

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Evaluación de la producción de EPS por *Bacillus* spp. provenientes de suelos  
arcillosos de la Amazonía Ecuatoriana contaminados con hidrocarburos**

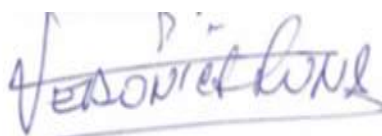
Disertación previa a la obtención del título de Microbióloga

**JOSSELYN ESTEFANIA ORTEGA CHAVEZ**

QUITO, 2022

## CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Microbiología del Srta. Josselyn Estefanía Ortega Chávez ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Verónica Luna", is written over a horizontal line.

**Mtr. Verónica Luna**

Directora de la Disertación

Quito, 18 de febrero de 2022

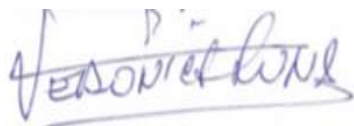


---

**Josselyn Estefanía Ortega Chavez**

**Estudiante**

07 de abril de 2022



---

**Mtr. Verónica Luna Unda**

**Directora de la Disertación**

07 de abril de 2022

---

**Mtr. Sonia Estrella Vásquez**  
**Coordinadora de la Carrera de**  
**Microbiología**

---

**Dr. Renato Valencia Reyes**  
**Decano de la Facultad de Ciencias**  
**Exactas y Naturales**

**DEDICATORIA**

A mis padres Angel Ortega y María Chavez, por su amor, apoyo, comprensión, confianza y por todos los esfuerzos realizados a lo largo de mi vida.

A mis hermanos Angélica, Xiomara y Leonardo, por su cariño y alegría en todo momento.

A mis queridos abuelitos Natividad Curizaca y Miguel Ortega por darme siempre su ejemplo de lucha constante a pesar de las adversidades de la vida. Los amo, siempre están en mi corazón.

A mis dos amores, mis sobrinas Danae y Tamia por ser mi inspiración para seguir adelante.

Al mejor de los amigos que pude tener: Norton, por acompañarme en los mejores y peores momentos de mi vida. Nos volveremos a ver en el cielo mi corazón.

Con amor,

Joly.

## AGRADECIMIENTOS

A todos los integrantes de mi familia, quienes son y serán mi cable a tierra. Gracias por apoyarme, aunque aún no logren entender muy bien qué hago con los “bichitos” tanto tiempo dentro del laboratorio.

A la Mtr. Verónica Luna, directora de la presente disertación, por ser maestra, guía y apoyo durante todas las fases de esta investigación; sobre todo por la confianza depositada en mí y por dejarme formar parte de su equipo de trabajo.

Al proyecto “Amazonía Viva” de Petroecuador EP, que, en colaboración con la Pontificia Universidad Católica del Ecuador financiaron este proyecto.

A Marcelo López y Katherine Zaldumbide por todo su apoyo logístico y académico en las instalaciones del laboratorio de Micología en Nayón.

A la Escuela de Ciencias Químicas y al personal técnico de la sala de preparaciones de la de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la PUCE por el apoyo brindado y por permitirme realizar parte de esta investigación en sus instalaciones.

Un enorme agradecimiento a profesores e investigadores que contribuyeron en esta disertación: Magaly Estrella, Diana Astorga, Fernando Sta. Cruz, Anita Gordillo y el Ing. Julio Sánchez Otero por brindarme su invaluable apoyo, asesoría y aporte intelectual en la realización de este estudio.

A mis amigos y compañeros, Johana Tipanta, Emilio Jarre, Carolina Morán y Samantha Villarreal por el respaldo y apoyo siempre. Así por los hermosos lazos de amistad que formamos a lo largo de la carrera. Ojalá, a pesar de los distintos caminos que tomemos, podamos encontrarnos en algún punto siempre.

A mi mejor amiga, Katherine Quezada por apoyarme y estar siempre presente a pesar de la distancia.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, PUCE, así como a sus autoridades y administrativos, por permitirme desarrollar esta investigación en sus instalaciones.

Muchas gracias.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>5</b>
<b>4.1 Toma de muestras .....</b>	<b>5</b>
<b>4.2 Aislamiento y mantenimiento de cepas de <i>Bacillus</i> spp.....</b>	<b>6</b>
<b>4.3 <i>Screening</i> cualitativo y cuantitativo de cepas potencialmente productoras de EPS....</b>	<b>7</b>
<b>4.4 Identificación fenotípica de <i>Bacillus</i> spp. potencialmente productoras de EPS .....</b>	<b>8</b>
<b>4.5 Identificación molecular de <i>Bacillus</i> spp. potencialmente productoras de EPS.....</b>	<b>8</b>
4.5.1 <i>Extracción de ADN.</i> - .....	8
4.5.2 <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa.</i> - .....	8
4.5.3 <i>Secuenciación.</i> - .....	8
<b>4.6 Ensayos de producción de EPS en condiciones definidas .....</b>	<b>9</b>
4.6.1 <i>Preparación de inóculos.</i> - .....	9
4.6.2 <i>Producción de EPS en función de parámetros nutricionales.</i> - .....	9
4.6.3 <i>Producción de EPS en función del pH.</i> - .....	10
4.6.4 <i>Producción de EPS en función de salinidad.</i> - .....	10
<b>4.7 Determinación de EPS .....</b>	<b>10</b>
4.7.1 <i>Extracción y cuantificación.</i> - .....	10
<b>4.8 Análisis estadístico de los datos.....</b>	<b>11</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>11</b>
<b>5.1 Aislamiento de <i>Bacillus</i> spp. aisladas de suelos arcillosos de la Amazonía Ecuatoriana sometidos a procesos de biorremediación. ....</b>	<b>11</b>
<b>5.2 <i>Screening</i> cualitativo y cuantitativo de cepas potencialmente productoras de EPS..</b>	<b>11</b>

<b>5.3</b>	<b>Identificación fenotípica de <i>Bacillus</i> spp. potencialmente productoras de EPS</b> .....	12
<b>5.4</b>	<b>Identificación molecular de <i>Bacillus</i> spp. potencialmente productoras de EPS</b> .....	12
<b>5.5</b>	<b>Ensayos de producción de EPS en condiciones definidas</b> .....	13
5.5.1	<i>Fuentes de carbono.</i> - .....	13
5.5.2	<i>Fuentes de nitrógeno.</i> - .....	15
5.5.3	<i>Valores de pH.</i> - .....	17
5.5.4	<i>Concentraciones de NaCl.</i> - .....	18
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	19
6.1	<b>Aislamiento e identificación de <i>Bacillus</i> spp. potencialmente productoras de EPS</b> ..	19
6.2	<b>Ensayos de producción de EPS en condiciones definidas</b> .....	20
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	26
<b>8.</b>	<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	28
<b>9.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	28

#### LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	<b>Screening cuantitativo. Concentración de EPS (<math>\mu\text{g/mL}</math>) producidos por los aislados bacterianos.</b> .....	11
<b>Tabla 2.</b>	<b>Efecto de distintas fuentes de carbono en la producción de EPS por parte de <i>Bacillus</i> spp.</b> .....	14
<b>Tabla 3.</b>	<b>Efecto de distintas fuentes orgánicas de nitrógeno en la producción de EPS por parte de <i>Bacillus</i> spp.</b> .....	16
<b>Tabla 4.</b>	<b>Efecto de los distintos factores de estrés en la producción de EPS por parte de <i>Bacillus</i> spp.</b> .....	18

#### LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	<b>Lugar de muestreo.</b> .....	6
<b>Figura 2.</b>	<b>Producción de EPS bajo distintas fuentes de carbono.</b> .....	13
<b>Figura 3.</b>	<b>Efectos principales en la producción de EPS por parte de las distintas fuentes de carbono.</b> .....	14

<b>Figura 4. Producción de EPS bajo distintas fuentes de nitrógeno.</b> .....	15
<b>Figura 5. Efectos principales en la producción de EPS por la fuente de nitrógeno</b> .....	16
<b>Figura 6. Producción de EPS bajo distintos valores de pH.</b> .....	17
<b>Figura 7. (A) Producción de EPS bajo distintos valores de pH. (B) Efectos principales en la producción de EPS por parte del tipo de cepa.</b> .....	18
<b>Figura 8. Producción de EPS bajo distintas concentraciones de NaCl.</b> .....	19

## ANEXOS

<b>ANEXO 1. Aislados bacterianos sospechosos de pertenecer al género <i>Bacillus</i>.</b> .....	42
<b>ANEXO 2. Extracción de EPS.</b> .....	42
<b>ANEXO 3. Curva de calibración de glucosa empleada para la cuantificación de EPS (<math>\mu\text{g/mL}</math>).</b> .....	43
<b>ANEXO 4. Variables independientes analizadas en la investigación.</b> .....	43
<b>ANEXO 5. <i>Identificación fenotípica</i> de las cepas bacterianas aisladas de los suelos contaminados con hidrocarburos sometidos a procesos de biorremediación.</b> .....	44
<b>ANEXO 6. Comparación de las concentraciones de EPS <math>\mu\text{g/mL}</math> producidos por los 12 aislados durante el <i>screening</i> cuantitativo, mediante ANOVA.</b> .....	45
<b>ANEXO 7. Caracterización bioquímica de los aislados bacterianos mediante los sistemas API 50CH y API 20E y pruebas complementarias.</b> .....	45
<b>ANEXO 8. Análisis de varianza bifactorial: fuente de carbono y concentración (a) y cepa (b).</b> .....	48
<b>ANEXO 9. Comparación de medias marginales de cada tratamiento.</b> .....	48
<b>ANEXO 10. Análisis de varianza bifactorial: fuente de nitrógeno y concentración (a) y cepa (b).</b> .....	49
<b>ANEXO 11. Comparación de medias marginales de cada tratamiento.</b> .....	49
<b>ANEXO 12. Análisis de varianza bifactorial: pH (a) y cepa (b).</b> .....	50
<b>ANEXO 13. Comparación de medias marginales de cada tratamiento.</b> .....	50
<b>ANEXO 14. Análisis de varianza bifactorial: concentración de NaCl (a) y cepa (b).</b> .....	51
<b>ANEXO 15. Comparación de medias marginales de cada tratamiento.</b> .....	51

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**EPS:** Sustancias poliméricas extracelulares (por sus siglas en inglés) o exopolisacáridos

**TSA:** Agar triptona soya (por sus siglas en inglés)

**BHI:** Caldo infusión cerebro corazón (por sus siglas en inglés)

**MBL:** Medio basal líquido

**mm:** Milímetros

**cm:** Centímetros

**μL:** Microlitros

**μg/mL:** Microgramos sobre mililitro

**g:** gramos

**nm:** Nanómetros

**° C:** Grados Celsius.

**rpm:** revoluciones por minuto

**(v/v):** volumen sobre volumen

**(p/v):** peso sobre volumen

**pH:** potencial de hidrógeno

**ARNr:** Ácido ribonucleico ribosómico

**PCR:** Reacción en cadena de polimerasa (por sus siglas en inglés)

**Evaluación de la producción de EPS por *Bacillus* spp. provenientes de suelos arcillosos de la Amazonía Ecuatoriana contaminados con hidrocarburos**

**Evaluation of EPS production by *Bacillus* spp. from hydrocarbon-contaminated clay soils in the Ecuadorian Amazon**

**Josselyn Ortega<sup>1</sup> y Verónica Luna<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Quito, Ecuador

Autor de correspondencia: [CVLUNA@puce.edu.ec](mailto:CVLUNA@puce.edu.ec)

## **1. RESUMEN**

El elevado grado de compactación del suelo arcilloso de la Amazonía Ecuatoriana constituye un serio problema a la hora de biorremediarlo. Un suelo compactado hace que la tasa de difusión de dióxido de carbono y oxígeno sea muy baja o hasta inexistente, lo que reduce a su vez, la actividad microbiana aeróbica participante. Los exopolisacáridos (EPS) microbianos mejoran la agregación de las partículas del suelo y por ende su estructura. Curiosamente el género *Bacillus* es uno de los más conocidos por producir biofilmes y EPS. En este contexto, esta investigación se centró en evaluar la capacidad productora de EPS de cuatro aislados autóctonos. Se analizaron como fuentes de carbono a distintas concentraciones, la sacarosa y la melaza de caña de azúcar. Esta última indujo una mayor producción del metabolito en la mayoría de los aislados. Así también, se probaron el extracto de levadura y la triptona como fuentes de nitrógeno. Aquella que aumentó significativamente la producción fue el extracto de levadura. En cuanto al estrés ácido/alcalino, no se observó una influencia directa sobre la producción, sin embargo, cada uno de los aislados presentó preferencia de pH. En relación con el estrés salino, la concentración ideal de NaCl también dependió del microorganismo productor. Los resultados de esta investigación reafirmaron la hipótesis de que el tipo de sustrato óptimo dependerá de cada microorganismo y sus características intrínsecas. Los aislados bacterianos que destacaron fueron BCL-SA-004 y BCL-SA-010, este último demostró ser un buen productor de EPS en la

mayoría de los ensayos. Ambos microorganismos tienen potencial biotecnológico para ser empleados en el mejoramiento de la estructura de los suelos contaminados con hidrocarburos que están siendo sometidos a procesos de biorremediación en la Amazonía Ecuatoriana.

**Palabras clave:** *Bacillus*, biorremediación, exopolisacáridos, agregados del suelo, melaza de caña de azúcar.

## 2. ABSTRACT

The high degree of compaction of clay soil in the Ecuadorian Amazon is a serious problem for bioremediation. A compacted soil causes the diffusion rate of carbon dioxide and oxygen very low or even non-existent, which in turn reduces the aerobic microbial activity involved. Microbial exopolysaccharides (EPS) improve soil particle aggregation and thus soil structure. Interestingly, the genus *Bacillus* is one of the best-known genera for producing biofilms and EPS. In this context, this research focused on evaluating the EPS-producing capacity of four indigenous isolates. Sucrose and sugar cane molasses were analysed as carbon sources at different concentrations. The latter induced a higher production of the metabolite in most of the isolates. Yeast extract and tryptone were also tested as nitrogen sources. The one that significantly increased production was yeast extract. As for acid/alkaline stress, no direct influence on yield was observed, however, each of the isolates showed pH preference. In relation to salt stress, the ideal NaCl concentration also depended on the producing microorganism. The results of this research reaffirmed the hypothesis that the optimal substrate type will depend on each microorganism and its intrinsic characteristics. The bacterial isolates that stood out were BCL-SA-004 and BCL-SA-010, the latter proved to be a good EPS producer in most of the assays. Both microorganisms have biotechnological potential to be used to improve the structure of hydrocarbon-contaminated soils that are undergoing bioremediation processes in the Ecuadorian Amazon.

**Keywords:** *Bacillus*, bioremediation, exopolysaccharides, soil aggregates, sugar cane molasses.

### 3. INTRODUCCIÓN

Uno de los más grandes problemas ambientales en la Amazonía Ecuatoriana es la contaminación del suelo como consecuencia de la operación rutinaria hidrocarburífera (San Sebastian y Hurtig 2004; Benavides et al. 2006). En efecto, el registro de derrames de hidrocarburos continúa en estas zonas (Ministerio del Ambiente de Ecuador 2017; Gómez 2019 17 de mayo; Paz 2020 30 de abril). Esto, sin tomar en consideración las, al menos, 2 millones de hectáreas de suelo que han sido contaminadas con crudo o sus derivados por la transnacional Chevron-Texaco entre 1964 y 1990 (Ministerio de Relaciones Exteriores y Movilidad Humana 2015).

En efecto, la limpieza, remediación, reconformación y reforestación de aquellas áreas donde se encuentran fuentes contaminadas derivadas de la actividad hidrocarburífera anterior a 2013 es realizada por el Proyecto Amazonía Viva, que desde el 2021 forma parte de la Empresa Pública de Hidrocarburos EP Petroecuador (Moreno 2021). Hasta el momento, este proyecto ha limpiado más de 1000 fuentes de contaminación y ha remediado alrededor de 1.200.098 m<sup>3</sup> de suelo contaminado, cifra que constituye un récord histórico en la remediación ambiental del país (PETROAMAZONAS EP 2018).

La biorremediación es un proceso basado en mecanismos biológicos que tiene como objetivo reducir (degradar, desintoxicar, mineralizar o transformar) la concentración de ciertos contaminantes a un estado inocuo (Ying 2018). La técnica utilizada por EP Petroecuador es la biorremediación *ex situ*, que consiste en extraer el suelo contaminado y trasladarlo a otros lugares (biopilas) para su tratamiento (Ying 2018; PETROAMAZONAS EP 2019). Uno de los factores que inciden sobre estos procesos de biorremediación es la estructura del suelo arcilloso de la Amazonía, en donde su alto grado de compactación constituye un serio problema (Silva et al. 2011; Calvache 2015; Campaña s.f.). Esta característica hace que la tasa de difusión de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y oxígeno (O<sub>2</sub>) sea relativamente baja o inexistente (Silva et al. 2011). Lo que reduce la actividad microbiana aeróbica que participa en la biorremediación.

