular para su actividad (Krebs, 2019).

2.2.5.2 Presencia de grasas y aceites en los suelos acuícola

La presencia de grasas y aceites en los suelos acuícolas puede tener varios impactos negativos en el medio ambiente acuático y en la producción acuícola. Estas sustancias pueden provenir de diferentes fuentes, principalmente de los residuos de alimentos para especies acuícolas y de la excreta de los animales, sin embargo, también pueden provenir de descargas industriales, vertidos de embarcaciones o derrames de equipos de pesca.

Cuando se depositan en los suelos acuícolas, las grasas y los aceites pueden formar una capa superficial que dificulta el intercambio de oxígeno entre el agua y el suelo, lo que puede provocar la muerte de organismos acuáticos por asfixia. Además, estas sustancias pueden contaminar los cultivos acuícolas, afectando su calidad y seguridad alimentaria (UNADM, 2020).

2.2.5.3 Materia orgánica en los fondos de las piscinas camaroneras

La producción de camarones mediante cualquier método conlleva la generación de materia orgánica, la cual se deriva del metabolismo del animal. Durante el proceso de producción en los estanques de camarones, se produce una significativa acumulación de materia orgánica.

Esta materia orgánica suele incluir residuos de fertilizantes, excrementos, desechos de camarones y fitoplancton fallecido, que se depositan en el fondo de los estanques en forma de sedimentos o lodos (Saúl, 2021). Esta materia orgánica tiende a acumularse en el fondo de los estanques, lo que puede causar daños al suelo circundante y aumentar la demanda de oxígeno en el agua (Muñoz, 2020).

El aumento de las densidades poblacionales en las piscinas acuícolas conlleva la acumulación de materia orgánica en el fondo, un problema que ha existido desde hace mucho tiempo. Sin embargo, en gran medida, este problema se ha abordado con éxito mediante tratamientos específicos en los suelos de las piscinas antes de la siembra.

Esta práctica ha resultado en una notable disminución en los niveles de materia orgánica al final de cada ciclo de cosecha, en comparación con los niveles anteriores a la implementación de estos tratamientos (Gavino, 2017).

2.2.6 Biorremediación de fondos acuícolas

La biorremediación de aguas residuales industriales con bacterias es una práctica común. Diversas cepas bacterianas, como endófitas, *Pseudomonas* y varios tipos de *Bacillus spp.*, se han utilizado para este propósito. Algunas bacterias participan en varios procesos del ciclo del nitrógeno, incluida la fijación de nitrógeno, la nitrificación, la denitrificación y la amonificación. Las bacterias *Nitrosomonas* y

Nitrobacter, en particular, son las principales responsables de la nitrificación y, ocasionalmente, de la desnitrificación (Liu et al., 2020).

Zhu et al., (2019) llevaron a cabo una evaluación del potencial de biorremediación de la bacteria *Marichromatium gracile* YL28, que fue aislada de manglares marinos. Esta bacteria demostró una efectiva capacidad para eliminar altas concentraciones de amonio y nitrito, al tiempo que evitaba la pérdida excesiva de nitrógeno debido a la desnitrificación, así como reducciones por asimilación de nitratos y amonio.

La remoción de estos contaminantes de nitrógeno inorgánico fue observada tanto a escala de laboratorio, en tanques con *Oryzias melastigma*, como en campo, con *Penaeus vannamei*.

2.2.6.1 Rol de los microorganismos en el proceso de biorremediación

Los microorganismos o sus metabolitos son ampliamente utilizados para degradar y limpiar contaminantes ambientales debido a su notable capacidad de adaptación. La selección de microorganismos para este propósito depende de la naturaleza química de los contaminantes, ya que solo pueden sobrevivir y degradar sustancias dentro de un rango limitado.

Se ha observado que numerosos contaminantes liberados al medio ambiente son biodegradados tanto en condiciones normales como extremas, lo que destaca las impresionantes capacidades metabólicas de los microorganismos.

Aquellos microorganismos adaptados a múltiples condiciones, incluidas las extremas, ofrecen un potencial especial para la descontaminación biológica en hábitats donde prevalecen diferentes condiciones, incluso las extremas, de manera simultánea (UNADM, 2020).

2.2.7 Microorganismo en la acuicultura

Las bacterias heterótrofas, especialmente las especies de *Bacillus spp.*, desempeñan un papel fundamental en los ecosistemas acuáticos. Su composición y crecimiento están influenciados por factores como los niveles de amoníaco, la relación C/N, la temperatura, la alcalinidad, la salinidad, la luz y el pH.

En la acuicultura, se puede promover su crecimiento aumentando la relación C/N por encima de 10, limitando el intercambio de agua, eliminando sólidos y mejorando la aireación y circulación en los tanques de cultivo. A pesar de su mayor tasa de crecimiento en comparación con las bacterias nitrificantes, su principal contribución radica en la descomposición de excretas, alimentos no consumidos y materia orgánica muerta, así como en la transformación del amoníaco en formas menos dañinas (Khanjani et al., 2022).

Los géneros de microorganismos heterotróficos más abundantes y beneficiosos se encuentran: *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Micrococcus*, *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Cellulomonas* y diversas especies de levaduras, estos organismos desempeñan un papel crucial en la biorremediación y en la mejora de la calidad del agua.

Su presencia puede beneficiar el crecimiento, rendimiento y salud de los organismos cultivados en el sistema acuático (Kumar et al., 2021).

2.2.7.1 *Bacillus spp.* en acuicultura

Recientemente, *Bacillus spp.* se ha ganado popularidad como probiótico en humanos, así como en productos animales y en la industria de la acuicultura. Su creciente uso se justifica por su destacada acción antimicrobiana y la diversidad de metabolitos que produce, tales como glucopéptidos, lipopéptidos, péptidos cíclicos, policétidos, enzimas líticas, péptidos no ribosomales y bacteriocina.

Exhibe diversos mecanismos de inhibición de patógenos, como la despolarización celular, la competencia en sitios de adhesión y la supresión de genes de virulencia. Además, produce enzimas líticas y antioxidantes, activa genes relacionados con la inmunidad humoral y promueve la producción de moléculas clave en la defensa inmunitaria (Kuebutornye et al., 2019).

