



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS
LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE MICROMICETOS DE VENTILAS
HIDROTERMALES PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES A
PARTIR DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

GABRIELA TEZOCOTITLA OLIVARES

DIRECTOR:

DR. GUSTAVO YÁÑEZ OCAMPO

CO- DIRECTORAS:

DRA. PATRICIA VÉLEZ AGUILAR
DRA. LUCIA ROMERO HERNÁNDEZ

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

02 DE JULIO DE 2025.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO	iv
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABLAS	ix
RESUMEN.....	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES.....	6
3. IMPORTANCIA DEL PROBLEMA.....	9
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
5. OBJETIVOS	
5.1. General.....	11
5.2. Particulares.....	11
6. MARCO TEÓRICO	
6.1. Micromicetos.....	12
6.1.1. Hongos Marinos	12
6.2. Ventiladas Hidrotermales.....	13
6.2.1. Hongos extraídos de ventiladas hidrotermales.....	14
6.2.1.1. <i>Aspergillus sydowii</i>	14
6.2.1.2. <i>Aspergillus terreus</i>	15
6.2.1.3. <i>Penicillium miczyskii</i>	16
6.2.1.4. <i>Penicillium</i> sp.....	26
6.3. Biosurfactantes.....	17
6.3.1. Producción de biosurfactantes por micromicetos.....	18
6.3.2. Métodos para la medición de actividad tensoactiva.....	18
6.3.2.1. Agar Azul de Metileno.....	18
6.3.2.2. Índice de Emulsión.....	19
6.3.2.3. Dispersión de aceite.....	20
6.4. Hidrocarburos Alifáticos.....	21

6.4.1. Interacción Hongo-Hidrocarburo.....	22
7. MÉTODOS Y TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN EMPLEADAS	
7.1. Localidades de origen de los aislados.....	23
7.2. Selección de los aislados.....	24
7.3. Hidrocarburo usado como sustrato.....	26
7.4. Bioensayos de producción de biosurfactantes <i>in vitro</i>	26
7.5. Ensayos para la detección de biosurfactantes fúngicos.....	28
7.5.1. Agar Azul de Metileno.....	29
7.5.2. Índice de Emulsión.....	30
7.5.3. Dispersión de Aceite.....	30
7.6. Microscopia Óptica.....	31
7.7. Análisis Estadístico.....	31
8. RESULTADOS	
8.1. Ensayos para la detección de biosurfactantes fúngicos.....	32
8.1.1. Agar azul de Metileno.....	32
8.1.2. Índice de Emulsión.....	33
8.1.3. Dispersión de aceite.....	36
8.2. Microscopia Óptica.....	38
8.3. Análisis Estadístico.....	38
9. DISCUSIÓN.....	41
10. CONCLUSIONES.....	44
11. REFERENCIAS.....	45
12. ANEXOS.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diversidad de hábitats donde proliferan los hongos marinos.....	13
Figura 2. Acción de los biosurfactantes en la emulsificación del petróleo	17
Figura 3. Placa de agar azul de metileno inoculada con <i>Penicillium miczynskii</i>	19
Figura 4. Prueba de Índice de Emulsión en un tubo de ensayo.....	20
Figura 5. Estructura química del n-hexadecano.....	21
Figura 6. Ubicación geográfica de la cuenca Pescadero, Golfo de California.....	23
Figura 7. Ubicación geográfica de la cuenca de Coatzacoalcos, Golfo de México.....	24
Figura 8. Bioensayos para la producción de biosurfactantes.....	27
Figura 9. Índice de Emulsión (IE ₂₄ %) a temperatura de 30°C.....	34
Figura 10. Índice de Emulsión (IE ₂₄ %) a temperatura de 22 °C.....	35
Figura 11. Dispersión de aceite a temperatura de 30 °C.....	36
Figura 12. Dispersión de aceite a temperatura de 22 °C.....	37
Figura 13. <i>Aspergillus sydowii</i>	38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Reportes selectos de hongos aislados de ambientes marinos degradadores de hidrocarburos y evidencia de su producción de biosurfactantes.....	7
Tabla 2. Aislados fúngicos seleccionados para los experimentos.....	25
Tabla 3. Diseño experimental de los bioensayos de producción de biosurfactantes.....	28
Tabla 4. Composición de los agares azul de metileno utilizados para inocular los aislados fúngicos.....	29
Tabla 5. Resultados de la prueba para evidenciar la presencia de biosurfactantes en agar azul de metileno en los aislados fúngicos	32
Tabla 6. Resultados de la prueba Spearman obtenidos en la evaluación del Índice de Emulsión.....	39

RESUMEN

La contaminación ambiental por derrames de hidrocarburos hace necesario el desarrollo, búsqueda y optimización de los medios necesarios para mitigar el daño en los ecosistemas. Mediante la biorremediación, es posible transformar y/o remover los contaminantes de una manera sustentable. Para este fin, trabajos previos han realizado la bioprospección de especies fúngicas en ventilas hidrotermales, identificando aislados con un gran potencial para la biorremediación de derrames de hidrocarburos debido a su resistencia y capacidad de supervivencia en condiciones extremas. Sin embargo, aún se desconoce la producción de biosurfactantes (moléculas que aumentan la solubilidad de sustancias hidrofóbicas, facilitando su degradación) por parte de estos hongos. Por tanto, este trabajo se centró en la evaluación de las capacidades de micromicetos hidrocarbonoclastas aislados de ventilas hidrotermales del Golfo de California para producir biosurfactantes utilizando hidrocarburos alifáticos. Para esto, los aislados se evaluaron por medio de bioensayos bajo distintas condiciones de temperatura (22°C y 30°C) y pH (4 y 8). Los ensayos también incluyeron pruebas cualitativas con agar azul de metileno, y cuantitativas como el Índice de Emulsión y la dispersión de aceite, usando compuestos como aceite de soya, glicerol y hexadecano. Los resultados revelaron variaciones en la efectividad de emulsificación de los compuestos hidrofóbicos en presencia de los biosurfactantes producidos por los aislados según el tipo de compuesto y las condiciones experimentales. En particular, el biosurfactante producido por *Asperillus terreus* alcanzó un Índice de Emulsión de 57.6% en hexadecano y 52.4% en aceite de soya a pH 8. Además, en el ensayo de dispersión de aceite, el biosurfactante producido por *P. miczynskii* a pH 8 y temperatura de 30 °C, fue de 3.5 cm, cercano al diámetro de 3.85 del control positivo (SDS), evidenciando su potencial en la biorremediación de ambientes contaminados. Estos resultados confirman el uso potencial de estos organismos en prácticas de biorremediación de hidrocarburos ante un escenario de derrame por su capacidad de producir biosurfactantes.

Palabras clave: micromicetos, biosurfactantes, hidrocarburos alifáticos, micorremediación, ventilas hidrotermales, biorremediación.

1. INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos alifáticos son compuestos orgánicos formados únicamente por átomos de carbono e hidrógeno en estructuras lineales o ramificadas. Se dividen en alcanos (enlaces simples), alquenos (con al menos un doble enlace) y alquinos (con al menos un triple enlace) (McMurry, 2016; Carey y Giuliano, 2017). Estos compuestos tienen usos industriales y en la vida cotidiana, como combustibles y materias primas químicas (Hernández, 2014).

Pese a los estándares de seguridad que rigen la industria petrolera, la contaminación por vertimientos accidentales de hidrocarburos sigue siendo frecuente, esto aunado a que entre el 80% y el 90% de la producción mundial de energía proviene de los combustibles fósiles, agrava el riesgo de derrames (Hernández, 2021). Como resultado existe una alta demanda y agotamiento de las reservas de petróleo crudo ligero y bajo esa tesitura es que se comienza a considerar la incorporación de los petróleos pesados y extra pesados en la producción de energía, dado que representan una significativa fracción del total de las reservas ya conocidas (Martínez *et al.*, 2016).

A causa del impacto ecotoxicológico causado por los derrames de hidrocarburos, se han buscado y desarrollado técnicas para su eliminación, entre ellas, la biodegradación es una alternativa viable debido a su alta efectividad (Reyes-Reyes *et al.*, 2018). La biodegradación de hidrocarburos, puede ser realizada por algunas comunidades microbianas (bacterias, hongos, algas) que, a través de la actividad bioquímica, oxidan los hidrocarburos. Algunas especies de microorganismos pueden metabolizar un número limitado de hidrocarburos, de manera que la presencia de poblaciones mixtas con diferentes capacidades metabólicas es necesaria para degradar mezclas complejas de hidrocarburos (Mellizo, 2017).

Los biosurfactantes son moléculas anfipáticas de utilidad para la biorremediación gracias a su capacidad para reducir la tensión superficial en la interfaz aceite-agua, aumentando así la solubilidad de sustancias inmiscibles en agua (Singh *et al.*, 2019). Existen dos tipos de surfactantes: 1) los naturales o biosurfactantes derivados de microorganismos, y 2) los químicos, mayormente sintetizados a partir de derivados del petróleo. Los biosurfactantes poseen varias ventajas sobre sus homólogos químicos como tener una menor toxicidad,

mayor biodegradabilidad, especificidad, biocompatibilidad, capacidad para funcionar en condiciones ambientales extremas, y también su digestibilidad (Raiger *et al.*, 2009).

La producción de biosurfactantes puede verse influenciada por la temperatura y el pH, los cuales afectan directamente la actividad metabólica de los microorganismos productores (Md, 2012). Estudios han demostrado que la eficiencia en la síntesis de biosurfactantes varía según las condiciones de cultivo, como en el caso de *Lactococcus lactis*, cuya producción óptima ocurre en rangos específicos de temperatura y pH (Souza *et al.*, 2017).

La bioprospección de microorganismos en ecosistemas extremos ha demostrado ser una estrategia eficiente para identificación y obtención de moléculas novedosas con utilidad para el ser humano. En México, a pesar de que este tema se ha estudiado poco, en los últimos 20 años se han descrito cerca de 100 compuestos bioactivos a partir de hongos (Mata *et al.*, 2018). Esto evidencia el potencial que tienen estos microorganismos para el desarrollo de estrategias novedosas y eficientes para la biorremediación de desastres ambientales por el vertimiento de crudo.

Algunas especies de bacterias, arqueas y hongos son capaces de sobrevivir en hábitats extremos, en rangos extremos de temperatura, presión, pH o salinidad (Bregnard *et al.*, 2023). Particularmente, los hongos son capaces de formar células resistentes (esporas), adaptar su morfología o cambiar la composición de su pared celular cuando las condiciones no son las adecuadas para un crecimiento activo (Bregnard *et al.*, 2023). Gracias a esta capacidad, los hongos colonizan ambientes extremos, como lo son los sedimentos de campos hidrotermales continentales y oceánicos (López-García *et al.*, 2007).

Las ventilas hidrotermales son sitios del fondo marino en donde se produce la expulsión de agua geotérmicamente calentada a través de fisuras en la corteza terrestre. Las altas temperaturas, el enriquecimiento de compuestos volátiles orgánicos, metales pesados y la presencia de infiltraciones de hidrocarburos (desde el metano hasta el heptano) termogénicamente generados, caracterizan a este sistema heterogéneo (He *et al.*, 2023; Paduan *et al.*, 2018). Aún cuando están presentes estas condiciones, las ventilas hidrotermales son áreas de alta productividad biológica dependiente de la quimiosíntesis microbiana (Menini *et al.*, 2023). Es por esto que los hongos aislados de ventilas hidrotermales, gracias

a su capacidad de adaptación a diferentes temperaturas extremas, presiones hidrostáticas altas y altas concentraciones de compuestos químicos tóxicos, tienen un gran potencial para ser usados en biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos. Por lo que, en este estudio, se evaluó la capacidad de producción de biosurfactantes por micromicetos, aislados de ventilas hidrotermales, con probada capacidad para degradar hidrocarburos, cultivados *in vitro* con hidrocarburos alifáticos como fuente de carbono.

2. ANTECEDENTES

La microbiota exhibe una notable capacidad de adaptación y colonización en una amplia variedad de hábitats debido a su variada gama genética (Coleine *et al.*, 2023). Estas características le permiten prosperar incluso en entornos extremos, considerados así por sus condiciones de temperatura, pH, presión, salinidad o radiación (Reed *et al.*, 2013), como los campos de ventilas hidrotermales marinas, que se caracterizan por estar ubicados a profundidades que varían entre los 800 y 3600 metros, y donde las temperaturas pueden alcanzar hasta los 400 °C (Oarga, 2009).

En 2018 se analizaron las condiciones abióticas de un campo de ventilas hidrotermales en la cuenca Pescadero (Golfo de California, México) y se encontraron fluidos de descarga claros, hidrocarburos, pH de 6.3, salinidad elevada y temperaturas de hasta 291 °C (Paduan *et al.*, 2018). Primero, se examinó la diversidad fúngica en los sedimentos marinos de este sistema mediante secuenciación de alto rendimiento en donde se identificaron 102 secuencias de amplicones de hongos, mayormente pertenecientes a los filos Ascomycota y Basidiomycota (Velez *et al.*, 2022). Posteriormente, mediante un enfoque de culturómica se obtuvieron los micromicetos en cultivos axénicos, destacando la presencia de especies pertenecientes al filo Ascomycota tales como *Aspergillus sydowii*, *Penicillium miczynskii* y *Aspergillus terreus* (Velez *et al.*, en prensa).

La **Tabla 1**, resume los estudios realizados en hongos aislados de ambientes marinos, destacando su capacidad para degradar hidrocarburos y producir biosurfactantes. La elección de la fuente de carbono es crucial, ya que influye significativamente en la cantidad y calidad de los biosurfactantes producidos (Bhardwaj *et al.*, 2013). Para maximizar la eficiencia de la biorremediación, es esencial optimizar las condiciones de cultivo, como la fuente de carbono, temperatura y pH.