Las unidades básicas de la estructura del suelo son los agregados. La presencia de agregados estables define una buena estructura porque establece propiedades mecánicas y físicas como la retención y el movimiento del agua, la temperatura y, sobre todo, la aireación (Alami et al. 2000). Los agregados están compuestos por partículas de arena, limo o arcilla

unidas a partículas orgánicas, entre las que destacan células microbianas y ciertos metabolitos con propiedades adhesivas (Arfarita et al. 2016). Entre estos últimos, sobresalen las sustancias poliméricas extracelulares o exopolisacáridos (EPS) que aportan características adicionales para el acondicionamiento y mejora de la estructura del suelo (Qurashi y Sabri 2012).

Los EPS son polímeros biosintetizados por una amplia variedad de microorganismos y están involucrados en procesos esenciales para el desarrollo de comunidades microbianas (Costa et al. 2018; Henao y Mazeau 2009). En ese sentido, la modificación del suelo con estos ha jugado un papel clave en el mejoramiento de su estructura debido a su capacidad para agregar partículas (Acosta et al. 2005; Sandhya et al. 2009; Colica et al. 2014; Raliya et al. 2014; Arfarita et al. 2016). Según Alami et al. (2000) existe un notorio aumento de la estabilidad de los agregados del suelo rizosférico al adicionar inoculantes bacterianos productores de EPS. Otro estudio demostró que la inoculación de *Pseudomonas putida* GAP-P45 en suelos sometidos a condiciones de sequía, altas temperaturas y altas concentraciones de sal aumentó la estabilidad de los agregados en más del 50 %, a más de proteger a otras bacterias nativas del estrés hídrico (Sandhya y Ali 2015). Estos estudios demuestran el uso potencial de microorganismos productores de EPS en la recuperación de la estructura del suelo, especialmente aquellos bajo condiciones limitadas de oxígeno y agua, como es el caso de los suelos sometidos a procesos de biorremediación en la Amazonía; más aún si se trata de suelos arcillosos. De ahí la importancia del presente estudio: se requiere proporcionar una estrategia de mejoramiento de la estructura del suelo arcilloso contaminado con hidrocarburos y una complementación de los procesos de biorremediación para incrementar su tasa de recuperación y reducir costos de operación.

A pesar de que existen investigaciones con el mismo fin basados en otros géneros bacterianos (Gonzalez et al. 2019; Molina y Luna 2020; Zaldumbide et al. 2020), el presente estudio se enfoca en el género *Bacillus* debido a que son grandes productoras de EPS, presentan estructuras de resistencia, son biorremediadoras, son fácilmente cultivables y tienen bajos requerimientos nutricionales (Marvasi et al. 2010; Arfarita et al. 2016). Esto las hace potenciales candidatas para un posible uso industrial.

El rendimiento y la composición de los EPS microbianos están principalmente influenciados por las condiciones de cultivo como la temperatura, el pH y la composición del medio (Ergene y Avci 2017). Generalmente, la producción de EPS está determinada por grandes

concentraciones de carbono y bajas concentraciones de nitrógeno (Borgio et al. 2009). Los azúcares son los componentes más utilizados como fuente de carbono entre estos destacan la glucosa y sacarosa (Razack et al. 2013a). Sin embargo, los altos costos de estos y de las fuentes de nitrógeno, presentan un impacto directo en el costo de producción y, por consiguiente, limitan el potencial mercado de estos biopolímeros (Trindade et al. 2018). Por ello, en la actualidad para la producción de EPS a escala industrial, el reemplazar estos componentes por subproductos de desechos industriales está en auge (Ergene y Avci 2017). Esto resolvería no solo el problema de acumulación de materias primas secundarias, sino, también, abarataría el costo de biosíntesis de estos y otros metabolitos de interés, a más de ser amigables con el medio ambiente (Morillo et al. 2007; Pirog et al. 2016; Ergene y Avci 2017).

Finalmente, la producción de EPS requiere intensivas actividades de investigación para la aplicación de ideas innovadoras a gran escala (Moghannem et al. 2018). En este contexto, se propuso determinar las condiciones de cultivo óptimas de *Bacillus* spp. aisladas a partir de suelos contaminados con hidrocarburos que permitan una mayor producción de EPS. Esto permitirá, a través de futuros estudios, evaluar su papel en la mejora de la estructura de suelos contaminados con hidrocarburos sometidos a procesos de biorremediación.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Toma de muestras**

El muestreo se llevó a cabo en seis biopilas de los Centros de Gestión de Pasivos ambientales (CGP) del bloque 60 ubicado en el cantón La Joya de los Sachas, provincia de Orellana, Amazonía Ecuatoriana, entre los 0°18'S 76°51'O (Figura 1). Estos son operados por EP Petroecuador.

La toma de muestras se realizó en la parte superficial de cada biopila de manera aleatoria con un recorrido en zigzag y a una profundidad de 10-15 cm, tal como lo recomienda Schweizer (2011) del Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA) de Costa Rica.

Se obtuvieron seis muestras compuestas, conformadas por 10 submuestras simples que se juntaron y homogenizaron previamente. Cada una de estas se transportó a 4°C en oscuridad para ser procesadas rápidamente en el laboratorio de Micología de la PUCE campus Nayón.



**Figura 1. Lugar de muestreo.** Biopilas donde se realiza la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos totales de petróleo. Centros de Gestión de Pasivos ambientales (CGP), bloque 60-Sacha, Petroecuador. Cantón Joya de los Sachas, Orellana, Ecuador.

#### 4.2 Aislamiento y mantenimiento de cepas de *Bacillus* spp.

El aislamiento se llevó a cabo a partir de diluciones de suelo. Para esto, se realizó una suspensión de 10 g de cada muestra en 90 mL de agua peptonada al 0.1 % estéril y/o una solución estéril de Tween 80 al 0,1 % (v/v) (Gordillo 2018). Esta constituyó la dilución  $10^{-1}$ . Posteriormente, se hicieron diluciones decimales seriadas en base 10 hasta  $10^{-3}$  y se agitaron vigorosamente en vórtex por 20 segundos (Alef 1995).

A continuación, los tubos de dilución se sometieron a baño María a 80 °C durante 30 minutos y, luego, se dejaron en hielo por el mismo tiempo con el objetivo de seleccionar

bacterias productoras de esporas, en este caso del grupo *Bacillus*, presentes en las diluciones (Tejera et al. 2013).

Tras estos procedimientos, 0,1 mL de las diluciones se sembraron en superficie en medio agar triptona soya (TSA) y se incubaron en aerobiosis a 27 °C por 48 horas.

De las placas de TSA sembradas se tomaron aquellas colonias que cumplieron con las características de crecimiento propias del género *Bacillus* de acuerdo con el manual de Bacteriología Determinativa de Bergey y Holt (1994) y Ramírez y Sánchez (2011). Los aislados que presentaron estas características fueron verificados mediante tinción Gram para comprobar su morfología bacilar Gram positiva y presencia de endospora, a partir de cultivos puros (Anexo 1) (Argianas 2015).

Finalmente, cada aislado sospechoso de pertenecer al género de interés fue conservado por triplicado mediante crío preservación en microtubos con caldo infusión cerebro corazón (BHI) y glicerol al 20 % y almacenados a -80 °C (Ramírez y Sánchez 2011).

#### **4.3 Screening cualitativo y cuantitativo de cepas potencialmente productoras de EPS**

Los aislados crío-preservados fueron reactivados en placas TSA a 27 °C por 24 horas (Ergene y Avci 2017). Para seleccionar aquellos potencialmente productores de EPS se tomó en cuenta la textura de sus colonias con la prueba del cordón. Así también, se realizó un *screening* cuantitativo; para esto, cada cepa se cultivó en un medio basal líquido (MBL) compuesto de: 20 g de sacarosa, 5 g de extracto de levadura, 1,5 g de fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ ) y 1 g de sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ) en 1000 mL de agua desionizada. El pH del medio fue ajustado a 7 previa su esterilización a 121°C durante 15 minutos (Kumar et al. 2004; Abou et al. 2014). Los ensayos de producción se realizaron por triplicado en tubos con 4 mL de MBL a los que se inoculó 1 mL de los cultivos frescos de cada aislado con turbidez equivalente al 0,5 de la escala de MacFarland (inóculos de 20 % v/v) y fueron incubados a 27 °C durante 48 horas (Ergene y Avci 2017). Los EPS producidos se extrajeron como se describe más adelante en la Sección 4.7. según Kılıç y Dönmez (2008) y se determinaron las cantidades de azúcares totales mediante el método de fenol ácido-sulfúrico (Dubois et al. 1956).

De esta manera, se seleccionaron cuatro aislados bacterianos que, según el análisis estadístico realizado en el programa SPSS y el *screening* cualitativo, produjeron la mayor cantidad de EPS. Estos fueron utilizados en ensayos posteriores.

#### **4.4 Identificación fenotípica de *Bacillus* spp. potencialmente productoras de EPS**

Para los aislados potencialmente productores de EPS, se realizó, a más de la identificación microscópica previa (Argianas 2015), una caracterización bioquímica, mediante pruebas de catalasa y oxidasa y la batería de identificación API 50 CHB, según el manual de Bacteriología Determinativa de Bergey y Holt (1994) y la casa comercial.

#### **4.5 Identificación molecular de *Bacillus* spp. potencialmente productoras de EPS**

##### *4.5.1 Extracción de ADN. -*

La extracción se realizó con el kit AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer Corporation, Corea del Sur) para bacterias Gram positivas, de acuerdo con los protocolos establecidos por la casa comercial. La concentración del ADN extraído se obtuvo mediante fluorometría con el kit QuantiFluor® dsDNA System (Promega, USA). Posteriormente este se almacenó a -20 °C para los análisis moleculares futuros.

##### *4.5.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa. -*

Para la identificación molecular de las cepas, se usó el gen ARNr 16S. La amplificación se realizó según lo descrito por Goto et al (2000) con los siguientes cebadores: HVc\_F 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCC TAA TAC ATG CAA GTC GAG CG-3 y HVc\_R 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'.

Cada mezcla de PCR tuvo un volumen final de 25 µL. Se utilizó la premezcla GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) y se adecuaron los volúmenes de cada componente de la reacción conforme lo describe el fabricante. La PCR se realizó con el siguiente programa: 95 °C por 2 minutos (desnaturalización inicial), 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, seguida de 58 °C por 1 minuto (hibridación de los cebadores) y una fase de extensión final a 72 °C durante 2 minutos (Íspirli y Dertli 2018). Los amplicones fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.6 % (p/v) a 95 V durante 1,5 horas.

##### *4.5.3 Secuenciación. -*

El producto de PCR fue purificado enzimáticamente con exonucleasa I y fosfatasa alcalina para su posterior secuenciación por electroforesis capilar-método de Sanger en los Laboratorios de Investigación de la Universidad de las Américas UDLA.

Finalmente, las secuencias obtenidas se compararon en la base de datos del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) mediante la herramienta informática básica de búsqueda de alineación local (BLAST, por sus siglas en inglés) (Altschul et al. 1990).

#### **4.6 Ensayos de producción de EPS en condiciones definidas**

##### *4.6.1 Preparación de inóculos. -*

Las cuatro cepas crío-preservadas fueron reactivadas en placas de TSA a 27 °C durante 24 horas. Posteriormente, las colonias aisladas se inocularon en tubos con 5 mL de caldo BHI ajustándolos a una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de MacFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). La turbidez de los inóculos de cada cepa se comparó visualmente con el estándar al colocar los tubos frente a la tarjeta de Wickerham. Estos fueron usados como inóculos para los ensayos de producción de EPS (Ergene y Avci 2017; Hassan y Ibrahim 2017).

##### *4.6.2 Producción de EPS en función de parámetros nutricionales. -*

Para la producción de EPS por parte de *Bacillus* spp., se empleó el MBL descrito en la Sección 4.3. La formulación de este medio se modificó con las distintas concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno que fueron evaluadas de manera individual.

Para evaluar la mejor fuente de carbono en la producción de EPS se utilizó la metodología aplicada por Ergene y Avci (2017). Al MBL se le agregó la fuente de carbono en concentraciones de: 20, 30 y 50 g/L, con pH final de 7. Las fuentes de carbono probadas fueron: melaza y glicerol. Como testigo se evaluó 20 g/L de sacarosa, que es la fuente de carbono y concentración usual en el MBL propuesto (Razack et al. 2013a).

Por otro lado, para evaluar las mejores fuentes orgánicas de nitrógeno se probaron el extracto de levadura y triptona y estas se agregaron al MBL en concentraciones de 0,5, 1,0 y 3,0 g/L con pH final de 7. Como testigo se evaluó 5 g/L de extracto de levadura que es la fuente de nitrógeno y concentración usual en el MBL (Razack et al. 2013a).

#### 4.6.3 *Producción de EPS en función del pH.* -

Para determinar el efecto del pH en la producción de EPS se prepararon tubos con MBL y se ajustó el pH a 4, 6 y 8. Para esto se usaron soluciones de hidróxido de sodio ( $\text{Na (OH)}_2$  2M) y ácido clorhídrico (HCl 2M) según fue necesario (Abou et al. 2014; Hassan y Ibrahim 2017). Como testigo, se preparó el MBL con un pH de 7.

#### 4.6.4 *Producción de EPS en función de salinidad.* -

Este ensayo se basó en la metodología propuesta por Razack et al. (2013b). El MBL fue preparado con las siguientes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl): 0.3 %, 0.7 % y 1 %. Como testigo se utilizó el MBL sin añadir NaCl.

Para montar los ensayos respectivos, se emplearon los inóculos descritos en la Sección 4.6.1. Cada cepa bacteriana fue inoculada (inóculos de 20 % v/v) en 4 mL de MBL estéril con la fuente nutricional respectiva y los distintos valores de pH o salinidad, según fuera el caso. Los tubos se incubaron a 27 °C por 48 horas (Trindade et al. 2018). Los tratamientos se realizaron por triplicado para obtener resultados estadísticamente significativos (Sánchez 2002).

### **4.7 Determinación de EPS**

#### 4.7.1 *Extracción y cuantificación.* -

La extracción de EPS de los cultivos bacterianos se realizó por el método de precipitación con etanol frío a 4 °C de acuerdo con Kılıç y Dönmez (2008) con ciertas modificaciones (Anexo 2).

Para los análisis cuantitativos, en términos de carbohidratos totales, se aplicó el método fenol ácido-sulfúrico modificado propuesto por Dubois et al. (1956) con el uso de glucosa como estándar y descrito por Goh et al. (2005). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 485 nm mediante el espectrofotómetro VIS GENESYS SERIE 10; con el fin de medir la reacción colorimétrica producida por la combinación de los azúcares de la muestra, el fenol y el ácido sulfúrico (Dubois et al. 1956), como blanco se utilizó  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M. Los resultados se registraron en una tabla de Excel y se interpretaron con la ayuda de una curva de calibración estándar, efectuada con antelación (Anexo 3).

#### 4.8 Análisis estadístico de los datos

Se condujeron un total de cuatro ANOVA's bifactoriales de manera individual con el fin de estudiar simultáneamente los efectos de dos fuentes de variación, en este caso las variables independientes (fuentes de carbono y nitrógeno y factores de estrés) (Anexo 4) y cada uno de los aislados bacterianos (así como su posible interacción) sobre la producción de EPS. Las diferencias significativas entre las medias de cada tratamiento fueron determinadas mediante la prueba de Tukey. De modo complementario, para todas las variables de estudio se calculó el Coeficiente de Variación (CV), que estuvo dentro del límite aceptable ( $\leq 20\%$ ) (Sánchez 2002).

### 5. RESULTADOS

#### 5.1 Aislamiento de *Bacillus* spp. aisladas de suelos arcillosos de la Amazonía Ecuatoriana sometidos a procesos de biorremediación.

Tras aplicar las técnicas microbiológicas apropiadas se aislaron 12 cepas bacterianas que cumplieron con las características de crecimiento propias del género *Bacillus*, de acuerdo con el manual de Bacteriología Determinativa de Bergey y Holt (1994) y Ramírez y Sánchez (2011). Estas características fueron descritas como corresponde en el Anexo 5.

#### 5.2 Screening cualitativo y cuantitativo de cepas potencialmente productoras de EPS

Los datos medios de concentración de EPS  $\mu\text{g/mL}$  producidos por los 12 aislados bacterianos (Tabla 1) fueron analizados mediante ANOVA de un factor previa su transformación logarítmica. Los resultados indicaron diferencias altamente significativas entre cada aislado ( $p < 0,05$ ) (Anexo 6). Destacaron: BCL-SA-004, BCL-SA-005 y BCL-SA-010 como aquellos que produjeron más EPS, con un promedio de: 157  $\mu\text{g/mL}$ , 132,5  $\mu\text{g/mL}$  y 530,2  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. De manera adicional, se incluyó la cepa BCL-SA-014 debido a la textura altamente mucoide de sus colonias, esta selección fue de tipo cualitativa.

**Tabla 1. Screening cuantitativo. Concentración de EPS ( $\mu\text{g/mL}$ ) producidos por los aislados bacterianos.**

Código de aislado	Concentración de EPS ( $\mu\text{g/mL}$ )
-------------------	--

---

 (Continuación...)