El género *Bacillus*, identificado por primera vez por Cohn en 1872, comprende bacterias que forman endosporas resistentes al calor. Pertenece al Reino Bacteria, Filo Firmicutes, Clase Bacilli, Orden Bacillales y Familia Bacillaceae, con más de 336 especies.

Se caracteriza por su capacidad de crecer en ambientes aeróbicos o, en ciertas circunstancias, como anaerobio facultativo.

Son bacterias Gram positivas con forma bacilar, a menudo móviles gracias a la presencia de flagelos, y su tamaño varía de 0.5 a 10 μm . Muestran un óptimo crecimiento a un pH neutro y pueden desarrollarse en un amplio rango de temperaturas, aunque la mayoría prefiere condiciones mesófilas, con temperaturas entre 30 y 45 °C.

Su diversidad metabólica les permite promover el crecimiento de las plantas y controlar patógeno (Villarreal-Delgado et al., 2018).

Bacillus licheniformes ha demostrado potencial antimicrobiano, incluyendo la producción de bacteriocinas. Además, *Bacillus pumilus* ha sido utilizado con éxito como probiótico en la cría de peces tanto en entornos de laboratorio como en campo. También se ha observado que una combinación de *B. subtilis* y *B. licheniformis* se utiliza como probiótico en la cría de camarón, con efectos beneficiosos documentados.

Estas mismas especies de *Bacillus*, en combinación, se han empleado para mejorar el crecimiento y el estado inmunológico en tilapia. Además, *Bacillus subtilis* se ha utilizado con éxito para aumentar la resistencia a varias bacterias patógenas en esturiones.

Por último, *Bacillus cereus* ha mostrado promesa en la mejora del crecimiento y la inmunidad de la carpa en entornos de cultivo (Di et al., 2019).

CAPÍTULO III: Diseño metodológico

3.1 Tipo y diseño de investigación

El presente trabajo de investigación es de tipo experimental con un diseño completamente al azar, en donde se va a modificar la fuente de carbono del medio de cultivo para la producción del biosurfactante, el mismo que será evaluado en la biorremediación de fondos de piscinas acuícolas.

3.2 Población y muestra

3.2.1 Características de la población

La población del presente estudio tiene como características un clima cálido durante todo el año. Sus suelos consisten en arena con pastos y arbustos. La temperatura media anual es de 28 grados centígrados y la precipitación media anual es 346 mm. La humedad media es del 80% y el índice de radiación UV es de 6.

3.2.2 Delimitación de la población

La población de estudio fue representada por los suelos acuícolas de la Cooperativa de Productores Agropecuarios del Sur. "COOPAS", ubicada en la provincia de El Oro, cantón Arenillas teniendo un área de 876 (ha), de donde se extraerá las muestras de suelo para su posterior aislamiento de *Bacillus spp.*

Figura 1. Perfil de COOPAS



Fuente: (Google Earth, 2019)

3.2.3 Tipo de muestra

El principal criterio para obtener la muestra de suelo fue la sectorización ya que durante el proceso de la cosecha el agua es conducida por las compuertas de salida, las piscinas tienen diferentes alturas para poder evacuar el cuerpo de agua, esta diferencia hace que el agua arrastre los fangos y lodos los cuales se van asentando en la salida de la piscina. Usualmente en estudios de este tipo se recolectan muestras a distintas profundidades del fondo acuícola. En este caso, se requiere obtener la mayor cantidad de materia orgánica y grasa que se encuentra en el suelo, la cual se encuentra ubicada en la parte superficial.

3.2.4 Tamaño de la muestra

Se decidió trabajar con el suelo de la piscina #14 del bloque #1 ya que está se encontraba en periodo de post cosecha y secado. La muestra de suelo fue llevada al Laboratorio, la cantidad de 2 kg de sedimento el cual fue mezclado de manera homogénea, antes de ser sembrada.

Tabla 2. Coordenadas de COOPAS

Piscina	Área (ha)	Coordenada UTM
14	10.17	X: 599169.04 m E Y: 9618942.50 m S

Figura 2. Área de Piscina # 14 COOPAS



Fuente: (Google Earth, 2019)

3.2.5 Proceso de selección de la muestra

Las muestras de suelos fueron tomadas en campo dos días después de haberse cosechado la piscina # 14 con un área de (10.17 ha) en la camaronera COOPAS, coordenadas X: 602421.59 m E; Y: 9618022.34 m S zona 17M.

La metodología llevada a cabo para la extracción de las muestras de sedimento se realizó según (Lopes, 2021), mediante la utilización de palas se recolecto 2 kg aproximadamente de sedimento a una profundidad de 8-9 cm, en diferentes puntos de salida del estanque.

Para determinar el tipo de muestreo se analizó varias alternativas como: muestreo aleatorio o al azar que no es muy representativo por lo cual se lo descartó, otro tipo es la división del terreno por zonas de homogeneidad o topografía, en este caso todo el terreno es homogéneo por lo que se descartó este tipo de muestreo, la tercera alternativa comprendió tomar muestras por referencia donde se observa que existe mayor cantidad de lodo.

3.3 Métodos y técnicas

3.3.1 Obtención del biosurfactante

3.3.1.1 Aislamiento de cepas microbianas

La muestra de suelo fue homogenizada antes de tomar una pequeña muestra representativa de 1 g, la cual fue diluida en 9 ml de agua de peptona estéril; esta solución representa la base para las diluciones en serie.

La solución base fue diluida en serie añadiendo 1 ml de esta en 9 ml de agua destilada en cada paso. Luego, 100 μ L de la dilución 10^{-3} fueron sembrados por triplicado en medio Agar Nutritivo con un esparcidor estéril de acero. Luego las placas fueron incubadas a 30 °C por 24h.

Se registraron los tipos de colonias de acuerdo a su morfotipo, cada tipo de colonia fue purificada mediante repique en un nuevo medio agar, por el método de estriado, hasta obtener colonias individuales puras.