Tabla 1. Reportes selectos de hongos hidrocarbonoclastas aislados de ambientes marinos, y evidencia de su producción de biosurfactantes.

HONGO	ORIGEN	BS PRODUCIDO	ACTIVIDAD TENSOACTIVA	REFERENCIA
<i>Thelebolus balaustiformis</i>		NR	IE 53.04% con keroseno	
<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i>	Sedimento Marino	NR	IE 63.35% con keroseno	da Silva <i>et al.</i> , 2024.
<i>Penicillium cf. p alitans</i>		NR	IE 63.71% con keroseno	
<i>Aspergillus terreus</i>	Zona costera	Ceratoplataninas	IE 83% con Dectol (decano-tolueno 65:35, v/v) TS 73 a 56.3 mN/m	Pitocchi R <i>et al.</i> , 2020.
<i>Trichoderma harzianum</i>	Zona costera	Ceratoplataninas	IE 70% con Dectol (decano-tolueno 65:35, v/v) TS 70 a 36 mN/m	
<i>Aspergillus sydowii</i>	Zona costera	NR	DA 2.9 cm con petróleo crudo	
<i>Penicillium polonicum</i>	Zona costera	NR	DA 4.7 cm con petróleo crudo	Maamar <i>et al.</i> , 2020.
<i>Penicillium cyclopium</i>	Zona costera	NR	DA 4.7 cm con petróleo crudo	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Zona costera	NR	TS 38.4 mN/m	Luepongpatana <i>et al.</i> , 2017.
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Pradera marina	SAP-Pc	IE 50% con Dectol (decano y tolueno 65:35 v/v) TS de 72 mN/m a 55 mN/m	Cicatiello <i>et al.</i> , 2016.
<i>Aspergillus ustus</i>	Costa peninsular	Glicolipoproteina	DA 78.50mm ² con petróleo crudo IE 42% usando keroseno	Kiran <i>et al.</i> , 2009.

Nota. BS: Biosurfactante, NR: no reportado, TS: Tensión Superficial, DA: Dispersión de Aceite, IE: Índice de Emulsión

De los hongos reportados en la Tabla 1, *Thelebolus balaustiformis*, aislado de sedimentos marinos, mostró un Índice de Emulsión (IE) de 53.04%, mientras que *Antarctomyces*

psychrotrophicus y *Penicillium cf. palitans* alcanzaron índices de 63.35% y 63.71%, respectivamente. Entre los más destacados se encuentra *A. terreus*, aislado de un sitio marino. Produjo ceratoplataninas con alta eficiencia, reduciendo la tensión superficial de 73 a 56.3 mN/m. Además, *A. sydowii*, aislado de una zona costera, mostró una notable capacidad de dispersión de aceite con un diámetro de 2.9 cm.

En particular, *A. terreus* y *A. sydowii* son hongos con un alto potencial para la producción de biosurfactantes y la degradación de hidrocarburos. *A. terreus* destacó por su eficiencia en la producción de ceratoplataninas y la reducción de la tensión superficial, mientras que *A. sydowii* demostró una significativa capacidad de dispersión de aceite, lo que subraya su utilidad en la biorremediación de ambientes contaminados (Maamar *et al.*, 2020).

3. IMPORTANCIA DEL PROBLEMA

En el petróleo crudo, los hidrocarburos alifáticos pueden estar presentes en forma de gases, líquidos o sólidos. Estos constituyen una gran parte de los residuos industriales y pese a los estándares de seguridad que rigen la industria petrolera, la contaminación por vertimientos accidentales de hidrocarburos sigue siendo frecuente por lo que representan una importante fuente de contaminación ambiental (Atlas y Hazen, 2011).

La liberación de hidrocarburos en el ambiente provoca graves daños ecológicos, afectando la calidad del suelo y el agua, además de amenazar la vida acuática y terrestre. Estos compuestos tienden a persistir en el entorno debido a su baja solubilidad en agua y su resistencia a la degradación natural (Das y Chandran, 2011).

Para combatir este contaminante, los biosurfactantes producidos por microorganismos, como bacterias y hongos, se han posicionado como una solución prometedora; ya que los biosurfactantes aumentan la solubilidad de los hidrocarburos, facilitando su emulsificación y biodegradación. Este enfoque biotecnológico no solo acelera la limpieza de los vertimientos, sino que también ofrece una alternativa ecológica frente a los métodos químicos tradicionales, lo que refuerza su potencial en la remediación ambiental de áreas contaminadas por petróleo y otros compuestos tóxicos (Mnif *et al.*, 2017).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los micromicetos de ambientes extremos poseen un enorme potencial para la producción de biosurfactantes. Gracias a su notable resistencia a condiciones abióticas severas, como pH extremos y altas temperaturas, estos microorganismos representan una prometedora opción para aplicaciones biotecnológicas en entornos hostiles. Sin embargo, la limitada investigación sobre su capacidad metabólica para producir compuestos de alto valor biotecnológico, como los biosurfactantes, ha frenado la implementación de tecnologías más sostenibles. El aprovechamiento de sus propiedades únicas, junto con la capacidad de los biosurfactantes para adaptarse a variaciones de pH y temperatura, podría impulsar soluciones ecológicas más eficientes en la degradación de hidrocarburos y otros contaminantes, optimizando los procesos de biorremediación en condiciones extremas.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar la producción de biosurfactantes por micromicetos aislados de ventilas hidrotermales del Golfo de California en presencia de hidrocarburos alifáticos, mediante cinéticas en medio líquido bajo diferentes condiciones abióticas para su uso potencial en la biorremediación de ambientes marinos.

5.2. Particulares

- a) Analizar la producción de biosurfactantes por tres aislados de micromicetos en bioensayos *in vitro* con agar azul de metileno.
- b) Comparar la actividad emulsificante de biosurfactantes totales producidos por micromicetos cultivados en medio líquido con hexadecano, evaluando diferentes condiciones abióticas, temperatura (22°C y 30°C) y pH (4 y 8).
- c) Identificar las variables de pH y temperatura que optimizan la producción de biosurfactantes por los micromicetos evaluados.

6. MARCO TEÓRICO

6.1 Micromicetos

Los hongos son organismos eucariotas pluricelulares o unicelulares, la mayoría de estos organismos son pluricelulares y están constituidos por hifas, que se ramifican y forman redes finas (Heredia, 2022). Su reproducción puede ser de forma sexual o asexual, por medio de esporas o trozos de micelio (Vidal, 2016).

En la actualidad, son aceptados 19 filos en los cuales se pueden clasificar a los hongos: *Aphelidiomycota*, *Ascomycota*, *Basidiobolomycota*, *Basidiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Calcarisporiellomycota*, *Chytridiomycota*, *Entomophthoromycota*, *Entorrhizomycota*, *Glomeromycota*, *Kickxellomycota*, *Monoblepharomycota*, *Mortierellomycota*, *Mucoromycota*, *Neocallimastigomycota*, *Olpidiomycota*, *Rozellomycota*, *Sanchytriomycota* y *Zoopagomycota* (Wijayawardene *et al.*, 2024).