BCL-SA-002	104,26 ± 3,15*
BCL-SA-003	59,65 ± 1,92*
BCL-SA-004	157,04 ± 2,77*
BCL-SA-005	132,55 ± 3*
BCL-SA-006	87,4 ± 2,31*
BCL-SA-008	60,19 ± 0,46*
BCL-SA-009	104,81 ± 0,31*
BCL-SA-010	530,26 ± 10,77*
BCL-SA-011	87,94 ± 0,08*
BCL-SA-013	73,25 ± 1,69*
BCL-SA-014	70,53 ± 4,23*
BCL-SA-015	75,43 ± 0,92*

---

 \* Desviación estándar

### 5.3 Identificación fenotípica de *Bacillus* spp. potencialmente productoras de EPS

En cada cepa se describieron tanto características macro y microscópicas tal y como se mencionó con anterioridad. Mediante pruebas complementarias se estableció que todas son productoras de la enzima catalasa a excepción de BCL-SA-014; por otro lado, todas produjeron la enzima oxidasa. Gracias a los sistemas miniaturizados API 50CHB y API 20E se estableció que son capaces de metabolizar distintas fuentes de carbono y producir ciertas enzimas o metabolitos (Anexo 7). Los perfiles bioquímicos obtenidos tras el análisis en la base de datos suministrada por el fabricante, arrojaron que el aislado BCL-SA-004 correspondería a *Brevibacillus laterosporus* con un porcentaje de identidad del 99,9 %, BCL-SA-005 a *Bacillus cereus* con un 83,8 % de identidad y el perfil bioquímico de BCL-SA-010 coincidió en un 99,8 % con el de *Bacillus licheniformis*. Los datos del aislado BCL-SA-014 no coincidieron con la base de datos analizada, por tal motivo no se logró determinar su posible identificación.

### 5.4 Identificación molecular de *Bacillus* spp. potencialmente productoras de EPS

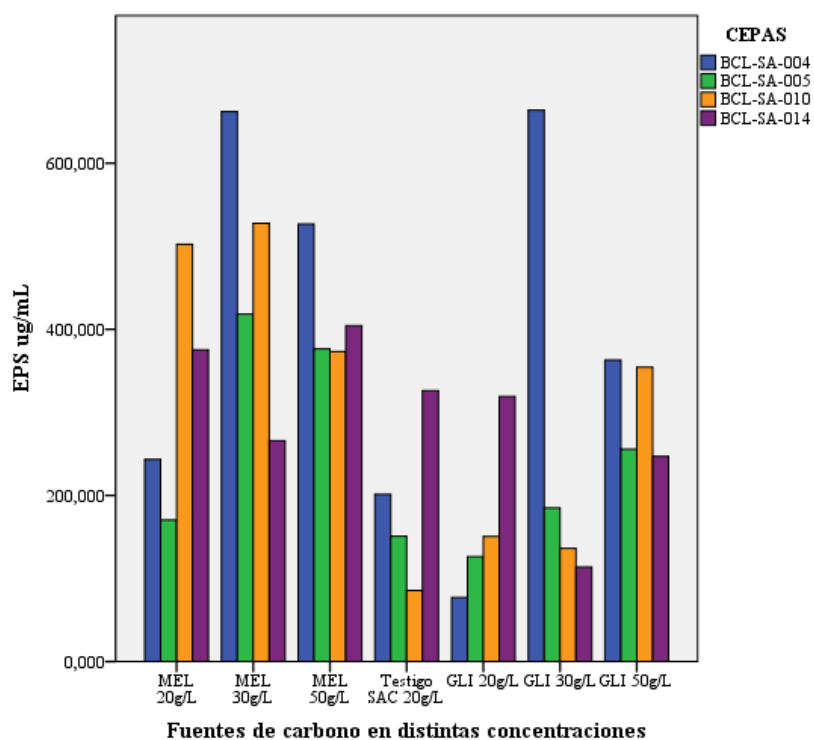
Lamentablemente no logró extraerse el ADN de las cepas BCL-SA-004 y BCL-SA-014 y por motivos de tiempo, no se consiguió la identificación molecular de estas. Por otro lado, con

la amplificación del gen ARNr 16S de los dos aislados restantes se obtuvieron amplicones de peso molecular de aproximadamente 315 pb. El análisis de las secuencias consenso mediante la herramienta BLAST determinó que el aislado BCL-SA-005 presenta un porcentaje de identidad del 98.39% con la especie *Bacillus cereus* y BCL-SA-010 corresponde a *Bacillus licheniformis* con un porcentaje del 100%.

## 5.5 Ensayos de producción de EPS en condiciones definidas

### 5.5.1 Fuentes de carbono. -

En la tabla y figura 2 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a la cantidad media de EPS producidos cuando se utiliza melaza o glicerol en distintas concentraciones.



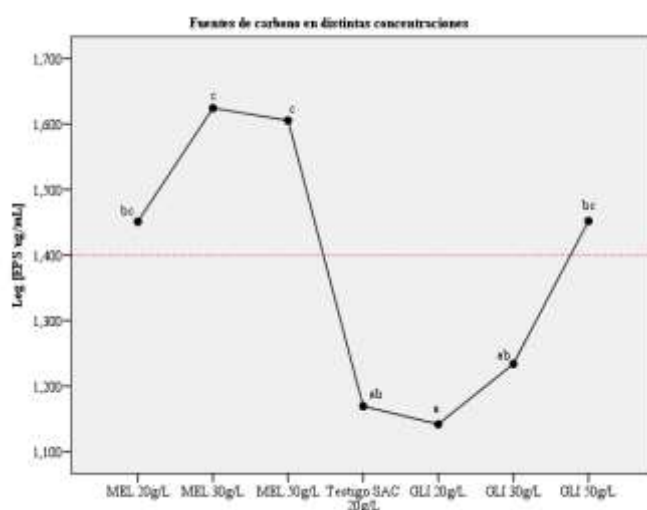
**Figura 2. Producción de EPS bajo distintas fuentes de carbono.** Cantidad media de EPS  $\mu\text{g/mL}$  producida por cada cepa. MEL: melaza, GLI: glicerol y SAC: sacarosa.

**Tabla 2. Efecto de distintas fuentes de carbono en la producción de EPS por parte de *Bacillus* spp.**

CÓDIGO DE AISLADO	CONCENTRACIÓN DE EPS ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	Fuentes de carbono						
	MELAZA			GLICEROL			TESTIGO
	A	B	C	A	B	C	X
<b>BCL-SA-004</b>	243,4 $\pm$ 109,1*	661,9 $\pm$ 380,4 *	526,6 $\pm$ 280,5*	77,2 $\pm$ 4,4*	663,7 $\pm$ 520,4*	363,1 $\pm$ 189,6*	201,3 $\pm$ 206,1*
<b>BCL-SA-005</b>	170,5 $\pm$ 24,8*	418,2 $\pm$ 108,3*	376,5 $\pm$ 31,6*	126,2 $\pm$ 67,3*	185,0 $\pm$ 154,5*	255,7 $\pm$ 153,6*	150,9 $\pm$ 32,6*
<b>BCL-SA-010</b>	502,3 $\pm$ 101,9*	527,7 $\pm$ 136,9*	373,2 $\pm$ 43,3*	150,5 $\pm$ 79,4*	136,4 $\pm$ 28,1*	354,3 $\pm$ 49,1*	85,6 $\pm$ 14,4*
<b>BCL-SA-014</b>	375,4 $\pm$ 189,2*	265,8 $\pm$ 27,5*	404,4 $\pm$ 135,7 *	319,2 $\pm$ 44,9*	113,9 $\pm$ 34,0*	247,0 $\pm$ 60,5*	326,1 $\pm$ 210,3*

(A): 20 (g/L). (B): 30 (g/L). (C): 50 (g/L). (X): sacarosa 20 (g/L) (testigo). Los datos están representados por el promedio de las tres réplicas  $\pm$  la desviación estándar\*.

Los resultados del ANOVA bifactorial (Anexo 8) muestran que la concentración de EPS dependió tanto de la fuente de carbono empleada y su concentración como de la cepa en la que se probaron dichas fuentes ( $p < 0,05$ ). Tras el análisis con la prueba de Tukey (Figura 3) se determinó que el uso de melaza, especialmente a una concentración de 30 g/L, aumentó considerablemente la producción de EPS con respecto a la sacarosa (testigo) que es la fuente de carbono usual en el MBL. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas cuando se usó glicerol en concentraciones de 20 y 30 g/L como fuente de carbono con respecto al testigo (Figura 3).

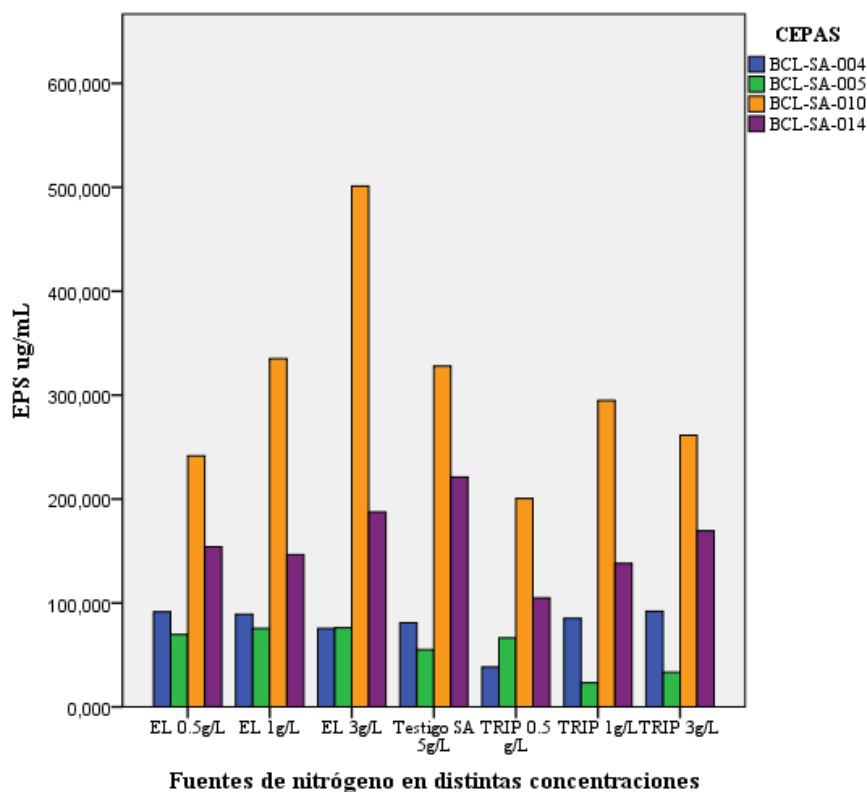


**Figura 3. Efectos principales en la producción de EPS por parte de las distintas fuentes de carbono: melaza y glicerol con 20, 30 y 50 g/L. Testigo: sacarosa. Las letras diferentes indican diferencias significativas (basadas en la prueba HSD de Tukey  $p < 0,05$ ) entre los niveles del factor analizado.**

Igualmente, se detectó con qué fuente de carbono cada una de las cepas indujo una mayor producción. En BCL-SA-004, 005 y 010 la melaza, a una concentración de 30 g/L, es la mejor fuente de carbono. Con respecto a la cepa BCL-SA-014 la fuente de carbono que indujo una mayor producción así mismo fue la melaza, pero a una concentración de 50 g/L (Anexo 9).

### 5.5.2 Fuentes de nitrógeno. -

En la tabla 3 y figura 4 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a la cantidad media de EPS producidos por *Bacillus* spp., cuando se agrega extracto de levadura o triptona en distintas concentraciones al MBL.



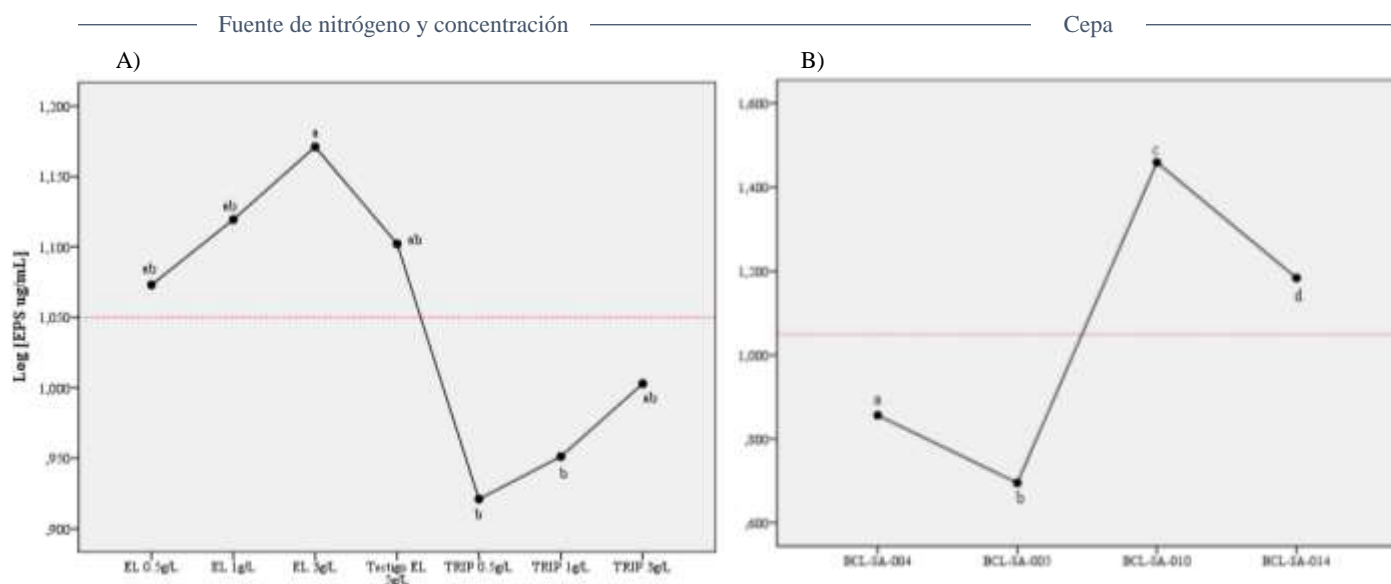
**Figura 4. Producción de EPS bajo distintas fuentes de nitrógeno.** Cantidad media de EPS µg/mL producida por cada cepa. **EL:** extracto de levadura, **TRIP:** triptona.

**Tabla 3. Efecto de distintas fuentes orgánicas de nitrógeno en la producción de EPS por parte de *Bacillus* spp.**

CÓDIGO DE AISLADO	CONCENTRACIÓN DE EPS ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	Fuentes de nitrógeno						
	EXTRACTO DE LEVADURA			TRIPTONA			TESTIGO
	A	B	C	A	B	C	X
<b>BCL-SA-004</b>	89,2 $\pm$ 21,2 <sup>*</sup>	91,4 $\pm$ 51,1 <sup>*</sup>	75,4 $\pm$ 8,9 <sup>*</sup>	38,4 $\pm$ 17,1 <sup>*</sup>	85,2 $\pm$ 22,6 <sup>*</sup>	92,1 $\pm$ 57,1 <sup>*</sup>	80,9 $\pm$ 21,8 <sup>*</sup>
<b>BCL-SA-005</b>	69,6 $\pm$ 12,8 <sup>*</sup>	75,4 $\pm$ 28,1 <sup>*</sup>	76,2 $\pm$ 24,9 <sup>*</sup>	66,4 $\pm$ 22,2 <sup>*</sup>	23,2 $\pm$ 15 <sup>*</sup>	33,4 $\pm$ 13,1 <sup>*</sup>	55,1 $\pm$ 29,1 <sup>*</sup>
<b>BCL-SA-010</b>	241,5 $\pm$ 99,2 <sup>*</sup>	335,1 $\pm$ 78,2 <sup>*</sup>	501,2 $\pm$ 126,0 <sup>*</sup>	200,6 $\pm$ 6,6 <sup>*</sup>	294,9 $\pm$ 113,7 <sup>*</sup>	261,5 $\pm$ 52,9 <sup>*</sup>	327,9 $\pm$ 132,2 <sup>*</sup>
<b>BCL-SA-014</b>	154,1 $\pm$ 28,4 <sup>*</sup>	146,5 $\pm$ 16,9 <sup>*</sup>	187,5 $\pm$ 68,1 <sup>*</sup>	104,8 $\pm$ 8,7 <sup>*</sup>	138,2 $\pm$ 1,7 <sup>*</sup>	169,4 $\pm$ 65,6 <sup>*</sup>	221,2 $\pm$ 106,6 <sup>*</sup>

(A): 0,5 (g/L), (B): 1,0 (g/L), (C): 3,0 (g/L), (X): extracto de levadura 5 (g/L) (testigo). Los datos están representados por el promedio de las tres réplicas  $\pm$  la desviación estándar\*.