3.3.1.2 Selección de la cepa productora de biosurfactante

Las bacterias seleccionadas se siembran en Agar Sangre al 5% a 40°C y se incuban a 30°C durante 24 a 48 horas.

La presencia de un halo transparente alrededor de la colonia o de la zona de crecimiento fue utilizada para determinar la actividad hemolítica positiva. (Becerra & Horna, 2016)

La cepa con mayor actividad hemolítica es la escogida para la producción del biosurfactante.

3.3.1.3 Determinación de las condiciones de cultivo

La producción del biosurfactante se llevó a cabo usando un medio líquido, con la composición descrita por Becerra y Horna, 2016, que consiste en mezclar un Medio Mínimo de Sales, una solución de elementos traza y glicerol en un 4% como fuente de carbono, con un pH ajustado a 7.0 con NaOH.

Tabla 3. Composición del Medio Líquido para la producción de Biosurfactante

Componente		g/L
Medio Mínimo de Sales	NaNO ₃	4.000
	NaCl	1.000
	KCl	1.000
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0.100
	KH ₂ PO ₄	3.000
	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.200
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.001
Solución de elementos traza	FeCl ₃ .6H ₂ O	0.080
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.750
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.075
	MnSO ₄ .H ₂ O	0.750
	H ₃ BO ₃	0.150
Fuente de Carbono	Glicerol	40.000
Agua	H ₂ O	c.s.p. 1.0 L

Fuente: Becerra y Horna, 2016

3.3.1.4 Producción del biosurfactante

La cepa aislada fue cultivada en Caldo Caso Peptona de Caseína a 30°C por 18 h, para luego ser inoculada en el medio líquido para la producción del biosurfactante, a razón de 50 ml por 1000 ml de medio líquido.

Para fines experimentales, se llevaron a cabo tres tratamientos en los que se varió la fuente de carbono, considerando que, los principales ingredientes que se usan en los alimentos balanceados como fuente de grasa son los derivados de soya y derivados de palma. (Gutierrez, 2022)

Tabla 4. Declaración de los tratamientos del experimento

Variable	Niveles	Valores de niveles	Número de tratamiento
Fuente de carbono	3	Glicerol	T1
		Aceite de soya	T2
		Aceite de palma	T3

La producción de biosurfactante se llevó a cabo en Matracas Erlenmeyer de 1000 mL y se incubó conforme a las condiciones descritas en la Tabla 4.

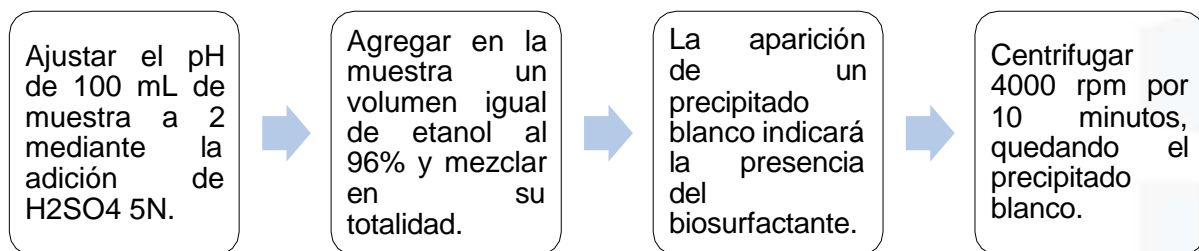
Tabla 4. Condiciones de cultivo para la producción de biosurfactante

Factor	Valor
Temperatura	27 °C
pH	7.0
Agitación	120 rpm
Tiempo	72 h

3.3.1.5 Extracción del biosurfactante

Posterior a la fermentación, se procedió a centrifugar a 4000 rpm durante 30 minutos el contenido de cada matraz y se retiró el precipitado con el fin de obtener el medio líquido libre de células. Para extraer el biosurfactante del medio líquido, se usó el procedimiento descrito por Chumi y Rueda (2023), que describe la precipitación ácida utilizando etanol al 96 %.

Figura 3. Procedimiento de extracción del biosurfactante



3.3.2 Caracterización del biosurfactante

Esta sección describe los análisis de caracterización que se realizaron para identificar las propiedades del biosurfactante obtenido. Es importante remarcar que la efectividad de todo biosurfactante está determinada por su capacidad de reducir la tensión superficial entre el agua y los compuestos grasos.

3.3.2.1 Prueba del colapso de gota

Para esta prueba, en una caja de Petri con agua, se suspende una gota de aceite mineral y sobre esta se coloca una gota de 10 µL del biosurfactante extraído (disuelto 50% p/v en agua), las gotas que contienen biosurfactante colapsan formando

un halo, mientras que las que no contienen biosurfactante permanecerán estables sin presentan ninguna acción.

El diámetro del halo es medido después de un minuto de que la gota del biosurfactante haya impactado sobre la superficie del aceite mineral. (Tugrul y Cansunar, 2005)

3.3.2.2 Determinación de índice de emulsificación (IE24)

Para medir la actividad emulsificante se adicionó 5 ml de hexano a 5 ml de una solución 50% p/v biosurfactante extraído – agua, seguido de una agitación a alta velocidad en un vórtex por 2 minutos. Las mediciones se realizaron 24 horas después.

El índice de emulsión (IE24) se calcula dividiendo la altura de la capa de emulsión entre la altura total, para luego multiplicar el resultado por 100 %. (Di Martino, 2015)

$$\%IE = \frac{\text{Altura de la capa de emulsión}}{\text{Altura total}} \times 100\%$$

3.3.2.3 Prueba de tensión superficial

La tensión superficial se calculó utilizando el método del anillo, siguiendo la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 834, con un dinamómetro se midió el empuje máximo ejercido por el fluido sobre el anillo de Platino – Iridio. Para medir la tensión superficial, se empleó una muestra líquida compuesta por una solución de biosurfactante extraído y agua al 50% p/v.

3.3.3 Aplicación en la biorremediación de fondos de piscinas acuícolas

3.3.1.1 Caracterización inicial del suelo

A la muestra de suelo de la que se aisló la cepa de *Bacillus spp.* usada para la obtención del biosurfactante, se le realizó una caracterización inicial de los siguientes parámetros: Materia Orgánica, %N, Relación N/C, Fracción Grasa, Humedad, pH y conteo microbiano, mediante los métodos descritos en la Tabla 6.