Los aislados empleados en esta investigación pertenecen al filo *Ascomycota*, que constituye el grupo más grande de los hongos en virtud de su amplia distribución y ubicuidad (Romero, 2023). Este filo es conocido por su importancia comercial, destacando en procesos industriales relacionados a la fermentación, como la elaboración de cerveza (Vidal, 2016). Los hongos pertenecientes a este filo forman ascas, las cuales son estructuras donde se desarrollan y contienen las ascosporas, las cuales resultan de la cariogamia y la meiosis. Estos hongos poseen diferentes estrategias tróficas como la simbiosis, el saprofitismo y el parasitismo (Vidal, 2016).

6.1.1. Hongos Marinos

Un desafío en el campo de la micología ha sido la delimitación precisa de la definición de los hongos marinos. Esto, principalmente debido a que diversas especies fúngicas encontradas en ecosistemas marinos (**Figura 1**) también han sido registradas en hábitats terrestres, lo que sugiere una notable plasticidad fenotípica y mecanismos adaptativos altamente eficientes dentro del reino Fungi (Amend *et al.*, 2019).

Existen varias aproximaciones para definir a los hongos marinos, siendo la más aceptada durante muchos años la que establece que los hongos marinos obligados son aquellos que crecen y esporulan exclusivamente en hábitats marinos o estuarinos (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979). En la actualidad, la definición de hongos marinos según Pang *et al.* (2016) se fundamenta en tres criterios: “1. Capacidad de crecer y/o esporular (en sustratos) en ambientes marinos, 2. Formar relaciones simbióticas con otros organismos y 3. Demostración de su adaptación y evolución a nivel genético o que sea metabólicamente activo en ambientes marinos.”

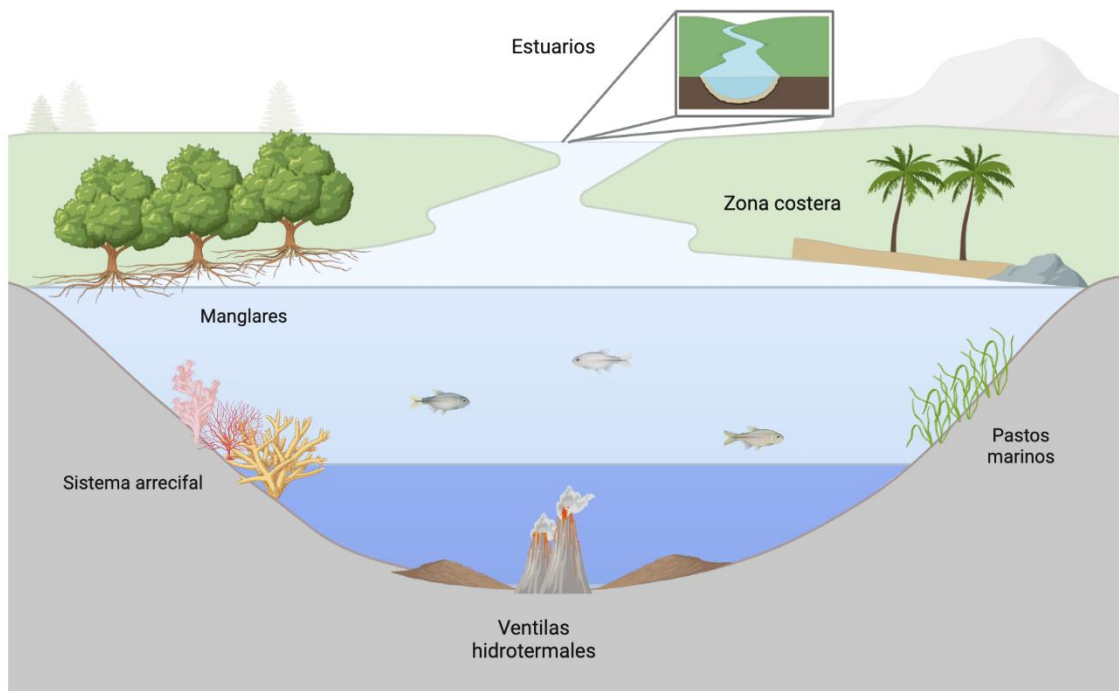


Figura 1. Diversidad de hábitats de hongos marinos.

6.2. Ventilias Hidrotermales

Las ventilas hidrotermales, ubicadas en el fondo marino, son ecosistemas extremos caracterizados por altas temperaturas, presión, y una abundancia de compuestos minerales y metales pesados expulsados por las fisuras en la corteza terrestre. A pesar de las condiciones

hostiles, estos ambientes albergan una gran diversidad microbiana, que ha desarrollado adaptaciones únicas. El interés en las ventilas hidrotermales ha crecido debido a la capacidad de sus habitantes para producir compuestos bioactivos, como enzimas termoestables y biosurfactantes, que pueden ser utilizados en procesos industriales y de biorremediación (Van Dover, 2000; Baker y German, 2021).

6.2.1. Hogos extraídos de ventilas hidrotermales

Los hongos extraídos de ventilas hidrotermales han captado la atención de la ciencia debido a su capacidad de prosperar en condiciones extremas de temperatura, presión y salinidad. Estos organismos han demostrado producir compuestos bioactivos con propiedades únicas, como enzimas termoestables y biosurfactantes, los cuales tienen potenciales aplicaciones en la industria biotecnológica y en la biorremediación (Zhang *et al.*, 2016). Además, investigaciones recientes han revelado que algunas especies de hongos aislados de estas zonas extremas son capaces de degradar hidrocarburos, lo que sugiere un importante papel en la biorremediación de ambientes contaminados por petróleo (Lai *et al.*, 2020). Estos hongos extremófilos no solo presentan adaptaciones genéticas para sobrevivir bajo condiciones hostiles, sino que también exhiben una notable capacidad para la producción de metabolitos secundarios, algunos de los cuales han mostrado actividad antimicrobiana y anticancerígena (Dai *et al.*, 2017). Este hallazgo subraya el enorme potencial biotecnológico de los hongos provenientes de estos ecosistemas profundos.

6.2.1.1 *Aspergillus sydowii*

Es un hongo halófilo, saprotrófico y ubicuo distribuido en todo el mundo y adaptado a diferentes condiciones ambientales, además de haber sido aislado de suelo, se ha encontrado en el mar debido a su tolerancia a la sal (Brant *et al.*, 2020). *Aspergillus sydowii* puede contaminar alimentos (Biango-Daniels y Hodge, 2018), en condiciones marinas, puede causar infecciones en corales abanicos de mar (Kim K y Harvell, 2004), además, es patógeno humano oportunista (Alker *et al.*, 2001).