Con el ANOVA bifactorial (Anexo 10) se determinó que el comportamiento de los cuatro aislados bacterianos fue significativamente diferente entre sí y que la producción de EPS dependió tanto de la fuente de nitrógeno empleada y su concentración como de las características intrínsecas de cada cepa ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, en términos generales, el uso de extracto de levadura como fuente de nitrógeno aumentó significativamente la producción de EPS en comparación con la triptona (Figura 5A); inclusive esta última disminuye la producción con respecto al tratamiento testigo (extracto de levadura 5 g/L).



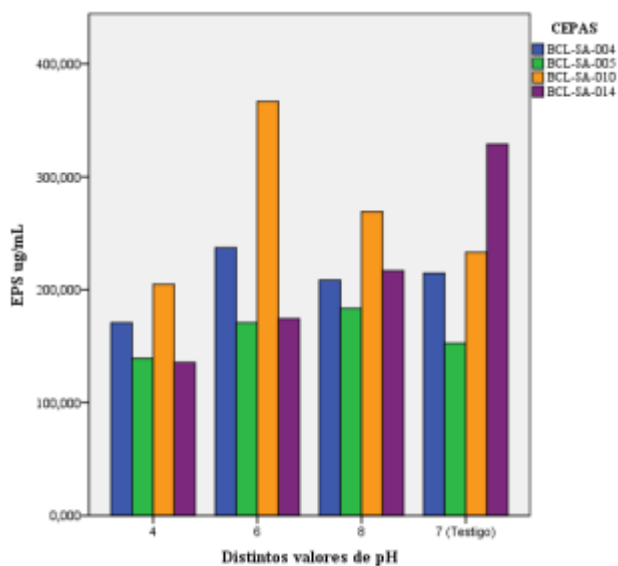
**Figura 5. Efectos principales en la producción de EPS por la fuente de nitrógeno (A): extracto de levadura (EL) y triptona (TRIP) 0,5, 1 y 3 g/L y por la cepa (B): BCL-SA-004, BCL-SA-005, BCL-SA-010 y BCL-SA-014. Las letras diferentes indican diferencias significativas (basadas en la prueba HSD de Tukey,  $p < 0,05$ ) entre los niveles de cada factor.**

Entre todas las cepas estudiadas, la que más produjo EPS en todos los tratamientos fue BCL-SA-010, seguida de BCL-SA-014 y BCL-SA-004, la cepa menos productora fue BCL-SA-005 (Figura 5B) La fuente de nitrógeno que indujo una mayor producción de EPS en BCL-SA-010 y BCL-SA-005 fue el extracto de levadura 3 g/L, en BCL-SA-014 se observó una mayor producción de EPS con el tratamiento testigo (extracto de levadura 5 g/L) y en BCL-SA-004 el extracto de levadura 1 g/L (Anexo 11).

### 5.5.3 Valores de pH.-

La cantidad media de EPS producidos en este ensayo por parte de *Bacillus* spp. bajo pH's de 4, 6, 7 y 8 se muestra en la tabla 4 y en la figura 6.

Los distintos valores de pH evaluados no tuvieron un efecto significativo en la producción ( $p > 0,05$ ) (Anexo 12). A pesar de estos resultados, tras un análisis de comparativo, se observó que cuando el MBL tuvo un pH ácido (4) la producción de EPS fue baja, y cuando se trabajó con un pH neutro y alcalino esta aumentó considerablemente (Figura 7A). Además, se determinó que BCL-SA-010 fue la cepa que más produjo EPS en el ensayo (Figura 7B) tras compararla con las demás. Cada cepa mostró su preferencia de pH, así BCL-SA-004 y 010 produjeron más del metabolito cuando el MBL tuvo un pH de 6; mientras que la cepa BCL-SA-005 con un pH de 8 y BCL-SA-014 cuando el MBL tuvo un pH de 7 que es el usual en el medio de cultivo (testigo) (Anexo 13).



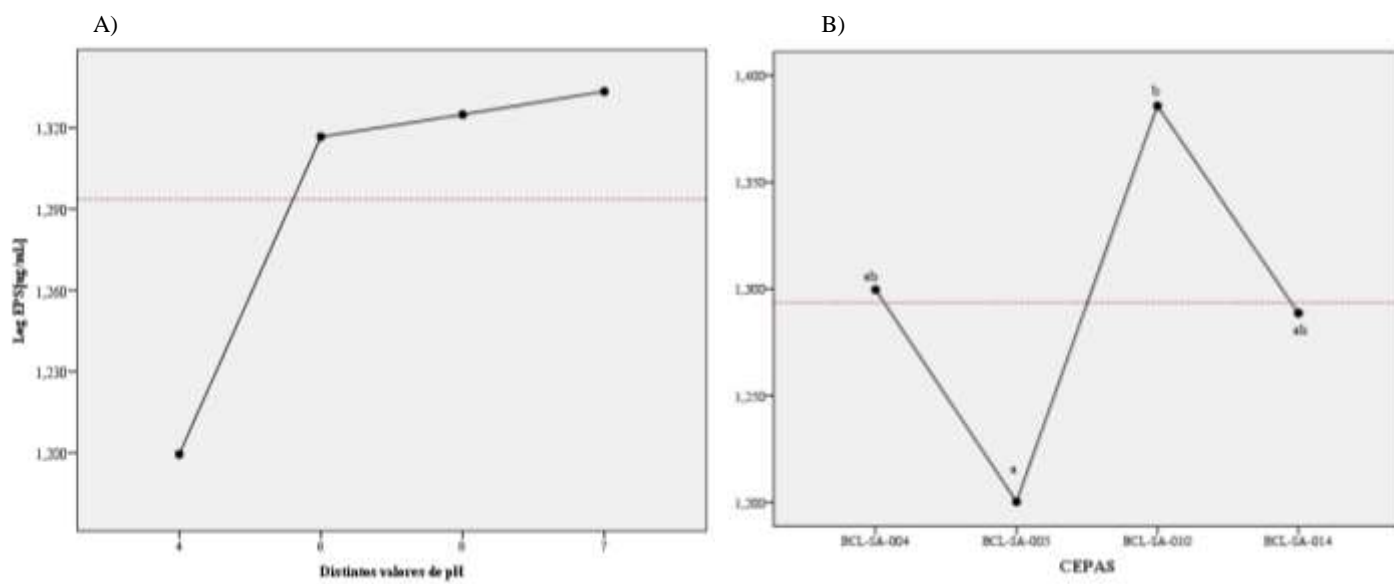
**Figura 6. Producción de EPS bajo distintos valores de pH.** Cantidad media de EPS µg/mL producida por cada cepa.

**Tabla 4. Efecto de los distintos factores de estrés en la producción de EPS por parte de *Bacillus* spp.**

CÓDIGO DE AISLADO	CONCENTRACIÓN DE EPS ( $\mu\text{g/mL}$ )							
	Factores de estrés							
	ÁCIDO/ALCALINO				SALINO			
	pH 4	pH 6	pH 8	pH 7 <sup>T</sup>	0,3 % NaCl	0,7 % NaCl	1,1 % NaCl	0 % NaCl <sup>T</sup>
BCL-SA-004	170,8 $\pm$ 54,6 <sup>*</sup>	237,2 $\pm$ 83,7 <sup>*</sup>	208,5 $\pm$ 67,6 <sup>*</sup>	214,7 $\pm$ 68,8 <sup>*</sup>	150,5 $\pm$ 16 <sup>*</sup>	261,9 $\pm$ 121,5 <sup>*</sup>	261,9 $\pm$ 42,1 <sup>*</sup>	170,5 $\pm$ 25,8 <sup>*</sup>
BCL-SA-005	139,3 $\pm$ 19,7 <sup>*</sup>	170,8 $\pm$ 34,0 <sup>*</sup>	183,5 $\pm$ 52,5 <sup>*</sup>	152,7 $\pm$ 20,7 <sup>*</sup>	186,8 $\pm$ 79,8 <sup>*</sup>	167,6 $\pm$ 8,9 <sup>*</sup>	151,6 $\pm$ 3,3 <sup>*</sup>	196,6 $\pm$ 11,9 <sup>*</sup>
BCL-SA-010	204,9 $\pm$ 18,3 <sup>*</sup>	366,7 $\pm$ 339,2 <sup>*</sup>	269,1 $\pm$ 52,5 <sup>*</sup>	233,2 $\pm$ 37,9 <sup>*</sup>	315,2 $\pm$ 84,7 <sup>*</sup>	375,7 $\pm$ 100,1 <sup>*</sup>	375,4 $\pm$ 14,2 <sup>*</sup>	221,2 $\pm$ 9,5 <sup>*</sup>
BCL-SA-014	135,6 $\pm$ 22,4 <sup>*</sup>	174,4 $\pm$ 30,3 <sup>*</sup>	216,9 $\pm$ 79,2 <sup>*</sup>	329,0 $\pm$ 196,0 <sup>*</sup>	186,1 $\pm$ 47,3 <sup>*</sup>	148,3 $\pm$ 89,7 <sup>*</sup>	223,0 $\pm$ 89,1 <sup>*</sup>	372,5 $\pm$ 201,3 <sup>*</sup>

<sup>T</sup> testigo

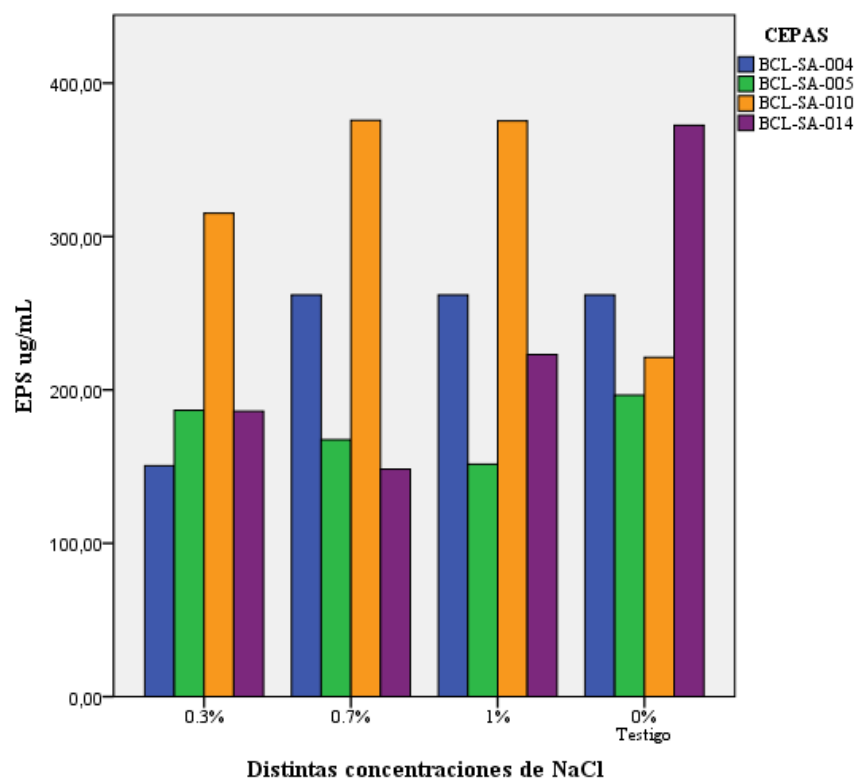
Los datos están representados por el promedio de las tres réplicas  $\pm$  la desviación estándar\*.



**Figura 7. (A) Producción de EPS bajo distintos valores de pH. (B) Efectos principales en la producción de EPS por parte del tipo de cepa: BCL-SA-004, BCL-SA-005, BCL-SA-010 y BCL-SA-014. Las letras diferentes indican diferencias significativas (basadas en la prueba HSD de Tukey ( $p < 0,05$ ) entre los niveles del factor analizado.**

#### 5.5.4 Concentraciones de NaCl. -

La cantidad media de EPS producidos por parte de las cuatro cepas de *Bacillus* spp. en este ensayo se observa en la tabla 4 y figura 8.



**Figura 8. Producción de EPS bajo distintas concentraciones de NaCl.** Cantidad media de EPS µg/mL producida por cada cepa.

El análisis bifactorial mostró que la cantidad de EPS dependió de la concentración de NaCl en el MBL y la cepa en la que se probaron dichas concentraciones ( $p < 0,05$ ) (Anexo 14). Las cepas BCL-SA-004, 005 y 014 produjeron más cuando el medio no tenía NaCl (testigo), mientras que la cepa BCL-SA-010 produjo más del metabolito cuando el MBL tenía NaCl al 1%. De hecho, esta fue la que más produjo EPS en todos los ensayos a comparación con las otras; tal y como se observa en el anexo 15 al realizar las comparaciones múltiples con la prueba de Tukey.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Aislamiento e identificación de *Bacillus* spp. potencialmente productoras de EPS

Una de las funciones de los EPS microbianos que ha sido ampliamente explorada es su capacidad de agregar partículas de suelo y participar directamente en su estructura, salud y fertilidad (Costa et al. 2018). Entre los productores bacterianos, más investigados por su potencial de agregación del suelo, se encuentran *Bacillus* spp. (Hassan y Ibrahim 2017; Costa

et al. 2018). Las bacterias pertenecientes a este género son excelentes degradadoras de compuestos hidrocarbonados; su eficacia en la biorremediación de matrices contaminadas ha sido reportada en varios estudios (Sorkhoh et al. 1993; Prado et al. 2005; Darsa et al. 2014; Masika et al. 2020). Estos microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en el ecosistema, sin embargo, estudios científicos reportan que los microorganismos autóctonos y adaptados son mucho más eficientes en las funciones requeridas ya que tienen la habilidad de sobrevivir en los lugares de los que fueron aislados (Akhavan et al. 2008; Majumder et al. 2013; Kumar y Gopal 2015; Arfarita et al. 2016; Mandree et al. 2021).

En esta investigación, se lograron aislar cuatro cepas nativas de *Bacillus* productoras de EPS a partir de los suelos contaminados con hidrocarburos totales de petróleo sometidos a procesos de biorremediación. Los resultados del perfil fenotípico, bioquímico y morfológico identificado en cada una de ellas permitieron determinar que estas podrían pertenecer a los géneros *Brevibacillus* y *Bacillus*. Este supuesto se confirmó posteriormente, en dos de las cepas, con el uso de herramientas moleculares, las mismas que ratificaron los resultados preliminares y corresponden a: *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*.

## **6.2 Ensayos de producción de EPS en condiciones definidas**

Efecto de distintas fuentes de carbono. -

Se sabe que la producción de EPS es estimulada por grandes cantidades de azúcares en el medio de cultivo (Abou et al. 2014); estos son utilizados principalmente como fuentes de carbono, sin embargo, sustratos más baratos como los residuos o subproductos agroalimentarios o industriales han demostrado ser excelentes fuentes de carbono para la producción de EPS (Goksungur et al. 2004; Freitas et al. 2011; Seesuriyachan et al. 2011; Ogidi et al. 2020). La melaza de caña de azúcar es un subproducto de la industria azucarera con un alto contenido de azúcares (aproximadamente el 50 %) que pueden ser fácilmente fermentados por los microorganismos; esta característica la convierte en un potencial sustrato para la fermentación microbiana biotecnológica (Carioca y Leal 2011). Precisamente en este estudio se evaluó el efecto de distintas concentraciones de melaza de caña de azúcar en la producción de EPS por parte de los cuatro aislados bacterianos.

El levano es el EPS más conocido que produce *Bacillus* spp; es sintetizado por la enzima levansacarasa a partir de la sacarosa (Rojas 2020); dado que el principal azúcar que se encuentra en la melaza es la sacarosa (Clarke 2003); lo más probable es que los aislados bacterianos produjeron este tipo de EPS. Contrariamente, cuando se utilizó la sacarosa pura como fuente de carbono, la producción disminuyó notoriamente; estos resultados pueden sugerir que la presencia de otros nutrientes en la melaza como aminoácidos, vitaminas y minerales promovieron significativamente esta producción (Jeyaram et al. 2018). Resultados similares fueron obtenidos por Razack et al. (2013b) quienes evaluaron la producción de EPS por parte de *B. subtilis* a partir de melaza de caña de azúcar y sacarosa con 4,86 y 2,98 (g/L) de EPS, respectivamente. Otro estudio realizado por Ergene y Avcı (2017) demostró que *Bacillus* sp. ZBP4 produjo más EPS cuando se usaron como sustrato el suero de leche (que contiene lactosa y proteínas) y melaza con las que obtuvieron 452 y 505 (mg/L) respectivamente; en comparación con la sacarosa y la lactosa puras con la que se obtuvieron 243 y 220 (mg/L) de EPS.

La otra fuente de carbono evaluada en este estudio fue el glicerol. Los resultados indicaron que este y la sacarosa no tuvieron diferencias significativas en cuanto a la producción de EPS. La ruta metabólica del glicerol consume gran cantidad de energía a comparación con las rutas metabólicas de la sacarosa o glucosa (Entner-Duodoroff o fosfogluconato) para la biosíntesis de EPS (Rosalam y England 2006; Li et al. 2015). Esta podría ser la razón por la que no se obtuvieron cantidades significativas de EPS cuando se usó esta fuente de carbono tras 48 horas de incubación. Probablemente, si se prolonga más el tiempo de fermentación se lograrían obtener cantidades significativas del biopolímero. Estas hipótesis coinciden con los informes de Bretz (2015), Swinnen et al. (2013) y Wang et al. (2016) con respecto al uso de glicerol como fuente de carbono para sintetizar productos mediante fermentación. Por otro lado, evidencia de la posible inhibición de la producción de EPS por parte del glicerol ha sido también reportada en el cultivo de *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 y *Pediococcus parvulus*; sin embargo, se requieren más estudios enfocados en este tema (Torino et al. 2005; Jeyaram et al. 2018).