Tabla 5. Métodos analíticos para la caracterización del suelo

Parámetro	Método
% Materia orgánica	ME-LB-075, Espectrofotometría UV-VIS
% Nitrógeno	ME-LB-108, Método Kjeldahl
Relación C/N	ME-LB-163, Cálculo
% Fracción Grasa	EPA, 9071B
pH	ME-LB-018, Electrometría
Recuento de viables totales UFC/g	ME-LB-165, Petrifilm™

Fuente: AGRORUM, 2024.

3.3.1.2 Inoculación del biosurfactante en el la muestra de suelo

En dos recipientes de vidrio transparentes se colocó 500 g de suelo y se planteó un tratamiento con biosurfactante y un tratamiento control, tal como se indica en la Tabla 7.

Los tratamientos fueron mantenidos en la Camaronera COOPAS, en un espacio al aire libre pero protegidos de la lluvia.

Por cada tratamiento se preparó duplicados, con el fin de realizar controles periódicos para evaluar los cambios en la muestra de suelo.

Tabla 6. Descripción de los tratamientos usados para la evaluación del efecto biorremediador del biosurfactante sobre el suelo camaronero

Tratamiento	Descripción	Condiciones Ambientales	Frecuencia de seguimiento
Tratamiento Control	500 g de suelo más 200 ml de agua	Temperatura y humedad relativa ambiente. Sin aireación ni agitación	7 días y 14 días
Tratamiento Biosurfactante	500 g de suelo más 195 ml de agua más 5 g de biosurfactante extraído	Temperatura y humedad relativa ambiente. Sin aireación ni agitación	7 días y 14 días

3.4 Procesamiento estadístico de la información

3.4.1 Declaración de las variables

Para la producción del biosurfactante se empleó un esquema factorial 1x3 aleatorizado correspondiente a una cepa cultivada en medios de cultivo con 3 distintas fuentes de carbono con tres repeticiones de cada uno.

Tabla 7. Elementos del diseño factorial

Variable Independiente - Fuente de carbono Factor 1	Réplicas
<ul style="list-style-type: none">• Tratamiento 1 (Glicerol)• Tratamiento 2 (Aceite de soya)• Tratamiento 3 (Aceite de palma)	a, b, c

3.4.2 ANOVA

El análisis estadístico que corresponde al presente estudio es el ANOVA de 1 vía o 1 factor, ya que esta herramienta estadística se utiliza para analizar datos obtenidos por un diseño completamente al azar; estos diseños sólo consideran dos fuentes de variación: los tratamientos y el error aleatorio (réplicas). El análisis de ANOVA de 1 factor permitirá encontrar si existe relación entre la variable independiente (fuente de carbono) y la variable de respuesta (cantidad de biosurfactante obtenido).

El análisis estadístico se realizó utilizando el software estadístico IBM SPSS STATISTICS v.22.0.0., se usaron estadísticas descriptivas para observar tendencias en el conjunto de datos y todos los resultados se representaron como el promedio de tres experimentos independientes con su desviación estándar correspondiente.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95% para evaluar la influencia del tipo de fuente de carbono utilizado en el medio de cultivo para la producción del biosurfactante.

Figura 4. ANOVA de 1 factor

Unidireccional								
Descriptivos								
Resultados en g/100ml								
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% de intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Repetición1	3	,9500	,15000	,08660	,5774	1,3226	,80	1,10
Repetición2	3	1,1400	,11533	,06658	,8535	1,4265	1,05	1,27
Repetición3	3	1,0867	,16442	,09493	,6782	1,4951	,90	1,21
Total	9	1,0589	,15136	,05045	,9425	1,1752	,80	1,27

ANOVA					
Resultados en g/100ml					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,058	2	,029	1,376	,322
Dentro de grupos	,126	6	,021		
Total	,183	8			

Ho: Hipótesis nula o hipótesis de trabajo. No existe diferencia significativa entre los tratamientos para la producción del biosurfactante.

H1: Hipótesis alterna o hipótesis de investigador. Al menos un tratamiento para la producción del biosurfactante es distinto.

Nivel de significancia =5% =0.05

Si $p < 0.05$

El valor de p o significancia obtenido en nuestro análisis de variancia ANOVA es de 0,322 por lo que P es mayor que 0,05 entonces aceptamos la hipótesis nula. Y rechazamos la hipótesis alterna o del investigador, donde expresamos que todos los resultados de los tratamientos para la obtención de biosurfactante son idénticos.

3.3.2.1 Pruebas Post Hoc

La prueba Tukey identificó y clasificó en 1 grupo a todos los tratamientos. Estos resultados respaldan el análisis estadístico de variancia realizado en el punto anterior.

Figura 5. Prueba de comparación múltiple Tukey

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Resultados en g/100ml
HSD Tukey

(I) Número de repetición	(J) Número de repetición	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Repetición1	Repetición2	-,19000	,11816	,313	-,5526	,1726
	Repetición3	-,13667	,11816	,518	-,4992	,2259
Repetición2	Repetición1	,19000	,11816	,313	-,1726	,5526
	Repetición3	,05333	,11816	,896	-,3092	,4159
Repetición3	Repetición1	,13667	,11816	,518	-,2259	,4992
	Repetición2	-,05333	,11816	,896	-,4159	,3092

Subconjuntos homogéneos

Resultados en g/100ml

HSD Tukey^a

Número de repetición	N	Subconjunto para alfa = 0,05
Repetición1	3	,9500
Repetición3	3	1,0867
Repetición2	3	1,1400
Sig.		,313