A. sydowii es productor de una variedad de enzimas importantes desde el punto de vista biotecnológico e industrial, como lipasas, α -amilasas, xilanasas, celulasas, tanasas y queratinasas (Adegoke *et al.*, 2019; Albuquerque *et al.*, 2020; Alwakeel *et al.*, 2021). Adicional a esto, este hongo es capaz de sintetizar metabolitos como, sesquiterpenoides, alcaloides, xantonas, monoterpenos, antraquinonas, esteroides, triterpenos, difenil éteres, pironas, ciclopentenonas, antocianinas y policétidos (Liu *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2017).

Existen estudios donde se utiliza *A. sydowii* en conjunto con *Aspergillus destruens* para la biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y compuestos farmacéuticos bajo condiciones de alta salinidad (González *et al.*, 2019), o en consorcio con *Fusarium lichenicola* para degradar hidrocarburos totales de petróleo en aguas residuales de yacimientos petrolíferos (Williams y Owhonka, 2019).

6.2.1.2 *Aspergillus terreus*

Es un hongo saprófito, capaz de reproducirse sexual o asexualmente, *A. terreus* se distingue por producir conidios accesorios también llamados aleurioconidios, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. Estos conidios accesorios emergen directamente de las hifas vegetativas y se caracterizan por su ausencia de pigmentación y la presencia de una alta cantidad de β -glucanos inmunogénicos en su superficie (Deak *et al.*, 2009).

A. terreus se encuentra en diversos hábitats, como el suelo, composta, alimentos como el maíz, arroz, maní y cebada (Kozakiewicz, 1989). Este hongo es productor de micotoxinas y metabolitos secundarios utilizados en la industria farmacéutica (Alberts *et al.*, 1980), y en la industria de la fermentación (Cunha *et al.*, 2018).

Aunado a eso, *A. terreus* ha sido utilizado para biorremediar cobre de suelos en minas, también Cd, Cr y Pb de efluentes de curtidurías en conjunto con *Aspergillus fumigatus* (Palanicel *et al.*, 2023). Por otro lado, *A. terreus* ha mostrado eficiencia degradando hidrocarburos aromáticos policíclicos en crudo pesado (Al-Dossary *et al.*, 2024).

6.2.1.3 *Peicillium miczynskii*

P. miczynskii es un hongo saprofito capaz de crecer en condiciones anaerobias facultativas y altas temperaturas, el cual no solo produce conidios y clamidosporas, sino que, al ser homotático produce fácilmente ascosporas abundantes y duraderas que pueden sobrevivir a temperaturas de 90°C (Biango *et al.*, 2018). Es por esto que *P. miczynskii* es responsable del deterioro de alimentos pasteurizados como yogures, jarabes y salsas de fruta (Dagnas y Membre, 2013).

Este ascomiceto puede infectar y crecer en varios frutos como las manzanas y naranjas (Salomão, 2018) produciendo enfermedades postcosecha, lo que resulta en un producto infectado con ascosporas o jugos con patulina, que es una micotoxina (Wang *et al.*, 2023).

Por otro lado, en el ámbito de la remediación ambiental, *P. miczynskii* ha sido utilizado de forma conjunta con *Scopulariopsis brumptii* para la degradación y biotransformación del pentaclorofenol en suelos agrícolas (Hechmi *et al.*, 2016). Además, se ha demostrado la capacidad de *P. miczynskii* para bioconvertir petróleo crudo extra pesado en suelos contaminados, lo que resalta su potencial en la remediación de ambientes altamente contaminados. (Naranjo-Briceño *et al.*, 2019).

6.2.1.4. *Penicillium* sp.

Pertenece al filo Ascomycota, es un hongo filamentoso, hialofilo y saprofito. Macroscópicamente las colonias de *Penicillium* sp. son ovoides, circulares; en un principio son de color blanco y con el tiempo, dependiendo de la especie, adquieren colores azules, azul verdoso, verde, gris oliva o tonos rosados. Una de las características más importantes de *Penicillium* sp. es su forma de reproducción asexual, caracterizada por formar conidios en una estructura ramificada llamada penicilio (Pérez, 2021).

El género *Penicillium* se encuentra en diversos ambientes, principalmente en el suelo, en alimentos en descomposición y en materiales orgánicos. Algunos miembros de este género son famosos por su uso en la producción de antibióticos, como la penicilina, y en la

elaboración de quesos como el roquefort y el camembert. (Cortés-Sánchez y Mosqueda-Olivares, 2013).

Penicillium sp. es conocido por su papel en la biodegradación de microplásticos de polietileno (Aguilar, 2024), ha sido identificado como auxiliar en la biorremediación de minería de oro debido a su resistencia al mercurio (Sahana, 2024) y también en la biodegradación de los hidrocarburos de petróleo en suelo (Ahmadli, 2024).

6.3 Biosurfactantes

Los biosurfactantes son compuestos producidos por microorganismos que han ganado relevancia en diversas industrias debido a su naturaleza biodegradable y baja toxicidad en comparación con los surfactantes sintéticos. Estos compuestos, que incluyen glicolípidos, lipopéptidos y fosfolípidos, han demostrado ser efectivos en la remediación de ambientes contaminados por hidrocarburos, al aumentar la solubilidad de estos compuestos en medios acuosos (**Figura 2**), facilitando su degradación por otros microorganismos (Rodrigues *et al.*, 2021). Además, su aplicación no se limita solo a la biorremediación; los biosurfactantes también tienen un gran potencial en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica, debido a su capacidad para formar emulsiones estables y su seguridad en productos de consumo (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2019).

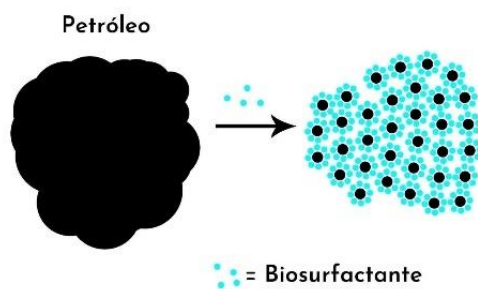


Figura 2. Acción de los biosurfactantes en la emulsificación del petróleo. (Lifeder, 2022)

Investigaciones recientes han resaltado que factores como el pH, la temperatura y la fuente de carbono utilizada durante la producción de biosurfactantes pueden influir significativamente en la cantidad y tipo de biosurfactante producido, lo que subraya la

importancia de optimizar estas variables para obtener productos con propiedades específicas. (Sen, 2020).

6.3.1. Producción de biosurfactantes por micromicetos

La mayoría de los datos científicos actuales sobre biosurfactantes provienen de estudios en bacterias, particularmente en géneros como *Pseudomonas* y *Bacillus*, que producen compuestos como glicolípidos, glicoproteínas y lipopéptidos. En comparación, los biosurfactantes fúngicos representan solo el 19% del total, con un 12% proveniente de ascomicetos y un 7% de basidiomicetos. Pese a que han sido estudiados de manera limitada, los hongos presentan la mayor diversidad estructural de biosurfactantes, algunos de los cuales son producidos exclusivamente por ellos. Por ejemplo, los soforolípidos producidos por levaduras del género *Starmerella* (Wang *et al.*, 2019), los lípidos de manosil eritritol, que se encuentran principalmente en hongos del orden Ustilaginales (Spoeckner *et al.*, 1999), y los lípidos de trehalosa, producidos exclusivamente por *Fusarium fujikuroi* (Da Silva, 2021).