Como se observó en el análisis estadístico la producción de EPS dependió tanto de la fuente de carbono y concentración como de la cepa en la que se probó dicha fuente. Este argumento concuerda con una serie de investigaciones sobre el efecto de la concentración del sustrato y sugieren que el tipo y la concentración óptima varía en función de cada

microorganismo. Por ejemplo, Mata et al. (2006) establecieron que *Halomonas anticariensis* produce gran cantidad de EPS con una concentración de glucosa al 1 %. *Bacillus licheniformis* produce la cantidad máxima de EPS (~600 mg/L) con sacarosa al 2 % (Larpin et al. 2002). Por otro lado, existen microorganismos que requieren concentraciones de sustrato mucho más altas como *Paenibacillus jamilae* que produjo 5,1 g/L de EPS con un 80 % de aguas residuales de almazaras (industria del aceite de oliva) como fuente de carbono (Morillo et al. 2007) y *Rhizobium radiobacter* que produjo 2 834 mg/L de EPS con un 10 % de suero de leche (Zhou et al. 2014).

Efecto de distintas fuentes de nitrógeno. -

Existen reportes que sugieren que una limitación de nitrógeno en el medio de cultivo tiende a aumentar la producción de EPS (Goksungur et al. 2004; Razack et al. 2012; Hassan y Ibrahim 2017; Malick et al. 2017); basados en estos estudios se evaluaron concentraciones bajas de extracto de levadura y triptona entre 0,5 y 3 g/L.

Los resultados mostraron que el uso de extracto de levadura como fuente de nitrógeno aumenta significativamente la producción de EPS a comparación con la triptona. En las investigaciones realizadas por Abou et al. (2014) se obtuvieron resultados similares; en este caso, el extracto de levadura fue la fuente de nitrógeno que producía el máximo rendimiento de EPS en *Bacillus subtilis* a comparación con otras fuentes como la peptona, extracto de carne, triptona, sulfato de amonio y la combinación de estos. Así mismo, Razack et al. (2013b) establecieron que el extracto de levadura indujo la máxima producción en *Bacillus subtilis* (1,38 g/L) a comparación con el extracto de carne, peptona, cloruro de amonio y nitrato de sodio. *Bacillus zhangzhouensis* BZ16 mostró una mayor productividad (11,22 g/L) con el uso de extracto de levadura como única fuente de nitrógeno; inclusive resultó mejor que al ser mezclada con peptona proteica (Miri et al. 2021).

El extracto de levadura no solo actúa como fuente de nitrógeno, este suplemento contiene a su vez vitaminas y factores de crecimiento que desempeñan un rol importante en la inducción del crecimiento bacteriano y la producción de EPS (Sivakumar et al. 2012; Biswas et al. 2017). Algunas de estas son las sales de magnesio y manganeso que por ejemplo, en lactobacilos

promovieron la producción de EPS uniéndose a enzimas catalizadoras de azúcares (Grobben et al. 1998; Seesuriyachan et al. 2011).

En cuanto a la triptona, Abou et al. (2014) también obtuvieron una producción mínima de EPS cuando se usó esta fuente de nitrógeno en *B. subtilis*. Un estudio realizado por Ahn et al. (2020), en donde se evaluó el efecto de la triptona en el metabolismo del piruvato en *Streptococcus mutans*, sugiere que esta podría proporcionar una condición desfavorable para la conversión de la glucosa en piruvato (glucólisis) con la acumulación este último y disminución del nivel de acetil-CoA en la célula, sin embargo, más estudios enfocados en el efecto de la triptona sobre la producción de EPS son necesarios. Contrariamente, la bacteria *Frateuria aurentia* produjo mayor cantidad de la sustancia de interés cuando se usó triptona en el medio de cultivo con respecto a la urea, glicina, sulfato de amonio y cloruro de amonio (Sivakumar et al. 2012). Así también, Ergene y Avci (2017) demostraron que la triptona es un excelente ingrediente para que *Bacillus* sp. ZBP4 produzca la mayor cantidad de EPS ( $974 \pm 72$  mg/L); de hecho, al utilizar extracto de levadura se obtuvo una menor concentración ( $525 \pm 2$  mg/L). El estudio realizado por Ko et al. (2000) describe que la triptona promovió una mayor producción de EPS (8 g/L) en la bacteria *Hahella chejuensis*, a comparación con el extracto de levadura, peptona de soya, caseína, extracto de malta y otros.

Todos estos estudios reafirman la hipótesis de que el tipo de sustrato óptimo para la producción de EPS dependerá de cada microorganismo y sus características intrínsecas.

Efecto de distintos valores de pH. -

El pH es un factor importante a tomar cuenta para la producción de metabolitos de interés biotecnológico ya que está involucrado en la actividad química de los protones y por lo tanto influye directamente en reacciones de óxido-reducción, actividad enzimática, composición de la membrana celular y la consecuente formación de subproductos (Jin y Kirk 2018). La producción de EPS por las cuatro cepas aisladas se evaluó en distintos valores de pH. Al observar los estadísticos descriptivos se observó que los valores de pH entre 6 y 8 tuvieron una influencia positiva en la producción; mientras que con un pH muy ácido (4) esta se vio afectada significativamente. Resultados similares se obtuvieron en *B. subtilis* SH1 que aumentó la cantidad de EPS de 19 g/L con un pH de 5 a 19,8 g/L con un pH de 7; además, su mayor

producción se obtuvo a un pH de 9 con 24 g/L, esto indica que fue favorable a un nivel alcalino (Hassan y Ibrahim 2017).

El estrés alcalino o ácido puede inducir a las células bacterianas una máxima producción de EPS para protegerse de condiciones adversas (Trindade et al. 2018); esta puede ser la razón por la que en estos ensayos también se obtuvieron cantidades considerables con pH 6 y 8. Para aquellos ensayos en donde se obtuvo mayor producción de EPS con pH 7 puede explicarse por la facilidad enzimática de conversión de los azúcares a un pH neutro (Hereher et al. 2018). Por ejemplo, un estudio demostró que la mayor producción de EPS por parte de *Bacillus subtilis* ocurrió a un pH de 7 (Abou et al. 2014). Así también, los resultados reportados por Ko et al. (2000) indican que *Bacillus* sp. produjo altas cantidades de EPS con valores de pH entre 7 y 8 y esta producción disminuyó con valores de pH bajos. El mismo caso se presenta en *B. polymyxa* que obtuvo la mayor producción de EPS (33 g/L) con valores de pH 7 y 8 y esta cantidad disminuyó relativamente a medida que el medio de cultivo se tornó ácido (Lee et al. 1997).

El pH muy ácido pudo haber causado condiciones desfavorables para el crecimiento de la población bacteriana y la reducción de la expresión de ciertos genes involucrados en la biosíntesis de EPS (Zisu y Shah 2003; Nguyen et al. 2020); esto explica el posible efecto negativo de un pH muy ácido evaluado en la presente investigación.

La mayoría de los estudios demuestran que el efecto del pH en la producción de EPS es altamente variable y dependiente del microorganismo estudiado en los ensayos experimentales. Así pues, la influencia del pH en el crecimiento y producción de EPS reveló claramente la naturaleza neutrofílica de la cepa BCL-SA-014, ligeramente acidófila de las cepas BCL-SA-004 y 010 y la naturaleza básica de BCL-SA-005.

Efecto de distintas concentraciones de NaCl. –

Una de las funciones de los EPS es proteger a las células bacterianas de condiciones de estrés osmótico (Costa et al. 2018). Se sabe que estos biopolímeros actúan reteniendo el agua del ambiente circundante para mantener la homeostasis celular (Piuri 2003). Con el fin de evaluar el potencial efecto osmótico del NaCl como factor estimulante de la producción de EPS se evaluaron diferentes concentraciones. En los ensayos con las cepas BCL-SA-005 y 014 se evidenció que la concentración más alta de NaCl tuvo un impacto negativo en cuanto la cantidad

de EPS producidos. Resultados similares se evidenciaron en *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807, en donde el aumento de la concentración de NaCl en el medio de cultivo provocó una inestabilidad de la presión osmótica y reducción la actividad del agua, una consecuente deshidratación de las células y baja producción de EPS (Torino et al. 2005). Estudios demuestran que un estrés hiperosmótico puede resultar un impacto negativo en el crecimiento microbiano con consecuencias perjudiciales en la eficacia de reacciones bioquímicas (como aquellas de biosíntesis de polímeros), plasmólisis y muerte celular (Seesuriyachan et al. 2011; Cesar et al. 2020); esta puede ser una razón por las que estas cepas no produjeron altas concentraciones de EPS.

En contraste, la salinidad fue un parámetro de cultivo importante para la producción de EPS en la cepa BCL-SA-010 (*Bacillus licheniformis*). En esta la mayor cantidad de EPS se obtuvo con NaCl a una concentración de 1 %. Estos resultados indicarían que, en este caso, bajo estrés salino las células bacterianas produjeron más EPS como una medida de protección frente a un medio hipertónico (Piuri 2003; Qurashi y Sabri 2012). De hecho, existen reportes que demuestran que esta especie es halotolerante y que existe un efecto de la concentración de sal en las propiedades físicas de los EPS producidos por esta bacteria, especialmente en su nivel de viscosidad (Singh y Jha 2016; Fan et al. 2020).

Así también, existe evidencia sobre el efecto de la inoculación de bacterias productoras de EPS en la agregación del suelo bajo estrés salino; y estas han demostrado un impacto positivo en la formación de agregados, el mantenimiento de la humedad de plántulas, la protección de las semillas durante su etapa de germinación y la estimulación de su crecimiento (Upadhyay et al. 2011; Qurashi y Sabri 2012; Alaa 2018). Investigaciones previas muestran que los EPS bacterianos, bajo un elevado estrés salino, tienen la capacidad de quelar los iones de sodio y disminuir su toxicidad en el suelo (Arora et al. 2010). Estos datos indicarían un potencial uso de la cepa BCL-SA-010 que produjo altas cantidades de EPS bajo la concentración más alta de NaCl evaluada en la presente investigación.

Por otro lado, varios autores han publicado resultados similares con otros microorganismos: *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 demostró una sobreproducción de EPS (86,36 g/L) cuando en el medio de cultivo se añadió NaCl, a comparación del medio sin este con el que produjo 33,4 g/L de EPS (Seesuriyachan et al. 2012). Así también, especies de

*Pseudomonas* incrementaron la producción de EPS a medida que se aumentaba la concentración de sal en el medio de cultivo (Alaa 2018). Qurashi y Sabri (2012) demostraron que *Planococcus rifietoensis* RT4 también incrementó su producción con un elevado estrés salino.

El presente estudio sugiere el hecho de que los suelos de la Amazonía Ecuatoriana sometidos a procesos de biorremediación son hábitats inexplorados con gran diversidad de bacterias productoras de EPS, a las cuales se les pueden atribuir grandes funciones ecológicas como el mejoramiento de la estructura del suelo con la formación de agregados y la protección de células bacterianas frente a condiciones adversas. En efecto, *Bacillus licheniformis* ha sido ampliamente estudiada por el mismo motivo (Larpin et al. 2002; Liu et al. 2010; Malick et al. 2017; Petrova et al. 2021). Debido a su estatus “GRAS” (Generally Regarded as Safe, por sus siglas en inglés); es decir no es un microorganismo patógeno (Sewalt et al. 2016; Lü et al. 2020), esta especie bacteriana puede ser tomada en cuenta como una fuente industrial valiosa de EPS; a los cuales también se les ha atribuido propiedades antibacteriales, antifúngicas y antioxidantes (Petrova et al. 2021). Además, se ha reportado que tiene la capacidad de degradar una amplia gama de hidrocarburos de petróleo con longitudes de cadena de C12-C36 y reduce la viscosidad del crudo hasta en un 40 % (Fan et al. 2020).

Por otro lado, *Brevibacillus laterosporus*, especie también identificada en este trabajo, es en la actualidad un microorganismo de gran interés debido a que produce compuestos antimicrobianos y antifúngicos y otros metabolitos secundarios de gran aplicación biotecnológica (Ruiu 2013). Se ha reportado su capacidad entomopatígena frente a varios insectos, nemátodos y moluscos (Bone y Singer 1991; Singer et al. 1997; Ruiu et al. 2020). Adicionalmente, se ha reportado que el género *Brevibacillus* tiene la capacidad de degradar hidrocarburos (She et al. 2011); seguramente esta es la razón por la cual fue aislada de los suelos sometidos a procesos de biorremediación. Todas las características anteriormente mencionadas hacen que este microorganismo también sea utilizado como una fábrica celular muy prometedora para la producción microbiana de EPS.

## 7. CONCLUSIONES

Tras la realización de este estudio se logró el aislamiento de cuatro cepas de bacilos productores de EPS a partir de suelos arcillosos contaminados con hidrocarburos totales de

petróleo. Gracias a la determinación de características fenotípicas, fisiológicas y moleculares se identificaron como *Brevibacillus laterosporus* (BCL-SA-004), *Bacillus cereus* (BCL-SA-005) y *Bacillus licheniformis* (BCL-SA-010); BCL-SA-014 no logró ser identificada.

Los resultados de esta investigación destacan el hecho de que la producción de EPS no depende únicamente del tipo de sustrato (utilizados como fuente de carbono y nitrógeno) y su concentración, ni de los factores de estrés salino y ácido/alcalino aplicados. Si bien, estos factores pueden manipularse para lograr altos rendimientos, dichas manipulaciones dependerán de la caracterización y el estudio fisiológico de cada microorganismo productor. Así, dos de los aislados demostraron ser de interés industrial para la producción de EPS debido a su inocuidad y potencial biotecnológico: *Brevibacillus laterosporus* (BCL-SA-004) y *Bacillus licheniformis* (BCL-SA-010), este último mostró buena producción del polímero de interés en la mayoría de los ensayos.

De manera general, el rendimiento de EPS estuvo en su máximo cuando se utilizó la melaza de caña de azúcar como fuente de carbono. Justamente, *B. laterosporus* produjo 661,9  $\mu\text{g/mL}$  y *B. licheniformis* 527,7  $\mu\text{g/mL}$  de EPS; ambos con una concentración de melaza de 30 g/L. Por otro lado, el uso de extracto de levadura como fuente de nitrógeno también favoreció la producción de EPS. El mejor rendimiento en *B. laterosporus* se obtuvo con una concentración de extracto de levadura de 1 g/L con la producción de 91,4  $\mu\text{g/mL}$  de EPS; mientras que, *B. licheniformis* produjo 501,2  $\mu\text{g/mL}$  de EPS con 3 g/L de extracto de levadura.

Dado que el precio de un producto obtenido por biotecnología industrial está definido en gran medida por los sustratos de fermentación, las observaciones de este estudio demuestran que los microorganismos mayormente productores de EPS, aislados a partir de los suelos sometidos a procesos de biorremediación, pueden utilizar sustratos baratos, renovables y asequibles como la melaza; lo que hace que el medio de cultivo formulado para la fermentación sea rentable.

Sin lugar a duda, los EPS microbianos son recursos renovables, inocuos y biodegradables que pueden ser empleados en la recuperación de la agregación y el mejoramiento de la estructura de los suelos que están siendo sometidos a procesos de biorremediación por parte de EP Petroecuador. El presente estudio supone una contribución para que el papel de los microorganismos productores de EPS, aislados en esta investigación, sea evaluado en ensayos

posteriores; tanto en su papel para el mejoramiento de la estructura de suelos arcillosos como en su capacidad de biodegradación de hidrocarburos.

## 8. AGRADECIMIENTOS

Un notable agradecimiento a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y al proyecto “Amazonía Viva” de EP Petroecuador quienes financiaron este proyecto de investigación (QAUF0635-IINV529010200), así como a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la PUCE por permitir el uso de sus equipos e instalaciones.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abou M, Ell A, Toson E, Abbas A, Feky F. 2014. Optimization of exopolysaccharides production by *Bacillus subtilis*. Sci J Damietta Fac Sci. 3(1):11–21.

Acosta M, Valdman E, Leite S, Battaglini F, Ruzal S. 2005. Biosorption of Copper by *Paenibacillus polymyxa* Cells and their Exopolysaccharide. World J Microbiol Biotechnol. 21(6–7):1157–1163. doi:10.1007/s11274-005-0381-6.

Ahn S, Desai S, Blanco L, Lin M, Rice K. 2020. Acetate and Potassium Modulate the Stationary-Phase Activation of *lrgAB* in *Streptococcus mutans*. Front Microbiol. 0. doi:10.3389/fmicb.2020.00401.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00401/full>.