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

CAPÍTULO IV: Análisis e interpretación de resultados

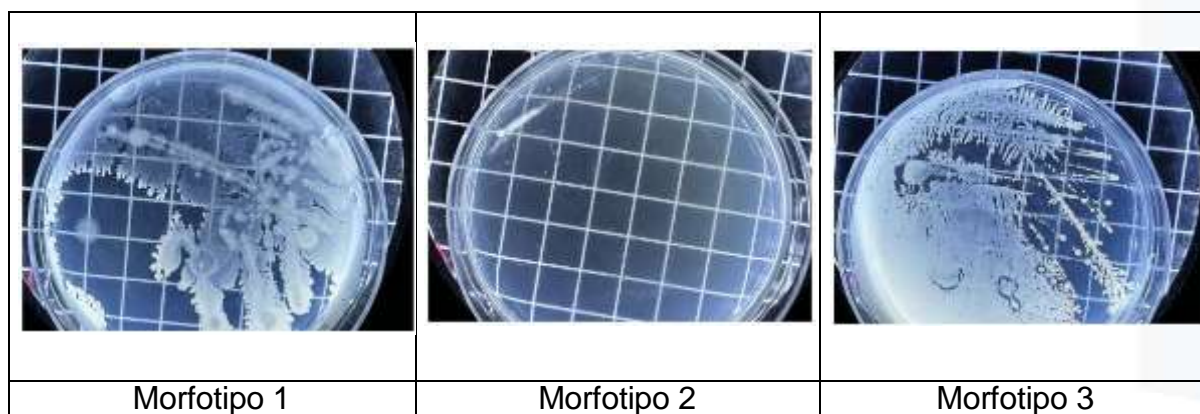
4.1 Análisis de los resultados

4.1.1. Aislamiento e identificación de *Bacillus* spp.

La identificación de *Bacillus* spp. fue macroscópica (Figura 5) y microscópica mediante tinción de Gram (Figura 6).

En las placas se pueden observar círculos de diferentes tamaños de color blanquecino correspondientes a las colonias de la bacteria en estudio, se visualizó colonias con característico color blanco con diámetros que miden aproximadamente 2 a 3 mm y de apariencia mucoide con bordes irregulares.

Figura 6. Morfotipos resultantes de la siembra de la suspensión madre



En la tinción de Gram se evidencia bacilos Gram positivos, de 1 a 2 mm de diámetro por 3 a 5 mm de largo, con bordes redondeados y que forman cadenas cortas, se observa presencia de esporas elipsoidales y centrales que no deforman el bacilo, la morfología de las tres cepas corresponde al género *Bacillus*.

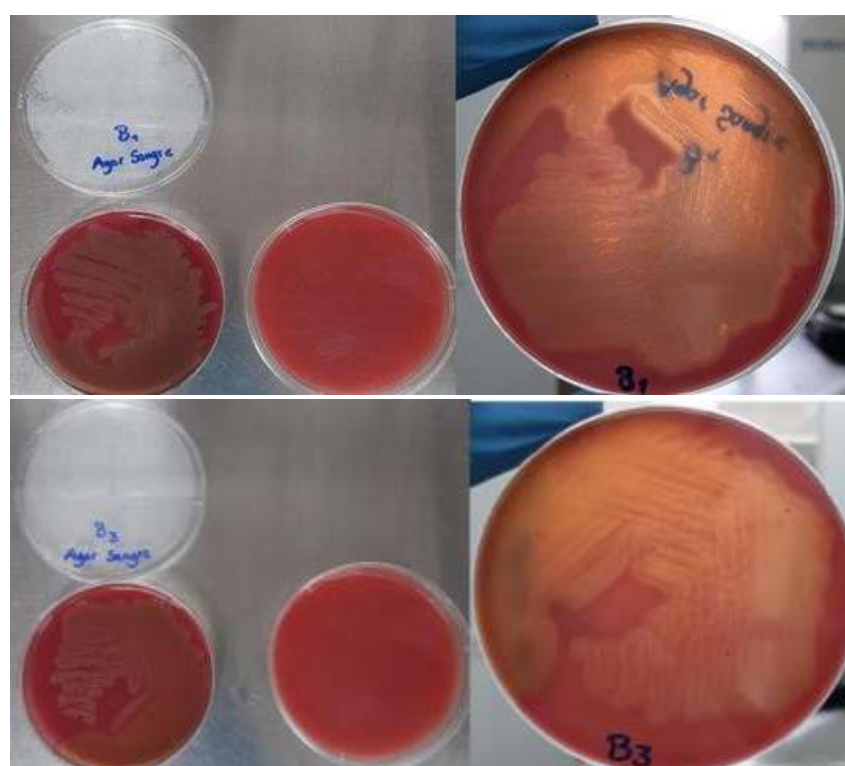
Figura 7. Identificación microscópica de los morfotipos



La actividad hemolítica positiva se determinó por la presencia de un halo alrededor de la colonia, únicamente el Morfotipo 1 y Morfotipo 3 fueron sembrados en Agar Sangre, debido a que, el Morfotipo 2 presentó un bajo crecimiento en la siembra aislada lo que evidencia una reducida viabilidad, así que no se lo considera para la presente prueba.

En la prueba de agar sangre todas las cepas causaron hemolisis, sin embargo, el Morfotipo 1 produjo una mayor cantidad, por lo cual fue la cepa escogida para realizar la producción de biosurfactante.

Figura 8. Actividad hemolítica producida por el Morfotipo #1 y Morfotipo #3



4.1.2. Producción y caracterización del biosurfactante

Tabla 9. Resultados de la producción de biosurfactantes

Tratamiento N°	Cantidad de biosurfactante (g/100 ml)		
	Replica a	Replica b	Replica c
1	0.364	0.496	0.316
2	1.062	1.749	1.034
3	1.091	1.011	1.062

Para la caracterización del biosurfactante se eligió la réplica con la que se obtuvo una mayor cantidad (Tratamiento 2, Réplica b), ya que, acorde al análisis estadístico no hay diferencias entre los tratamientos.

Tabla 8. Resultados de la caracterización del biosurfactante

Tratamiento	Prueba del colapso de gota (Diámetro del halo)	Determinación de índice de emulsificación	Prueba de tensión superficial
2b	5.2 cm	61,24 %	57.2 mN/m

Los resultados de la prueba del colapso de gota (dispersión de aceite) revelaron un diámetro del halo de 5.2 cm, confirmando la presencia de biosurfactante. Además, el análisis de la tensión superficial arrojó un valor de 57.2 mN/m. Estos hallazgos respaldan las conclusiones presentadas por Youssef et al. en 2004, quienes expusieron que existe una relación directa entre la concentración de biosurfactante y el diámetro observado en la dispersión de aceite. Según su investigación, a medida que aumenta la concentración de biosurfactante, el diámetro del halo va a ser mayor. Asimismo, encontraron que el diámetro guarda una relación inversa con la tensión superficial: a mayor diámetro, menor es la tensión superficial.