La diversidad en las estructuras químicas de los biosurfactantes fúngicos está vinculada a su composición bioquímica y peso molecular, lo que les confiere una versatilidad significativa en diversas aplicaciones, tales como en el sector agrícola (Menon *et al.*, 2010), farmacéutico (Chuo *et al.*, 2019), y en la remediación ambiental (Ye *et al.*, 2016), entre otros.

6.3.2. Métodos para la medición de actividad tensoactiva

6.3.2.1. Agar Azul de Metileno

El método del agar azul de metileno es una técnica selectiva utilizada para evaluar la producción de biosurfactantes por microorganismos, incluyendo hongos. Esta técnica se basa en la capacidad de los biosurfactantes para interactuar con el tinte azul de metileno y formar halos claros alrededor de las colonias (**Figura 3**), indicando emulsificación de compuestos hidrofóbicos (Zhang *et al.*, 2020). El medio de cultivo contiene sales minerales y una fuente de carbono insoluble a alta concentración, lo que permite diferenciar entre los aislados que

producen biosurfactantes y aquellos que no lo hacen (Varjani *et al.*, 2017). En la práctica, se inoculan los aislados en platos de Petri con agar azul de metileno y se incuban a temperatura controlada durante varios días. La aparición de halos claros alrededor de las colonias sugiere la producción de biosurfactantes aniónicos, los cuales interactúan con el tinte y el cloruro de calcio presente en el medio, formando complejos que cambian el color del medio de azul a verde (Vanhulle *et al.*, 2008). Este fenómeno es una evidencia visual de la actividad biosurfactante de los microorganismos evaluados.



Figura 3. Placa de agar azul de metileno inoculada con *Penicillium miczynskii* . A: Halo claro indicador de actividad biosurfactante; B: Aislado en crecimiento. Imagen tomada el 17 de junio de 2024 por Gabriela Tezocotitla Olivares.

6.3.2.2. Índice de Emulsión

El Índice de Emulsión es una técnica cuantitativa utilizada para evaluar la capacidad de los biosurfactantes de estabilizar emulsiones de hidrocarburos en agua. Este método se basa en la creación de una mezcla de hidrocarburo y sobrenadante libre de células, seguida de agitación y un periodo de reposo de 24 horas para permitir la formación de emulsiones estables (**Figura 4**) (Pashley y Karaman, 2015). La capacidad emulsificante se mide en función del porcentaje de emulsión formado, que se calcula dividiendo la altura de la

emulsión entre la altura total de la mezcla y multiplicando el resultado por 100 (Patowary *et al.*, 2017). Este método es ampliamente utilizado en estudios de biosurfactantes debido a su simplicidad y efectividad para determinar la estabilidad y eficiencia de los biosurfactantes producidos por microorganismos en la emulsificación de compuestos hidrofóbicos (Nitschke y Costa, 2007).

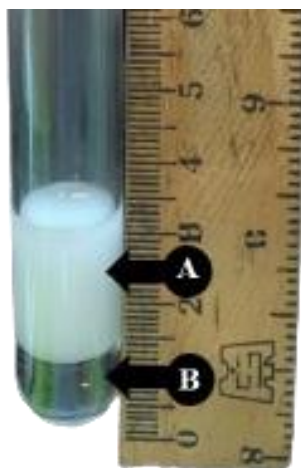


Figura 4. Prueba del índice de emulsión en un tubo de ensayo. A: Fase hidrofóbica emulsificada; B: Fase acuosa. Imagen tomada el 30 de octubre de 2024 por Gabriela Tezocotitla Olivares.

6.3.2.3. Dispersión de aceite

El método de dispersión de aceite es una técnica utilizada para evaluar la capacidad de los biosurfactantes de reducir la tensión superficial y desplazar el aceite en la superficie del agua. Este método consiste en colocar una gota de aceite sobre la superficie de un plato de Petri con agua destilada y, posteriormente, añadir una pequeña cantidad de sobrenadante libre de células que contiene el biosurfactante producido (Mulligan, 2005). La capacidad del biosurfactante se evalúa observando el diámetro de la zona clara formada alrededor de la gota de aceite, lo que indica la dispersión y reducción de la tensión superficial (Morikawa *et al.*, 2000). La efectividad de la dispersión del aceite refleja la actividad surfactante del compuesto producido por los microorganismos, siendo un indicador visual de su potencial para

aplicaciones en la biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos (Kiran *et al.*, 2009).

6.4. Hidrocarburos Alifáticos

En el petróleo crudo, los hidrocarburos alifáticos se encuentran predominantemente en la fracción saturada, compuesta por alcanos y cicloalcanos. Esta clasificación se obtiene mediante el método SARA (Saturados, Aromáticos, Resinas y Asfáltenos), el cual permite identificar la naturaleza química y solubilidad de los componentes del crudo (Speight, 2014). Entre los compuestos de esta fracción se encuentra el n-hexadecano (**Figura 5**), un alcano lineal frecuentemente utilizado como modelo en estudios de biodegradación debido a su estructura simple, baja reactividad y abundancia en ambientes contaminados por hidrocarburos (Wang *et al.*, 2011).

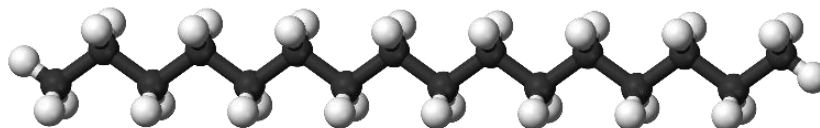


Figura 5. Estructura química del n-hexadecano. es-academic.com. (s.f.).

A pesar de su baja solubilidad en agua (2.1×10^{-5} mg/L a 25 °C), el *n*-hexadecano tiende a acumularse en sedimentos y organismos acuáticos, lo que refleja su alto potencial de bioconcentración. Esta acumulación puede tener efectos adversos en los ecosistemas acuáticos, afectando la salud de organismos como peces, moluscos y crustáceos, al alterar funciones fisiológicas esenciales y bioacumularse en la cadena trófica (Coates *et al.*, 1985; González *et al.*, 2019). Además, su persistencia en el ambiente contribuye a la contaminación crónica de suelos y cuerpos de agua, lo que representa una amenaza tanto para la biodiversidad como para la salud humana, especialmente en comunidades expuestas a fuentes de agua contaminada (Varjani, 2017).

6.4.1. Interacción Hongo-Hidrocarburo

En la última década, varios estudios han resaltado la capacidad de los hongos para interactuar con hidrocarburos alifáticos, mostrando un potencial significativo para la degradación y transformación de estos compuestos (Khan *et al.*, 2023; Da Silva *et al.*, 2023).