Akhavan A, Golpasha I, Emami M, Nakhoda A. 2008. Isolation and characterization of crude oil degrading *Bacillus* spp. Iran J Environ Health Sci Eng. 5.

Alaa M. 2018. Effectiveness of exopolysaccharides and biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance of faba bean (*Vicia faba* L.). Afr J Microbiol Res. 12(17):399–404. doi:10.5897/AJMR2018.8822.

Alami Y, Achouak W, Marol C, Heulin T. 2000. Rhizosphere Soil Aggregation and Plant Growth Promotion of Sunflowers by an Exopolysaccharide-Producing *Rhizobium* sp. Strain

Isolated from Sunflower Roots. *Appl Environ Microbiol.* 66:3393–8. doi:10.1128/AEM.66.8.3393-3398.2000.

Alef K. 1995. 4 - Enrichment, isolation and counting of soil microorganisms. In: Alef Kassem, Nannipieri P, editores. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. London: Academic Press. p. 123–191. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125138406500197>.

Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3):403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

Arfarita N, Hidayati N, Rosyidah A, Machfudz M, Higuchi T. 2016. Exploration of indigenous soil bacteria producing-exopolysaccharides for stabilizing of aggregates land potential as biofertilizer. *J Degraded Min Lands Manag.* 4(1):697–702. doi:10.15243/jdmlm.2016.041.697.

Argianas A. 2015. Characterization of Exopolysaccharide (EPS) Produced by *Bacillus subtilis* Mutants [Maestría]. [Chicago]: LOYOLA UNIVERSITY CHICAGO. <https://core.ac.uk/download/pdf/48612045.pdf>.

Arora M, Kaushik A, Rani N, Kaushik C. 2010. Effect of cyanobacterial exopolysaccharides on salt stress alleviation and seed germination. *J Environ Biol.* 31(5):701–704.

Benavides J, Quintero G, Guevara A, Jaimes D, Gutiérrez S, Miranda J. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova.* 4(5):82. doi:10.22490/24629448.351.

Bergey D, Holt J. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Estados Unidos de América: The Williams & Wilkings Company.

Biswas J, Paul A, Microbiology Laboratory, Department of Botany, University of Calcutta, Kolkata-700019, West Bengal, India. 2017. Optimization of factors influencing exopolysaccharide production by *Halomonas xianhensis* SUR308 under batch culture. *AIMS Microbiol.* 3(3):564–579. doi:10.3934/microbiol.2017.3.564.

Bone L, Singer S. 1991. Control of parasitic nematode ova/larvae with a *Bacillus laterosporus*. <https://patents.google.com/patent/US5045314A/en>.

Borgio J, Bency J, Ramesh S, Amuthan M. 2009. Exopolysaccharide production by *Bacillus subtilis* NCIM 2063, *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2862 and *Streptococcus mutans* MTCC 1943 using batch culture in different media. *Afr J Biotechnol*. 8. doi:10.4314/ajb.v8i20.65989.

Bretz K. 2015. Succinic Acid Production in Fed-Batch Fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* Using Glycerol as Carbon Source. *Chem Eng Technol*. 38(9):1659–1664. doi:10.1002/ceat.201500015.

Calvache A. 2015. Los suelos del ecuador. Guayaquil. Ecuador. [https://www.researchgate.net/publication/301701400\\_los\\_suelos\\_del\\_ecuador/citation/download](https://www.researchgate.net/publication/301701400_los_suelos_del_ecuador/citation/download).

Campaña S. s.f. Tipos de Suelos en El Ecuador | Suelo | Roca (geología). [accedido el 18 de marzo de 2020]. <https://es.scribd.com/document/311163645/Tipos-de-Suelos-en-El-Ecuador>.

Carioca J, Leal M. 2011. 3.04 - Ethanol Production from Sugar-Based Feedstocks. In: Moo-Young M, editor. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*. Burlington: Academic Press. p. 27–35. [accedido el 18 de noviembre de 2021]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080885049001847>.

Cesar S, Anjur-Dietrich M, Yu B, Li E, Rojas E, Neff N, Cooper T, Huang K. 2020. Bacterial Evolution in High-Osmolarity Environments. Hughes KT, editor. *mBio*. 11(4). doi:10.1128/mBio.01191-20. [accedido el 5 de diciembre de 2021]. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.01191-20>.

Clarke M. 2003. SYRUPS. In: Caballero B, editor. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. Oxford: Academic Press. p. 5711–5717. [accedido el 18 de noviembre de 2021]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B012227055X011755>.

Colica G, Li H, Rossi F, Li D, Liu Y, De Philippis R. 2014. Microbial secreted exopolysaccharides affect the hydrological behavior of induced biological soil crusts in desert sandy soils. *Soil Biol Biochem*. 68:62–70. doi:10.1016/j.soilbio.2013.09.017.

Costa O, Raaijmakers J, Kuramae E. 2018. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Ecological Function and Impact on Soil Aggregation. *Front Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01636. [accedido el 24 de octubre de 2019]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01636/full>.

Darsa K, Thatheyus A, Ramya D. 2014. Biodegradation of Petroleum Compound Using the Bacterium *Bacillus subtilis*. *Sci Int.* 2(1):20–25. doi:10.17311/sciintl.2014.20.25.

Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem.* 28(3):350–356. doi:10.1021/ac60111a017.

Ergene E, Avci A. 2017. Effects of Cultural Conditions on Exopolysaccharide Production by *Bacillus* sp. ZBP4. *Tarım Bilim Derg.* 24:386–393. doi:10.15832/ankutbd.456666.

Fan Y, Wang J, Gao C, Zhang Y, Du W. 2020. A novel exopolysaccharide-producing and long-chain n-alkane degrading bacterium *Bacillus licheniformis* strain DM-1 with potential application for in-situ enhanced oil recovery. *Sci Rep.* 10(1):8519. doi:10.1038/s41598-020-65432-z.

Freitas F, Alves V, Reis M. 2011. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol.* 29(8):388–398. doi:10.1016/j.tibtech.2011.03.008.

Goh K, Haisman D, Archer R, Singh H. 2005. Evaluation and modification of existing methods for the quantification of exopolysaccharides in milk-based media. *Food Res Int.* 38(6):605–613. doi:10.1016/j.foodres.2004.11.014.

Goksungur Y, Ucan A, Guvenc U. 2004. Production of pullulan from beet molasses and synthetic medium by *Aureobasidium pullulans*. *Turk J Biol.* 28:23–30.

Gómez V. 2019. 17 de mayo. Derrame de petróleo afecta a recinto en Lago Agrio. El Universo. [accedido el 27 de marzo de 2020]. <https://www.eluniverso.com/noticias/2019/05/17/nota/7334573/derrame-petroleo-afecta-recinto-lago-agrio>.

Gonzalez J, Estrella S, Astorga D, Hidalgo D, Lopez J, Yanez P, Urvina J, Luna V. 2019 Oct 16. Evaluation of the in vitro production of exopolysaccharides by fluorescent *Pseudomonas* isolated from clay soil contaminated with hydrocarbons in the Ecuadorian Amazon. doi:10.3390/mol2net-05-06269. [accedido el 16 de febrero de 2022]. <https://sciforum.net/paper/view/6269>.

Gordillo A. 2018. Diversity of saprophytic fungi in the rhizoplane of plant communities naturally recolonizing oil ponds in the Amazonian areas. UCL - Université Catholique de Louvain. [accedido el 26 de octubre de 2020]. <https://dial.uclouvain.be/pr/boreal/object/boreal:195708>.

Goto K, Omura T, Hara Y, Sadaie Y. 2000. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. J Gen Appl Microbiol. 46(1):1–8. doi:10.2323/jgam.46.1.

Grobben G, Chin-Joe I, Kitzen V, Boels I, Boer F, Sikkema J, Smith M, de Bont J. 1998. Enhancement of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a Simplified Defined Medium. Appl Environ Microbiol. 64(4):1333–1337.

Hassan S, Ibrahim A. 2017. Production, Characterization and Valuable Applications of Exopolysaccharides from Marine *Bacillus subtilis* SH1. Pol J Microbiol. 66(4):449–461.

He X, He F, Hang J, Li H, Chen Y, Wei P, Chen K, Li Y, OuYang P. 2018. Enhanced production of exopolysaccharides using industrial grade starch as sole carbon source. Bioprocess Biosyst Eng. 41(6):811–817. doi:10.1007/s00449-018-1915-2.

Henao L, Mazeau K. 2009. Molecular modelling studies of clay–exopolysaccharide complexes: Soil aggregation and water retention phenomena. Mater Sci Eng C. 29(8):2326–2332. doi:10.1016/j.msec.2009.06.001.

Hereher F, El-fallal A, Abou-Dobara M. 2018. Cultural Optimization of a new Exopolysaccharide Producer “*Micrococcus Roseus*.” Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci. 7. doi:10.1016/j.bjbas.2018.07.007.

İspirli H, Dertli E. 2018. Isolation and identification of exopolysaccharide producer lactic acid bacteria from Turkish yogurt. *J Food Process Preserv.* 42(1):e13351. doi:10.1111/jfpp.13351.

Jeyaram K, Velmurugan S, Achary A, Vasanthi M, Vinson S, Sivashankar R. 2018. 4 Bioprocessing of Agrofood Industrial Wastes for the Production of Bacterial Exopolysaccharide. In: *Bioprocess Engineering for a Green Environment*.

Jin Q, Kirk MF. 2018. pH as a Primary Control in Environmental Microbiology: 1. Thermodynamic Perspective. *Front Environ Sci.* 6:21. doi:10.3389/fenvs.2018.00021.

Kılıç N, Dönmez G. 2008. Environmental conditions affecting exopolysaccharide production by *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus* sp., and *Ochrobactrum* sp. *J Hazard Mater.* 154(1–3):1019–1024. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.11.008.

Ko S, Lee Hyun, Park S, Lee Hong. 2000. Optimal conditions for the production of exopolysaccharide by marine microorganism *Hahella chejuensis*. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 5(3):181–185. doi:10.1007/BF02936591.

Kumar B, Gopal D. 2015. Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment. *3 Biotech.* 5(6):867–876. doi:10.1007/s13205-015-0293-6.

Kumar C, Joo H, Choi J, Koo Y, Chang C. 2004. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450. *Enzyme Microb Technol.* 34(7):673–681. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.03.001.

Larpin S, Sauvageot N, Pichereau V, Laplace J, Auffray Y. 2002. Biosynthesis of exopolysaccharide by a *Bacillus licheniformis* strain isolated from ropy cider. *Int J Food Microbiol.* 77(1–2):1–9. doi:10.1016/s0168-1605(02)00058-2.

Lee I, Seo W, Kim G, Kim M, Ahn S, Kwon G, Park Y. 1997. Optimization of fermentation conditions for production of exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*. *Bioprocess Eng.* 16(2):71. doi:10.1007/s004490050290.

Li J, Liu R, Chang G, Li X, Chang M, Liu Y, Jin Q, Wang X. 2015. A strategy for the highly efficient production of docosahexaenoic acid by *Aurantiochytrium limacinum* SR21 using

glucose and glycerol as the mixed carbon sources. *Bioresour Technol.* 177:51–57. doi:10.1016/j.biortech.2014.11.046.

Liu C, Lu J, Lu L, Liu Y, Wang F, Xiao M. 2010. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis*. *Bioresour Technol.* 101(14):5528–5533. doi:10.1016/j.biortech.2010.01.151.

Lü C, Ge Y, Cao M, Guo X, Liu P, Gao C, Xu P, Ma C. 2020. Metabolic Engineering of *Bacillus licheniformis* for Production of Acetoin. *Front Bioeng Biotechnol.* 8:125. doi:10.3389/fbioe.2020.00125.

Majumder A, Bhattacharyya K, Kole S, Ghosh S. 2013. Efficacy of indigenous soil microbes in arsenic mitigation from contaminated alluvial soil of India. *Environ Sci Pollut Res.* 20(8):5645–5653. doi:10.1007/s11356-013-1560-x.

Malick A, Khodaei N, Benkerroum N, Karboune S. 2017. Production of exopolysaccharides by selected *Bacillus* strains: Optimization of media composition to maximize the yield and structural characterization. *Int J Biol Macromol.* 102. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.03.151.

Mandree P, Masika W, Naicker J, Moonsamy G, Ramchuran S, Lalloo R. 2021. Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Industry Contaminated Soil Using Indigenous *Bacillus* spp. *Processes.* 9(9):1606. doi:10.3390/pr9091606.

Marvasi M, Visscher P, Casillas L. 2010. Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis: EPS from *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett.* 313(1):1–9. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02085.x.

Masika W, Moonsamy G, Mandree P, Ramchuran S, Lalloo R, Kudanga T. 2020. Biodegradation of petroleum hydrocarbon waste using consortia of *Bacillus* sp. *Bioremediation J.* 25. doi:10.1080/10889868.2020.1842322.

Mata J, Béjar V, Llamas I, Arias S, Bressollier P, Tallon R, Urdaci MC, Quesada E. 2006. Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. *Res Microbiol.* 157(9):827–835. doi:10.1016/j.resmic.2006.06.004.

Ministerio de Relaciones Exteriores y Movilidad Humana. 2015. Historia de Chevron-Texaco en Ecuador. [accedido el 27 de marzo de 2020]. <https://www.cancilleria.gob.ec/historia-de-chevron-texaco-en-ecuador/>.

Ministerio del Ambiente de Ecuador. 2017. Derrame de petróleo en Archidona, Napo, llegó a riberas del río Wamaní. [accedido el 27 de marzo de 2020]. <https://www.eluniverso.com/vida/2017/09/19/nota/6390049/derrame-petroleo-archidona-napo-llego-riberas-rio-wamani>.

Miri M, Bergayou H, Belmouden A, Moukrim A, Baazizi H, Boum'handi N. 2021. Medium optimization for exopolysaccharides production by *Bacillus Zhangzhouensis* BZ 16 strain isolated from Khnifiss Lagoon. Abouchabaka J, Bourekkadi S, Omari O, Slimani K, editores. E3S Web Conf. 234:00099. doi:10.1051/e3sconf/202123400099.

Moghannem S, Farag M, Shehab A, Azab M. 2018. Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design. Braz J Microbiol. 49(3):452–462. doi:10.1016/j.bjm.2017.05.012.

Molina G, Luna V. 2020. Determinación de las condiciones para producción de mucopolisacáridos por aislados de *Azotobacter* provenientes de suelos arcillosos contaminados con hidrocarburos de la región amazónica. [Quito, Ecuador]: Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/18037/Trabajo%20de%20titulaci%20c3%20b3n%20%2815%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Moreno L. 2021. Decreto Ejecutivo 1221. [https://www.eppetroecuador.ec/wp-content/uploads/downloads/2021/01/Decreto\\_Ejecutivo\\_No.\\_1221\\_20210007160628\\_2021007160632.pdf](https://www.eppetroecuador.ec/wp-content/uploads/downloads/2021/01/Decreto_Ejecutivo_No._1221_20210007160628_2021007160632.pdf).

Morillo J, Guerra Del Águila V, Aguilera M, Ramos A, Monteoliva M. 2007. Production and characterization of the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae* grown on olive mill-waste waters. World J Microbiol Biotechnol. 23(12):1705–1710. doi:10.1007/s11274-007-9418-3.

Nguyen P-T, Nguyen T-T, Bui D-C, Hong P-T, Hoang Q-K, Nguyen H-T. 2020. Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: the manipulation of environmental stresses for industrial applications. *AIMS Microbiol.* 6(4):451–469. doi:10.3934/microbiol.2020027.

Ogidi C, Ubaru A, Ladi-Lawal T, Thonda O, Aladejana O, Malomo O. 2020. Bioactivity assessment of exopolysaccharides produced by *Pleurotus pulmonarius* in submerged culture with different agro-waste residues. *Heliyon.* 6(12):e05685. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e05685.

Paz A. 2020. 30 de abril. Ecuador: demandan al Estado y a empresas petroleras por derrame de crudo en los ríos Coca y Napo. *Nota Ambiental.* [accedido el 8 de febrero de 2021]. <https://es.mongabay.com/2020/04/derrame-de-petroleo-rio-coca-indigenas-demandan-a-ecuador/>.

PETROAMAZONAS EP. 2018. Informe Amazonía Viva. <https://www.petroamazonas.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2019/04/Informe-Amazonia-Viva-2018-V4.pdf>.

PETROAMAZONAS EP. 2019. Nuestra Responsabilidad Ambiental – Petroamazonas EP. [accedido el 27 de marzo de 2020]. <https://www.petroamazonas.gob.ec/?p=152>.

Petrova P, Arsov A, Ivanov I, Tsigoriyna L, Petrov K. 2021. New Exopolysaccharides Produced by *Bacillus licheniformis* 24 Display Substrate-Dependent Content and Antioxidant Activity. *Microorganisms.* 9(10):2127. doi:10.3390/microorganisms9102127.

Pirog T, Ivakhniuk M, Voronenko A. 2016. Exopolysaccharides synthesis on industrial waste. *Biotechnol Acta.* 9(2). doi:10.15407/biotech9.02.2007. [accedido el 22 de octubre de 2020]. <https://cyberleninka.ru/article/n/exopolysaccharides-synthesis-on-industrial-waste>.