Youssef et al. (2004) señalaron que las cepas con valores de tensión superficial superiores a 60 mN/m no pueden considerarse productoras de surfactantes biológicos, ya que sostienen que existe una relación inversa entre la concentración del biosurfactante y la tensión superficial.

El índice de emulsificación a las 24 h fue de 61.24 %, y se notó que las emulsiones permanecieron estables con el tiempo, ya que no hubo una variación significativa en su altura. Estos resultados son similares a Alkan et al., 2019, quienes reportaron un porcentaje de emulsificación del 50 % a las 24 horas, manteniéndose estable incluso una semana después.

Santos, 2017 señaló que existe una relación importante entre la reducción de la tensión superficial con respecto a la fuente de carbono, teniendo varianzas significativas entre un medio y otro, independientemente de las cepas utilizadas, y afirmó que distintas fuentes de carbono ejercen diferentes efectos sobre la producción del biosurfactante, sin embargo, en el presente estudio no se pudo confirmar esta observación.

4.1.3. Evaluación del biosurfactante en la biorremediación del suelo

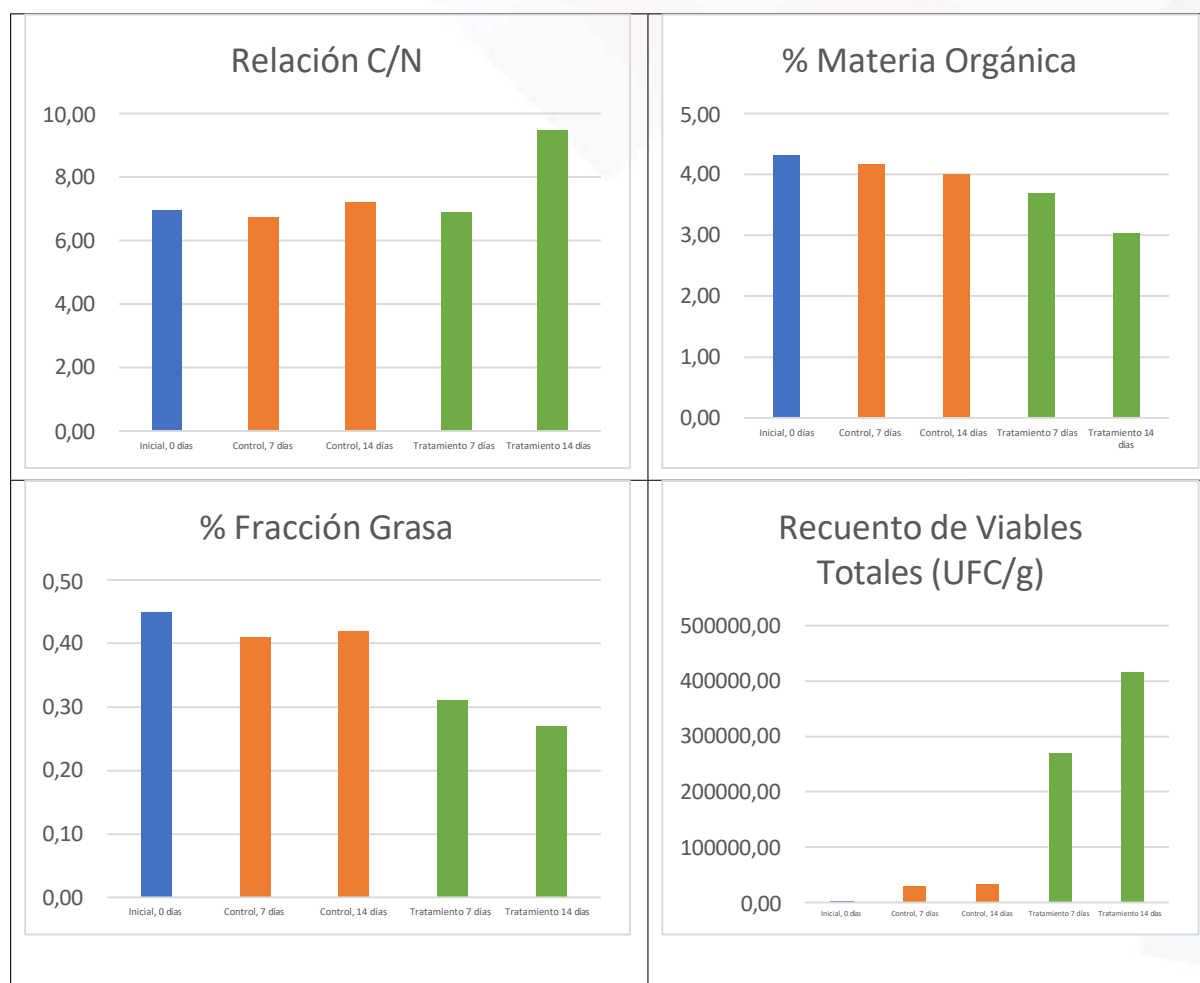
Tabla 9. Resultados del efecto del biosurfactante en la biorremediación del suelo

	Inicial	Control		Tratamiento	
	t = 0 días (caracterización del suelo)	t = 7 días	t = 14 días	t = 7 días	t = 14 días
Relación C/N	6.96	6.73	7.20	6.87	9.47
% Materia orgánica	4.31	4.17	4.01	3.69	3.03
% Nitrógeno	0.32	0.31	0.28	0.27	0.16
Potencial de Hidrogeno (pH)	7.64	7.21	7.44	7.01	7.08
% Fracción Grasa	0.45	0.41	0.42	0.31	0.27
Recuento de viables totales (UFC/g)	2400	29000	33000	270000	416000

La evaluación del efecto del biosurfactante en la biorremediación del suelo se considera satisfactoria, dado que, al comparar los dos tratamientos, se observa una mejora en la relación C/N, una reducción en el porcentaje de Materia Orgánica y un aumento en el microbiota nativo del suelo, expresado como Recuento de Viables Totales (UFC/g).