Los hongos, particularmente los ascomicetos y basidiomicetos, han demostrado una notable habilidad para metabolizar hidrocarburos alifáticos, empleando enzimas específicas como las monooxigenasas y dioxigenasas para oxidar estos compuestos en ambientes contaminados (Das y Chandran, 2011). Este proceso es clave en la biorremediación, ya que los hongos no solo pueden tolerar concentraciones elevadas de hidrocarburos, sino que también pueden colonizar sustratos hidrofóbicos debido a su capacidad para producir biosurfactantes que facilitan la solubilización y emulsificación de hidrocarburos (Zafra *et al.*, 2017).

Recientemente, investigaciones han documentado que especies fúngicas extremófilas, como aquellas aisladas de ambientes extremos como ventilas hidrotermales, también pueden metabolizar hidrocarburos alifáticos, ampliando el rango de aplicaciones potenciales para la biorremediación en condiciones extremas (Wang *et al.*, 2020).

7. MÉTODOS Y TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN EMPLEADAS

7.1. Localidades de origen de los aislados

Los micromicetos utilizados en esta investigación, fueron aislados a partir de sedimentos marinos colectados en campos hidrotermales de hasta 3680 m de profundidad en la Cuenca de Pescadero, Golfo de California (**Figura 6**). Las muestras fueron recolectadas por el vehículo operado remotamente *Doc Ricketts*, durante la expedición *Vents y Seeps* del Instituto de Investigación del Acuario de la Bahía de Monterey, en el buque oceanográfico (B/O) *Western Flyer* en el 2015.

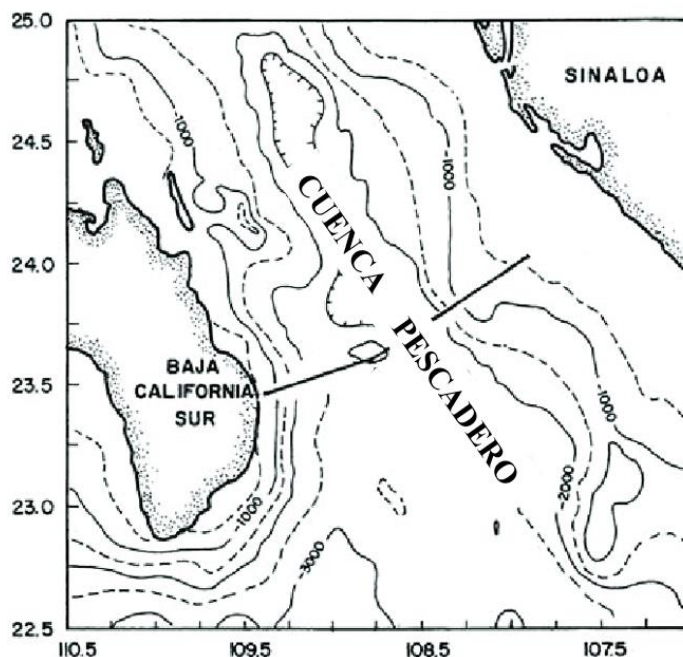


Figura 6. Ubicación geográfica ($23^{\circ} 55' 0''$ N, $108^{\circ} 45' 0''$ O) de la cuenca Pescadero al sur del Golfo de California, imagen tomada de Mascarenhas *et al.*, 2004.

El micromiceto usado como cepa de referencia, proviene de sedimentos marinos a 3240m de profundidad en Coatzacoalcos (**Figura 7**) (también conocido como Cuenca Salina), en el Golfo de México. Los hongos fueron aislados por la Dra. Patricia Velez de las muestras recolectadas por una saca testigos de caja Reineck, durante el crucero Metagenómica-Malla Fina, a bordo del buque de investigación B/O Justo Sierra en marzo de 2016.

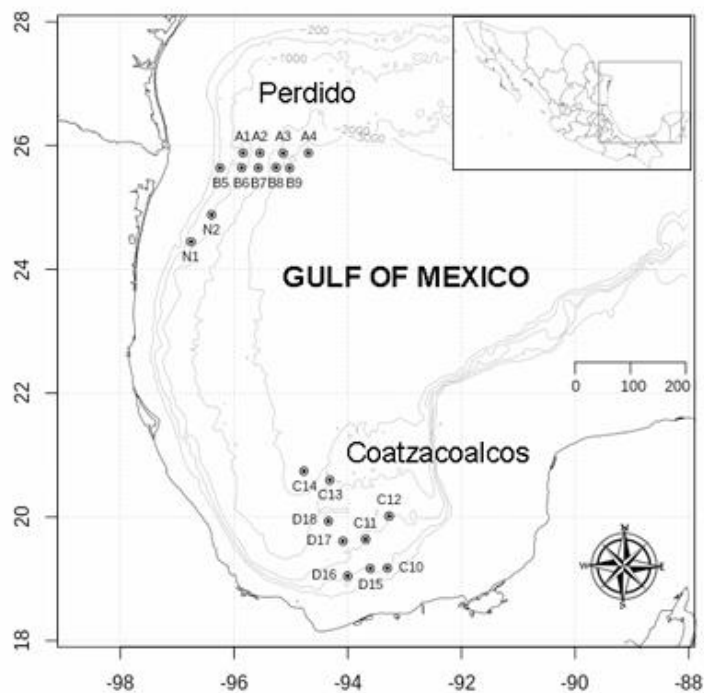


Figura 7. Ubicación geográfica de la cuenca de Coatzacoalcos al sur del Golfo de México, imagen tomada de Velez *et al.*, 2020.

Los aislados forman parte de la colección de cultivos del laboratorio C-202 del Instituto de Biología perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

7.2. Selección de los aislados

Para este estudio se seleccionaron cuatro micromicetos con antecedentes de actividad degradadora de hidrocarburos. Tres de ellos: *A. sydowii*, *A. terreus* y *P. miczynskii* fueron aislados de sedimentos de ventilas hidrotermales a altas temperaturas en el sur del Golfo de California (Velez *et al.*, 2022), mientras que *Penicillium* sp. provino de sedimentos de mar profundo en el sur del Golfo de México (Velez *et al.*, 2020) (**Tabla 2**).

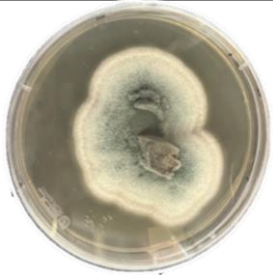

Los aislados del género *Aspergillus* fueron seleccionados por su amplia documentación como agentes degradadores de hidrocarburos, incluyendo hidrocarburos aromáticos policíclicos,



petróleo ligero y compuestos farmacéuticos en ambientes salinos (González *et al.*, 2019; Olufunmilayo *et al.*, 2020; Maamar *et al.*, 2020). Asimismo, han sido reportados como buenos productores de biosurfactantes aniónicos a partir de sustratos hidrocarbonados, tanto aromáticos como alifáticos (Spina *et al.*, 2018).