Piuri A. 2003. Caracterización de la respuesta a estrés osmótico en *Lactobacillus casei*: Rol del sistema proteolítico [Doctorado]. [Buenos Aires, Argentina]: Universidad de Buenos Aires. [https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n3599\\_Piuri.pdf](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n3599_Piuri.pdf).

Prado M, Valdman E, Leite S, Battaglini F, Ruzal S. 2005. Biosorption of Copper by *Paenibacillus polymyxa* Cells and their Exopolysaccharide. *World J Microbiol Biotechnol.* 21(6–7):1157–1163. doi:10.1007/s11274-005-0381-6.

Qurashi A, Sabri A. 2012. Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Braz J Microbiol.* 43(3):1183–1191. doi:10.1590/S1517-838220120003000046.

Raliya R, Tarafdar J, Mahawar H, Kumar R, Gupta P, Mathur T, Kaul R, Praveen K, Kalia A, Gautam R, et al. 2014. ZnO nanoparticles induced exopolysaccharide production by *B. subtilis* strain JCT1 for arid soil applications. *Int J Biol Macromol.* 65:362–368. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.01.060.

Ramírez A, Sánchez E. 2011. Selección de *Bacillus* spp. Con actividad antagónica in vitro contra *Macrophomina phaseolina* (tassi goid) en diferentes medios de cultivo. *Fitosanidad.* 15(2):6. doi:<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209122297007>.

Razack S, Velayutham V, Thangavelu V. 2012. Effect of synthetic carbon substrates and cane molasses, an agro waste, on exopolysaccharide production by *P. fluorescens*. *Int J Sci Eng Appl.* 1:60–66. doi:10.7753/IJSEA0101.1010.

Razack S, Velayutham V, Thangavelu V. 2013a. Influence Of Various Parameters On Exopolysaccharide Production From *Bacillus subtilis*. *Int J Chem Tem Res.* 5(5):2221–2228.

Razack S, Velayutham V, Thangavelu V. 2013b. Medium optimization for production of Exopolysaccharide by *Bacillus subtilis* using synthetic sources and agro wastes. *Turk J Biol.* 37:280–288. doi:10.3906/biy-1206-50.

Rojas J. 2020. Producción de exopolisacáridos a partir de bacterias ácido lácticas utilizando tusa de maíz como fuente de carbono. [San Lorenzo, Paraguay]. [https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/BECA02-38\\_Jissel%20Armoa.pdf](https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/BECA02-38_Jissel%20Armoa.pdf).

Rosalam S, England R. 2006. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. *Enzyme Microb Technol.* 39(2):197–207. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.10.019.

- Ruiu L. 2013. *Brevibacillus laterosporus*, a Pathogen of Invertebrates and a Broad-Spectrum Antimicrobial Species. *Insects*. 4(3):476–492. doi:10.3390/insects4030476.
- Ruiu L, Lazzeri A, Nuvoli M, Floris I, Satta A. 2020. Safety evaluation of the entomopathogenic bacterium *Brevibacillus laterosporus* for the green lacewing *Chrysoperla agilis* (Neuroptera: Chrysopidae). *J Invertebr Pathol*. 169:107281. doi:10.1016/j.jip.2019.107281.
- San Sebastian M, Hurtig A. 2004. Oil Exploitation in the Amazon Basin of Ecuador: A Public Health Emergency. *Rev Panam Salud Pública Pan Am J Public Health*. 15:205–11. doi:10.1590/S1020-49892004000300014.
- Sánchez J. 2002. Introducción al diseño experimental. Quito, Ecuador: Cámara Ecuatoriana del Libro. [accedido el 18 de febrero de 2022].  
<https://isbn.cloud/9789978425206/introduccion-al-diseno-experimental/>.
- Sandhya V, Ali S. 2015. The production of exopolysaccharide by *Pseudomonas putida* GAP-P45 under various abiotic stress conditions and its role in soil aggregation. *Microbiology*. 84(4):512–519. doi:10.1134/S0026261715040153.
- Sandhya V, Ali S, Grover M, Reddy G, Venkateswarlu B. 2009. Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biol Fertil Soils*. 46(1):17–26. doi:10.1007/s00374-009-0401-z.
- Schweizer S. 2011. Muestreo y análisis de suelos para diagnóstico de fertilidad. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/P33-9965.pdf>.
- Seesuriyachan P, Kuntiya A, Hanmoungjai P, Techapun C. 2011. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 using coconut water as an alternative carbon source: the effect of peptone, yeast extract and beef extract. *Songklanakarin J Sci Technol*. 33(4):379–387.
- Seesuriyachan P, Kuntiya A, Hanmoungjai P, Techapun C, Chaiyaso T, Leksawasdi N. 2012. Optimization of Exopolysaccharide Overproduction by *Lactobacillus confusus* in Solid State Fermentation under High Salinity Stress. *Biosci Biotechnol Biochem*. 76(5):912–917. doi:10.1271/bbb.110905.

Sewalt V, Shanahan D, Gregg L, La Marta J, Carrillo R. 2016. The Generally Recognized as Safe (GRAS) Process for Industrial Microbial Enzymes. *Ind Biotechnol.* 12(5):295–302. doi:10.1089/ind.2016.0011.

She Y, Shu F, Wang Z, Yu L. 2011. Investigation of Indigenous Microbial Enhanced Oil Recovery in a Middle Salinity Petroleum Reservoir. *Adv Mater Res.* 365:326–331. doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.365.326.

Silva S, Silva I, Barros N, Sá Mendonça E. 2011. Effect of compaction on microbial activity and carbon and nitrogen transformations in two oxisols with different mineralogy. *Rev Bras Ciênc Solo.* 35(4):1141–1149. doi:10.1590/S0100-06832011000400007.

Singer S, Van Fleet A, Viel J, Genevese E. 1997. Biological control of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* and the snail *Biomphalaria glabrata*, using Gramicidin S and D and molluscicidal strains of *Bacillus*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 18(4):226–231. doi:10.1038/sj.jim.2900371.

Singh R, Jha P. 2016. A Halotolerant Bacterium *Bacillus licheniformis* HSW-16 Augments Induced Systemic Tolerance to Salt Stress in Wheat Plant (*Triticum aestivum*). *Front Plant Sci.* 7. doi:10.3389/fpls.2016.01890. [accedido el 9 de enero de 2022]. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.01890/full>.

Sivakumar T, Narayani S, Shankar T, Vijayabaskar P. 2012. Review article Optimization of cultural conditions for exopolysaccharides production by *Frateuria aurentia*. *Int J Appl Biol Pharm Technol.* 3(3):11.

Sorkhoh N, Ibrahim A, Ghannoum M, Radwan S. 1993. High-temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwaiti desert. *Appl Microbiol Biotechnol.* 39(1):123–126. doi:10.1007/BF00166860.

Swinnen S, Klein M, Carrillo M, McInnes J, Nguyen H, Nevoigt E. 2013. Re-evaluation of glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of an isolate that grows on glycerol without supporting supplements. *Biotechnol Biofuels.* 6(1):157. doi:10.1186/1754-6834-6-157.

Tejera B, Heydrich M, Rojas M. 2013. Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. *Agron Mesoam*. 24(2):357–364.

Torino M, Hebert E, Mozzi F, Font de Valdez G. 2005. Growth and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in an adenine-supplemented chemically defined medium. *J Appl Microbiol*. 99(5):1123–1129. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02701.x.

Trindade R, Munhoz A, Burkert C. 2018. Impact of a carbon source and stress conditions on some properties of xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. *Biocatal Agric Biotechnol*. 15:167–172. doi:10.1016/j.bcab.2018.06.003.

Upadhyay S, Singh J, Singh D. 2011. Exopolysaccharide-Producing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Under Salinity Condition. *Pedosphere*. 21(2):214–222. doi:10.1016/S1002-0160(11)60120-3.

Wang Z, Wu J, Zhu L, Zhan X. 2016. Activation of glycerol metabolism in *Xanthomonas campestris* by adaptive evolution to produce a high-transparency and low-viscosity xanthan gum from glycerol. *Bioresour Technol*. 211:390–397. doi:10.1016/j.biortech.2016.03.096.

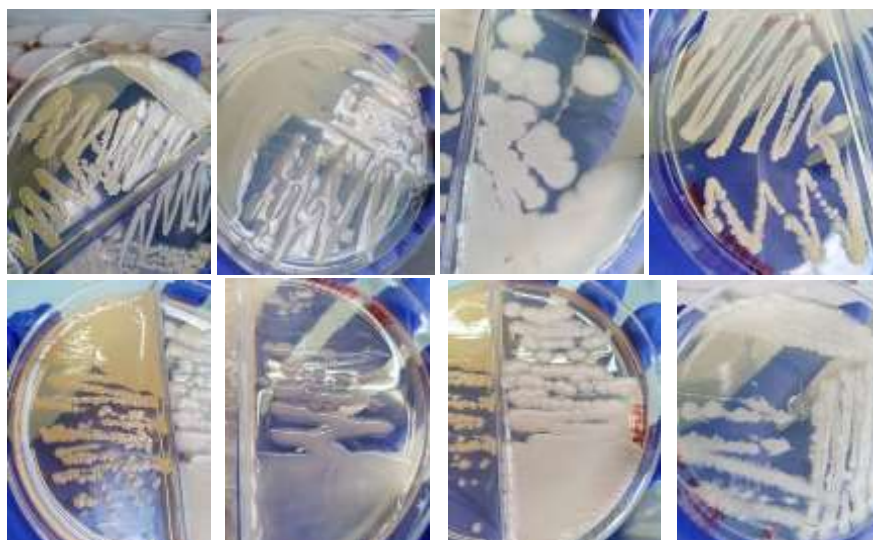
Ying G. 2018. Chapter 14 - Remediation and Mitigation Strategies. In: Maestroni B, Cannavan A, editores. *Integrated Analytical Approaches for Pesticide Management*. Academic Press. p. 207–217. [accedido el 17 de abril de 2020]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128161555000142>.

Zaldumbide K, Santa Cruz F, Astorga D, Hidalgo D, López J, Yáñez P, Urvina J, Luna V. 2020. Optimización de condiciones abióticas para la mayor producción de exopolisacáridos de bacterias del grupo Rizobio aisladas de suelo contaminado con hidrocarburos. [Quito, Ecuador]: Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/18533/TRABAJO%20DE%20TITULACI%C3%93N%2C%20KATHERINE%20ZALDUMBIDE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

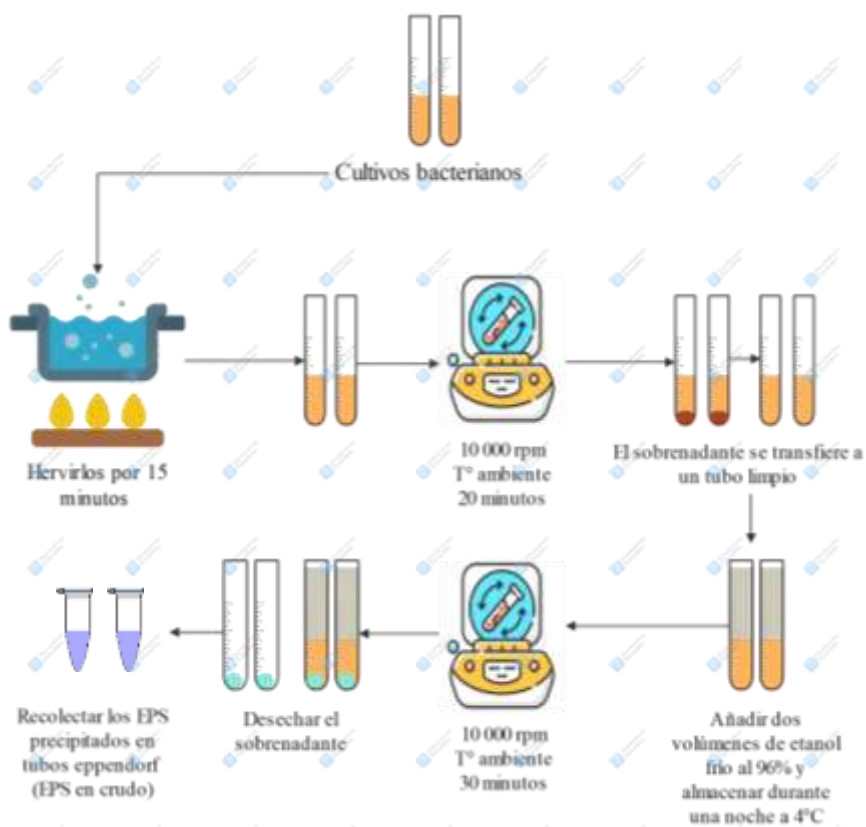
Zhou F, Wu Z, Chen C, Han J, Ai L, Guo B. 2014. Exopolysaccharides produced by *Rhizobium radiobacter* S10 in whey and their rheological properties. *Food Hydrocoll*. 36:362–368. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.08.016.

Zisu B, Shah N. 2003. Effects of pH, Temperature, Supplementation with Whey Protein Concentrate, and Adjunct Cultures on the Production of Exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. J Dairy Sci. 86(11):3405–3415. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73944-7.

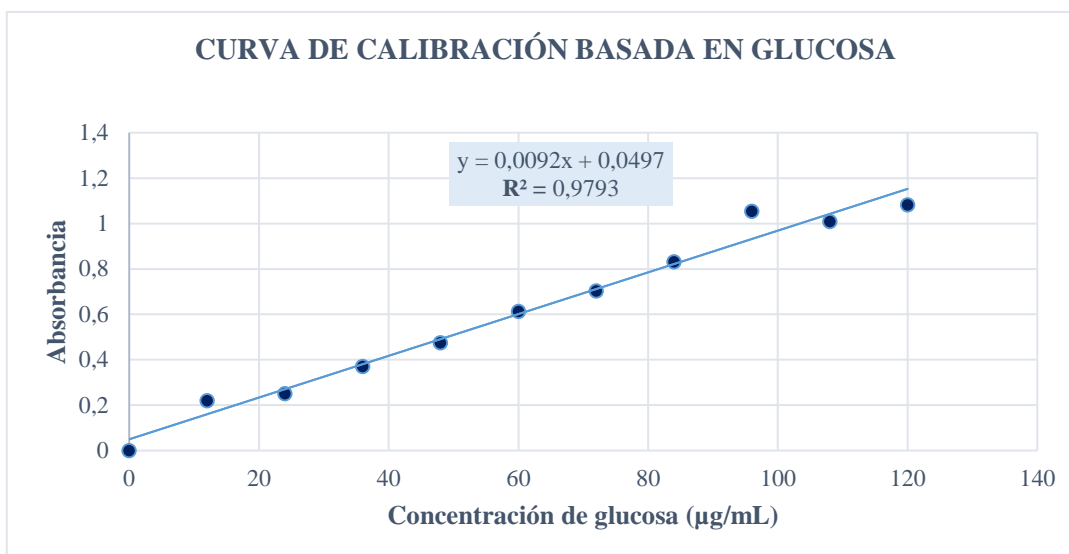
## ANEXOS



**ANEXO 1. Aislados bacterianos sospechosos de pertenecer al género *Bacillus*.** Se obtuvieron cultivos puros de aquellos aislados que presentaron características de crecimiento propias del género de interés.



**ANEXO 2. Extracción de EPS.** Método de precipitación modificado de acuerdo con Kılıç y Dönmez (2008). Autoría propia. Creado en Wondershare Edraw max V 11.1.2.



**ANEXO 3. Curva de calibración de glucosa empleada para la cuantificación de EPS ( $\mu\text{g/mL}$ ).** Se empleó el método fenol-ácido sulfúrico modificado y la ecuación de la recta para los cálculos respectivos de concentración.

**ANEXO 4. Variables independientes analizadas en la investigación.**

Variables independientes		Niveles			
		1	2	3	4 (testigo)
<i>Fuentes de carbono</i>	Melaza				
	Glicerol	20 (g/L)	30 (g/L)	50 (g/L)	20 (g/L) sacarosa
<i>Fuentes de nitrógeno</i>	Extracto de levadura				
	Triptona	0.5 (g/L)	1 (g/L)	3 (g/L)	5 (g/L) extracto de levadura
	<i>pH</i>	4	6	8	7
	<i>Salinidad</i>	0.3 %	0.7 %	1 %	0 %

Cada cepa aislada se sometió a un total de 22 tratamientos. Cada uno de estos se realizó por triplicado.