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la mejora de las propiedades del suelo, derivada del debilitamiento de su capa grasa superficial, favorece un mejor crecimiento microbiano, lo que conduce a una biorremediación más eficiente del suelo.

Figura 9. Evaluación del efecto de aplicación del biosurfactante para la biorremediación del suelo acuícola



4.2 Interpretación de los resultados

La cepa empleada en el estudio logró con éxito la síntesis de un biosurfactante con características propias de un tensoactivo, evidenciando además una mejora en la velocidad de biorremediación del suelo.

Estos hallazgos subrayan la relevancia de los biosurfactantes como alternativa a los tensoactivos sintéticos, ya que los de origen biológico reducen la actividad tensoactiva y muestran potencial aplicación en procesos de biorremediación.

No obstante, se señala que el trabajo enfrentó limitaciones temporales y costos de producción, por lo que se sugiere la continuación de la investigación en biosurfactantes, con un enfoque en optimizar el proceso de producción para lograr la viabilidad de la investigación.

CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se aisló 3 morfotipos de cepas microbianas, las cuales resultaron bacilos positivos ante la tinción Gram y microscópicamente se identificaron como *Bacillus spp*, de estas solo la cepa denominada como Morfotipo 1 fue escogida para la producción del biosurfactante debido a que tuvo mayor actividad hemolítica.

Se obtuvo biosurfactante en un medio de cultivo al que se le varió la fuente de carbono, siendo esta: glicerol, aceite de soya o aceite de palma; concluyendo mediante análisis estadístico que la fuente de carbono no tiene influencia significativa en la cantidad de biosurfactante obtenido.

Se caracterizó el biosurfactante, el cual presentó propiedades propias de un tensoactivo, los parámetros evaluados fueron: colapso de gota, índice de emulsificación y tensión superficial.

La aplicación de biosurfactante en una muestra de suelo de piscina de crianza de camarones logró acelerar la degradación de materia orgánica, mejorar la relación C/N y favorecer el crecimiento de microbiota nativa, este resultado se cree es consecuencia del debilitamiento de la capa grasa superficial presente en el suelo debido a la acumulación de restos alimento balanceado y excreta de los animales.

En general, los resultados obtenidos concuerdan con lo referenciado en la bibliografía, donde se ha encontrado que la producción de biosurfactante está relacionada con la presencia de una fuente de carbono que contiene componentes grasos (hidrofóbicos) en abundancia.

5.2 Recomendaciones

Complementar con criterios de análisis físicos y químicos asociados a la materia orgánica para poder establecer correlaciones con la degradación de la materia orgánica, producto de la actividad ejercida por las bacterias en el fondo de la laguna.

Prologar el tiempo de evaluación del efecto del biosurfactante en la biorremediación de suelos acuícolas y probarlo a diferentes concentraciones.

Realizar un estudio para la optimización del proceso de producción del biosurfactante y establecer el costo beneficio de la aplicación del producto.

Realizar una identificación molecular de la cepa aislada con el fin de corroborar que se trate de una especie nativa de los suelos de la zona, y que no sea una especie externa presente en el suelo debido a protocolos de biorremediación de la camaronera.

Bibliografía

- Abo, M. (2021). Classification and Production of Microbial Surfactants. En *Microbial Biosurfactants: Preparation, Properties and Applications* (pp. 65-89). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6607-3_4
- Álvarez-Narváez, D. J. (2023). El Estado del Arte de los Probióticos en la Acuicultura. *Acta Pesquera*, 9(18), 43-55.
- Md Badrul Hisham, N. H., Ibrahim, M. F., Ramli, N., & Abd-Aziz, S. (2019). Production of biosurfactant produced from used cooking oil by *Bacillus* sp. HIP3 for heavy metals removal. *Molecules*, 24(14), 2617.
- Becerra Gutiérrez, L. K., & Horna Acevedo, M. V. (2016). Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 23-31.
- Borrallo Sánchez, N. (2020). Probióticos de uso ambiental.
- Campos, J. M., Stamford, T. L. M., & Sarubbo, L. A. (2019). Characterization and application of a biosurfactant isolated from *Candida utilis* in salad dressings. *Biodegradation*, 30, 313-324.
- Castebianco, J. A. (2018). Técnicas de remediación de metales pesados con potencial aplicación en el cultivo de cacao. *La Granja. Revista de Ciencias de la Vida*, 27(1), 21-35.
- Castelein, M., Verbruggen, F., Van Renterghem, L., Spooren, J., Yurramendi, L., Du Laing, G., ... & Williamson, A. J. (2021). Bioleaching of metals from secondary materials using glycolipid biosurfactants. *Minerals Engineering*, 163, 106665.
- Cruz Mendoza, I. L., & Coronel, J. (2022). *Biosurfactante de Bacillus subtilis DS03: propiedades y aplicación en sistemas de limpieza "out of place" en una planta de procesamiento de salchichas* (Doctoral dissertation, ESPOL. FIMCP).
- Maria da Gloria, C., & Sarubbo, L. A. (2021). Synthetic and biological surfactants used to mitigate biofouling on industrial facilities surfaces. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(2), 2560-2585.
- Di, J., Chu, Z., Zhang, S., Huang, J., Du, H., & Wei, Q. (2019). Evaluation of the potential probiotic *Bacillus subtilis* isolated from two ancient sturgeons on growth performance, serum immunity and disease resistance of *Acipenser dabryanus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 93, 711-719.

- Durval, I. J. B., Mendonça, A. H. R., Rocha, I. V., Luna, J. M., Rufino, R. D., Converti, A., & Sarubbo, L. A. (2020). Production, characterization, evaluation and toxicity assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 biosurfactant for marine oil spills bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 157, 111357.
- Fei, D., Zhou, G. W., Yu, Z. Q., Gang, H. Z., Liu, J. F., Yang, S. Z., ... & Mu, B. Z. (2020). Low-toxic and nonirritant biosurfactant surfactin and its performances in detergent formulations. *Journal of Surfactants and Detergents*, 23(1), 109-118.
- Fenibo, E. O., Douglas, S. I., & Stanley, H. O. (2019). A review on microbial surfactants: production, classifications, properties and characterization. *J. Adv. Microbiol*, 18(3), 1-22.
- Figuroa Sanéz, M. F. (2021). *Producción de biosurfactantes para su uso potencial en la eliminación de metales pesados* (Master's thesis, FIGUEROA SANEZ, MARIA FERNANDA).
- Gavino Arias, E. T. (2017). Revisión acerca de la utilización de microorganismos en el mejoramiento de sedimentos en granjas camaroneras.
- Gayathiri, E., Prakash, P., Karmegam, N., Varjani, S., Awasthi, M. K., & Ravindran, B. (2022). Biosurfactants: potential and eco-friendly material for sustainable agriculture and environmental safety—a review. *Agronomy*, 12(3), 662.
- Gogoi, M., Mukherjee, I., & Ray Chaudhuri, S. (2022). Characterization of ammonia remover *Bacillus albus* (ASSF01) in terms of biofilm-forming ability with application in aquaculture effluent treatment. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(41), 61838-61855.
- Hlordzi, V., Kuebutornye, F. K., Afriyie, G., Abarike, E. D., Lu, Y., Chi, S., & Anokyewaa, M. A. (2020). The use of *Bacillus* species in maintenance of water quality in aquaculture: A review. *Aquaculture reports*, 18, 100503.
- Iriarte Santiago, M. J. (2023). Microplásticos y microorganismos: una revisión sobre su interacción en ecosistemas de manglar.
- Irigoin Gonzales, J. L. (2021). Aplicación de biosurfactantes producido por *Bacillus* en la remediación de suelos contaminados con metales pesados: revisión sistemática.
- Janek, T., Krasowska, A., Czyżnikowska, Ż., & Łukaszewicz, M. (2018). Trehalose lipid biosurfactant reduces adhesion of microbial pathogens to polystyrene and silicone surfaces: an experimental and computational approach. *Frontiers in Microbiology*, 9, 409587.

- Johnson, P., Trybala, A., Starov, V., & Pinfield, V. J. (2021). Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants. *Advances in colloid and interface science*, 288, 102340.
- Khanjani, M. H., Mohammadi, A., & Emerenciano, M. G. C. (2022). Microorganisms in biofloc aquaculture system. *Aquaculture Reports*, 26, 101300.
- Khanna, S., & Pattnaik, P. (2019). Production and functional characterization of food compatible biosurfactants. *Appl. Food Sci. J*, 3, 1-4.
- Krebs Reginatto, L. (2003). *Respiración del suelo como herramienta para evaluar calidad de fondos en acuicultura. I. Desarrollo de un protocolo estándar para medir dióxido de Carbono* (Master's thesis, ESPOL. FIMCM: Maestría en Ciencias).
- Kuebutornye, F. K., Abarike, E. D., & Lu, Y. (2019). A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish & shellfish immunology*, 87, 820-828.
- Mishra, S., Lin, Z., Pang, S., Zhang, Y., Bhatt, P., & Chen, S. (2021). Biosurfactant is a powerful tool for the bioremediation of heavy metals from contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 418, 126253.
- Moldes, A. B., Rodríguez-López, L., Rincón-Fontán, M., López-Prieto, A., Vecino, X., & Cruz, J. M. (2021). Synthetic and bio-derived surfactants versus microbial biosurfactants in the cosmetic industry: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2371.
- Nalini, S., & Parthasarathi, R. (2018). Optimization of rhamnolipid biosurfactant production from *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its biocontrol efficacy against *Fusarium* wilt of eggplant. *Annals of Agrarian Science*, 16(2), 108-115.
- Pérez-Chabela, M. D. L., Alvarez-Cisneros, Y., Soriano-Santos, J., & Pérez-Hernández, M. A. (2020). Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una Revisión. *Hidrobiológica*, 30(1), 93-105.
- Purwasena, I. A., Astuti, D. I., Syukron, M., Amaniyah, M., & Sugai, Y. (2019). Stability test of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* DS1 using experimental design and its application for MEOR. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 183, 106383.
- Ribeiro, B. G., Guerra, J. M., & Sarubbo, L. A. (2020). Biosurfactants: Production and application prospects in the food industry. *Biotechnology progress*, 36(5), e3030.

- Rodríguez Villanueva, K. N. (2022). Biorremediación mediante *Trichoderma* spp., *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* para reducir concentraciones de Cadmio en Espárrago.
- Santos, E. F., Teixeira, M. F. S., Converti, A., Porto, A. L. F., & Sarubbo, L. A. (2019). Production of a new lipoprotein biosurfactant by *Streptomyces* sp. DPUA1566 isolated from lichens collected in the Brazilian Amazon using agroindustry wastes. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 17, 142-150.
- Shaban, S. M., Kang, J., & Kim, D. H. (2020). Surfactants: Recent advances and their applications. *Composites communications*, 22, 100537.
- Silva, I. A., Veras, B. O., Ribeiro, B. G., Aguiar, J. S., Guerra, J. M. C., Luna, J. M., & Sarubbo, L. A. (2020). Production of cupcake-like dessert containing microbial biosurfactant as an emulsifier. *PeerJ*, 8, e9064.
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & Santos-Villalobos, S. D. L. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130.
- Zhang, D., Sha, M., Pan, R., Lin, X., Xing, P., & Jiang, B. (2019). Synthesis and properties study of novel fluorinated surfactants with perfluorinated branched ether chain. *Journal of Fluorine Chemistry*, 219, 62-69.
- Zhu, B., Chen, S., Zhao, C., Zhong, W., Zeng, R., & Yang, S. (2019). Effects of *Marichromatium gracile* YL28 on the nitrogen management in the aquaculture pond water. *Bioresource technology*, 292, 121917.

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

¡Evolución académica!

@UNEMIEcuador