**ANEXO 5. Identificación fenotípica de las cepas bacterianas aisladas de los suelos contaminados con hidrocarburos sometidos a procesos de biorremediación.**

CÓDIGO AISLADO	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA							MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	
	Agar Triptona-Soya							Tinción Gram	
	Forma	Tamaño (mm)	Elevación	Borde	Color	Aspecto	Textura	Tinción Gram	Espora
<b>BCL-SA-002</b>	circular	1 a 2	convexa	entero	blanco amarillento	brillante	mucosa	+	+
<b>BCL-SA-003</b>	irregular	3 a 4	plana	entero	blanco crema	brillante	cremosa	+	+
<b>BCL-SA-004</b>	circular	2 a 3	convexa	entero	blanco amarillento	brillante	mucosa	+	+
<b>BCL-SA-005</b>	irregular	5 a 7	plana	entero	blanco crema	opaco	cremosa	+	+
<b>BCL-SA-006</b>	circular	1 a 2	convexa	entero	blanco crema	brillante	mucosa	+	+
<b>BCL-SA-008</b>	irregular	5 a 7	plana	ondulado	blanco crema	brillante	cremosa	+	+
<b>BCL-SA-009</b>	circular	2 a 3	papilada	entero	blanco amarillento	rugoso, brillante	cremosa	+	+
<b>BCL-SA-010</b>	irregular	4 a 5	plana	filamentoso	blanco crema	rugoso, brillante	cremosa	+	+
<b>BCL-SA-011</b>	circular	2 a 3	convexa	entero	blanco crema	brillante	mucosa	+	+
<b>BCL-SA-013</b>	circular	1 a 2	convexa	entero	blanco amarillento	brillante	cremosa	+	+
<b>BCL-SA-014</b>	irregular	4 a 5	pulvinada	entero	blanco crema	brillante	acuosa	+	+
<b>BCL-SA-015</b>	irregular	4 a 5	convexa	ondulado	blanco crema	brillante	acuosa	+	+

**ANEXO 6. Comparación de las concentraciones de EPS  $\mu\text{g/mL}$  producidos por los 12 aislados durante el *screening* cuantitativo, mediante ANOVA.**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	Probabilidad (valor- <i>p</i> )
Inter-grupos	1,510	11	0,137	9,861	0,000207*
Intra-grupos	0,167	12	0,014	1,340	
Total	1,677	23	0,143	6,747	

\*  $p < \infty 0,05$

Existen diferencias altamente significativas entre cepas.

**ANEXO 7. Caracterización bioquímica de los aislados bacterianos mediante los sistemas API 50CH y API 20E y pruebas complementarias.**

Pruebas bioquímicas	Aislados bacterianos			
	BCL-SA-004	BCL-SA-005	BCL-SA-010	BCL-SA-014
Tinción de Gram	+	+	+	+
Endospora	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	-
Oxidasa	+	+	+	+
<i>API 50 CH</i>				
Glicerol	-	+	+	+
Eritritol	-	-	-	-
D-arabinosa	-	-	-	-
L-arabinosa	-	-	+	+
D-ribosa	-	+	+	+
D-xilosa	-	-	+	+
L-xilosa	-	-	-	+
D-adonitol	-	-	-	-
Metil- $\beta$ -D xilopiranosido	-	-	-	-
D-galactosa	-	-	-	-
D-glucosa	+	+	+	+

(Continuación...)

D-fructosa	+	+	+	+
D-manosa	+	+	+	+
L-sorbosa	-	-	-	-
L-ramnosa	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	+	+
D-manitol	+	-	+	+
D-sorbitol	-	-	+	+
Metil- $\alpha$ -D- manopiranosido	-	-	-	-
Metil- $\alpha$ -D- glucopiranosido	-	-	+	+
N-acetilglucosamina	+	+	-	+
Amigdalina	+	+	+	+
Arbutina	+	+	+	+
Citrato férrico de esculina	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+
D-celobiosa	+	+	+	+
D-maltosa	-	+	+	+
D-lactosa (origen bovino)	-	-	-	-
(Continuación...)				
D-melobiosa	-	-	-	+
D-sacarosa (sucrosa)	+	-	+	+
D-trehalosa	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-
D-melezitosa	-	-	-	-
D-rafinosa	-	-	-	+
Almidón	-	+	+	-
Glicógeno	-	+	+	-
Xilitol	-	-	-	-
Gentiobiosa	-	+	-	-
D-turanosa	-	-	-	-

(Continuación...)

D-lixosa	-	-	-	-
D-tagatosa	-	-	+	+
D-fucosa	-	-	-	-
L-fucosa	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-
Gluconato potásico	-	-	-	-
2-cetogluconato potásico	-	-	-	-
5-cetogluconato de potasio	-	-	-	-

*API 20 E*

ONPG	-	-	+	-
ADH (arginina)	-	-	-	-
LDC (lisina descarboxilasa)	-	-	-	-
ODC (ornitina descarboxilasa)	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-
(Continuación...)				
Urea	-	-	-	-
TDA (triptófano)	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-
VP (acetoína)	+	-	-	-
Gelatinasa	+	+	-	-
NO <sub>2</sub>	-	-	-	-
N <sub>2</sub>	+	+	+	+

**ANEXO 8. Análisis de varianza bifactorial: fuente de carbono y concentración (a) y cepa (b).**

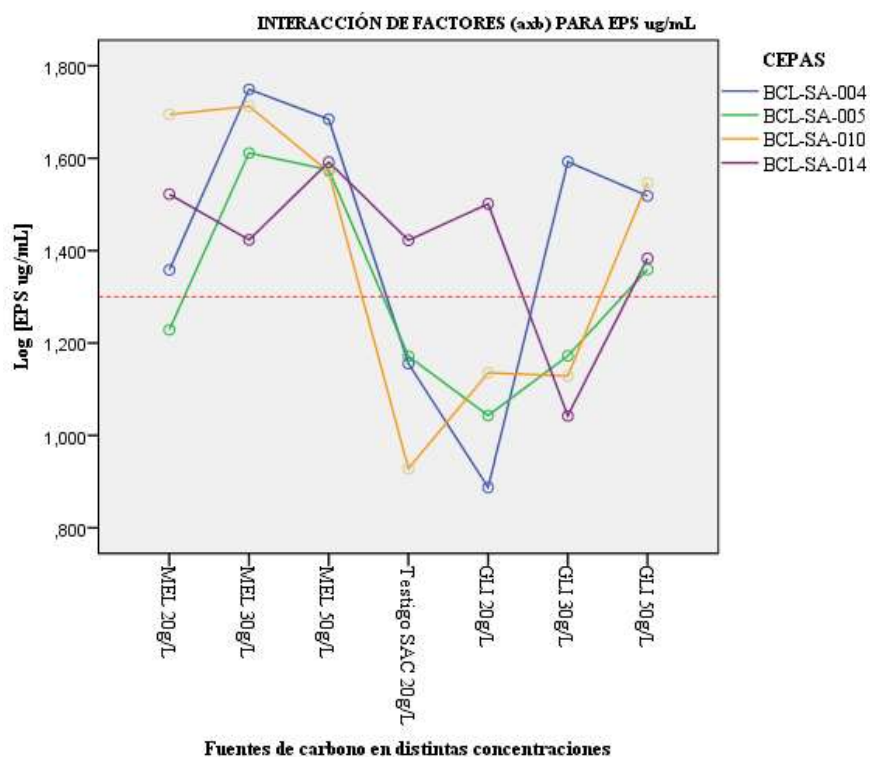
Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	Probabilidad (valor- <i>p</i> )
Modelo corregido	5,098	27	0,189	3,387	0,000058
Efecto (a)	2,914	6	0,486	8,713	0,000001*
Efecto (b)	0,165	3	0,055	0,984	0,40
Efecto axb	2,019	18	0,112	2,012	0,024*
Error	3,122	56	0,056		
Total	168,753	84			
Total corregido	8,220	83			

$$CV = (\sqrt{0,056} / 1,382) * 100 = 17 \%$$

\*  $p < \infty 0,05$

Existe un efecto significativo en la producción de EPS por parte del tipo de fuente de carbono y su concentración, así como de su interacción con el tipo de cepa en donde se probaron dichas fuentes.

Fuente: Autor


**ANEXO 9. Comparación de medias marginales de cada tratamiento.**

Interacción de factores: fuente de carbono x cepa. Para BCL-SA-004, 005 y 010 la melaza 30 g/L indujo una mayor producción de EPS; mientras que para BCL-SA-014 fue la melaza a una concentración de 50 g/L.

**ANEXO 10. Análisis de varianza bifactorial: fuente de nitrógeno y concentración (a) y cepa (b).**

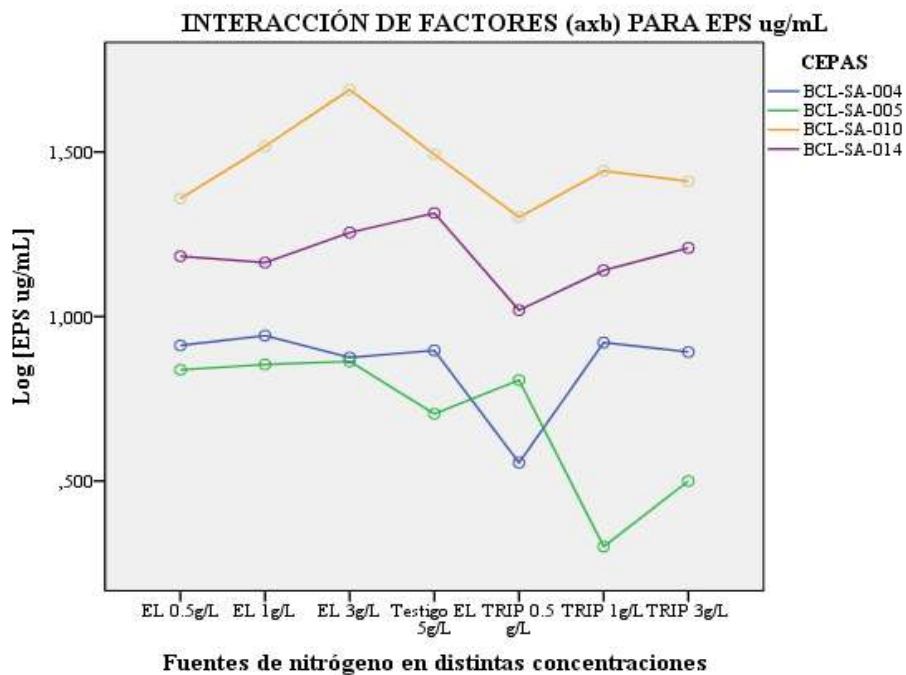
Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	Probabilidad (valor-p)
Modelo corregido	8,924	27	0,331	12,752	1,9732E <sup>-15</sup>
Efecto (a)	0,616	6	0,103	3,959	0,002*
Efecto (b)	7,316	3	2,439	94,091	7,4773E <sup>-22</sup> *
Efecto axb	0,992	18	0,055	2,126	0,016*
Error	1,451	56	0,026		
Total	102,748	84			
Total corregido	10,375	83			

$$CV = (\sqrt{0,026} / 1,049) * 100 = 15 \%$$

\*  $p < \infty 0,05$

Existe un efecto significativo en la producción de EPS por parte del factor a, factor b y de la interacción entre ambos.

Fuente: Autor



**ANEXO 11. Comparación de medias marginales de cada tratamiento.** Interacción de factores: fuente de nitrógeno x cepa. Para BCL-SA-004 el extracto de levadura 1g/L indujo una mayor producción de EPS, mientras que para las cepas BCL-SA-005 y 010 así mismo el extracto de levadura, pero a una concentración de 3g/L. En el caso de la cepa BCL-SA-014 fue el tratamiento testigo.

**ANEXO 12. Análisis de varianza bifactorial: pH (a) y cepa (b).**

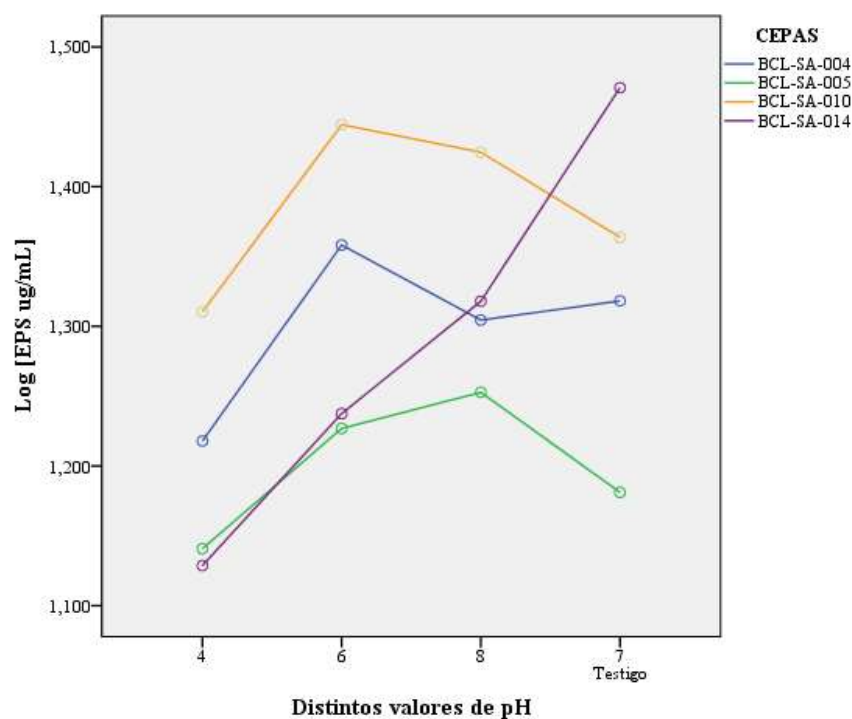
Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	Probabilidad (valor- <i>p</i> )
Modelo corregido	0,481	15	0,032	1,440	0,188
Efecto (a)	0,144	3	0,048	2,154	0,113
Efecto (b)	0,207	3	0,069	3,101	0,040*
Efecto axb	0,130	9	0,014	0,649	0,747
Error	0,712	32	0,022		
Total	81,521	48			
Total corregido	1,192	47			

$$CV = (\sqrt{0,022} / 1,294) * 100 = 11 \%$$

\*  $p < \infty 0,05$

Existe un efecto significativo en la producción de EPS sólo por parte del factor b (cepas).

Fuente: Autor


**ANEXO 13. Comparación de medias marginales de cada tratamiento.**

Las cepas BCL-SA-004 y10 produjeron más EPS cuando el medio tuvo un pH de 6. BCL-SA-005 con un pH de 8 y BCL-SA-014 con un pH 7.

**ANEXO 14. Análisis de varianza bifactorial: concentración de NaCl (a) y cepa (b).**

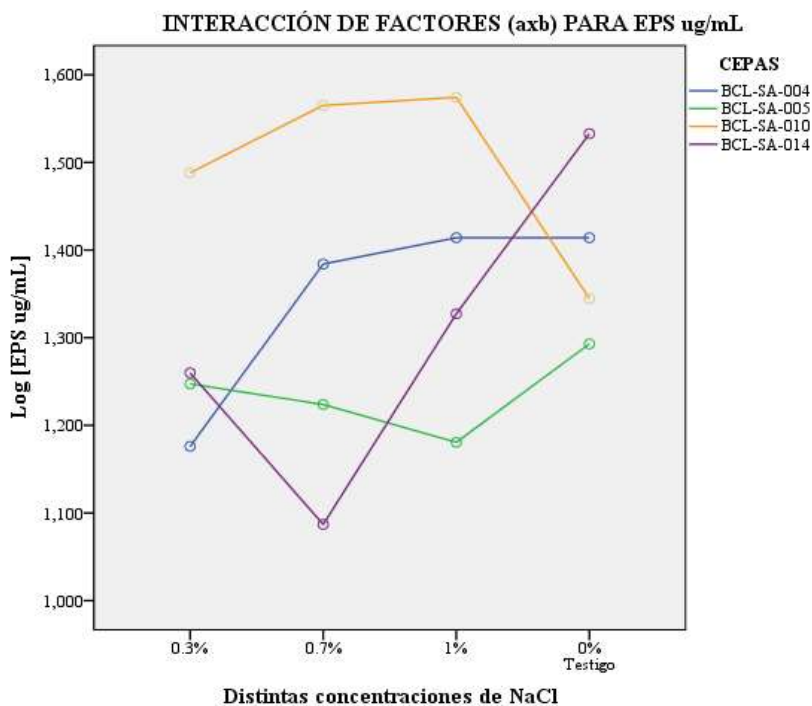
Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	Probabilidad (valor-p)
Modelo corregido	0,973	15	0,065	3,072	0,004
Efecto (a)	0,085	3	0,028	1,340	0,279
Efecto (b)	0,428	3	0,143	6,747	0,001*
Efecto axb	0,461	9	0,051	2,425	0,031*
Error	0,676	32	0,021		
Total	88,417	48			
Total corregido	1,649	47			

$$CV = (\sqrt{0,021} / 1,344) * 100 = 10 \%$$

\*  $p < \infty 0,05$

Existe un efecto significativo en la producción de EPS por parte del tipo de cepa y de su interacción con la concentración de NaCl en el medio.

Fuente: Autor



**ANEXO 15. Comparación de medias marginales de cada tratamiento.** Interacción de factores: concentración de NaCl x cepa. Las cepas BCL-SA-004, 005 y 014 produjeron más EPS cuando el medio estaba libre de NaCl; mientras que, BCL-SA-010 (cepa más productora) fue más efectiva cuando el medio tuvo 1 % de NaCl.