P. miczynskii, por su parte, ha mostrado capacidad para degradar hidrocarburos totales de petróleo en estudios realizados en suelos contaminados junto con *A. terreus* (Lemos *et al.*, 2002). Finalmente, *Penicillium* sp. fue incluido como cepa de referencia, dado que en ensayos previos demostró una respuesta positiva en la emulsificación del medio de cultivo, lo que sugiere la producción potencial de biosurfactantes (Velez *et al.*, 2020).

Todos los aislados fueron reactivados en placas de Petri con agar GYP y, tras 15 días de incubación, se confirmó su viabilidad mediante la observación de un crecimiento micelial activo.

Tabla 2. Aislados fúngicos seleccionados para los experimentos.

Aislado	Especie	Origen	Morfología
K3A	<i>Aspergillus sydowii</i>	Cuenca de Pescadero, ventila de alta temperatura	
43B	<i>Aspergillus terreus</i>	Cuenca de Pescadero, ventila de alta temperatura	

F	<i>Penicillium miczynskii</i>	Cuenca de Pescadero, ventila de alta temperatura	
P	<i>Penicillium</i> sp.	Cuenca de Coatzacoalcos, mar profundo	

7.3. Hidrocarburo usado como sustrato

Para evaluar la producción de biosurfactantes, se utilizó hexadecano ($C_{16}H_{34}$) como fuente de carbono en los cultivos *in vitro*. Este hidrocarburo alifático saturado fue seleccionado por ser un componente representativo de las fracciones de hidrocarburos presentes en el petróleo crudo, además de su uso frecuente en estudios de biodegradación y producción de compuestos tensoactivos por microorganismos (Varjani, 2017; Das y Chandran, 2011). Su baja solubilidad en agua y estructura lineal lo convierten en un sustrato ideal para evaluar la capacidad emulsificante y degradativa de cepas microbianas, ya que permite observar con claridad la acción de los biosurfactantes en el medio de cultivo.

7.4. Bioensayos de producción de biosurfactantes *in vitro*

La recolección de conidios desde las placas con medio GYP se llevó a cabo utilizando un asa bacteriológica, depositándolos en tubos que contenían 8 mL de agua destilada estéril. La

concentración de conidios se cuantificó empleando un espectrofotómetro NanoDrop 2000, ajustando la suspensión a una densidad óptica aproximada de 0.07.

Se preparó un medio mínimo de nutrientes a partir de la solución salina Vogel (MOLTOX®), modificada sin fuente de carbono (150 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 250 g KH_2PO_4 , 100 g NH_4NO_3 , 10 g MgSO_4 , 5 g CaCl_2 , 5ml de solución de oligoelementos) (Aspergillus y Aspergillosis, 2016), en una concentración final de 1X. Posteriormente, el medio fue dividido en dos porciones iguales: una fue ajustada a pH 4 mediante la adición de HCl, y la otra a pH 8 utilizando NaOH.

Los bioensayos de producción de biosurfactantes (**Figura 8**) se inocularon bajo condiciones estériles en tubos falcón de 50 ml, cada tubo contenía 25 ml de solución salina Vogel 1X sin fuente de carbono. Los tubos fueron suplementados con 6% v/v de n-hexadecano de la marca VWR como única fuente de carbono y 1ml de suspensión de conidios.

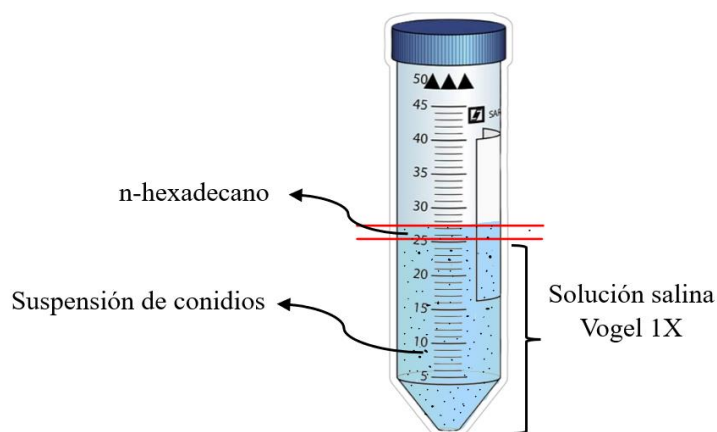


Figura 8. Bioensayos para la producción de biosurfactantes.

Los conidios de cada aislado fúngico se inocularon en medio Vogel con n-hexadecano y se sometieron a cuatro tratamientos experimentales:

1. pH 8, incubado en agitación a 22 °C
2. pH 4, incubado en agitación a 22 °C
3. pH 8 incubado en agitación a 30 °C

4. pH 4 incubado en agitación a 30 °C

Se incluyeron dos controles en el experimento: 1) Control negativo, cultivo abiótico, compuesto por solución salina Vogel y n-hexadecano, y 2) Control positivo, cultivo de *Penicillium* sp, solución salina Vogel y n-hexadecano.

Tanto los controles como los aislados fueron sometidos a los mismos tratamientos experimentales (**Tabla 3**). Cada uno de los cuatro tratamientos se replicó por triplicado para cada aislado y control. Todos los tratamientos y controles se mantuvieron en incubación durante un periodo de 15 días con agitación constante y bajo condiciones de oscuridad.

Tabla 3. Diseño experimental de los bioensayos de producción de biosurfactantes.

AISLADO	TRATAMIEN- TO 1	TRATAMIEN- TO 2	TRATAMIEN- TO 3	TRATAMIEN- TO 4
CA				
B	Temperatura:	Temperatura:	Temperatura:	Temperatura:
K	22°C	22°C	30°C	30°C
F	pH 4	pH 8	pH 4	pH 8
P				

Nota: En la primera columna se muestran las claves que identifican a los aislados y controles usados (CA: Control Abiótico, K: *A. sydowii*, F: *P. miczynskii*, B: *A. terreus*, P: *Penicillium* sp.); las columnas posteriores detallan las condiciones usadas en cada tratamiento.

7.5. Ensayos para la detección de biosurfactantes fúngicos

Una vez terminado el periodo de incubación de los aislados fueron trasladados al Centro de Investigación de Recursos Bióticos (CIRB) perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex). Los cultivos fueron filtrados con ayuda de papel filtro grado 5 de la marca Whatman en tubos de ensayo y conservados en refrigeración.

7.5.1. Agar Azul de Metileno

Se utilizó agar azul de metileno como medio selectivo para evaluar la producción de biosurfactantes por los aislados, dado que permite la detección de halos claros alrededor de las colonias, indicando la emulsificación de compuestos hidrofóbicos (Zhang *et al.*, 2020). Cada aislado de la **Tabla 2** fue inoculado por duplicado en platos de Petri con medio agar azul de metileno con diferentes fuentes de carbono como se describe en la **Tabla 4**. Posterior a esto, los platos se incubaron durante 7 días a 23 °C.

Como control positivo del ensayo se utilizó SDS al 2% p/v debido a su conocida capacidad como surfactante aniónico, lo que asegura la formación de halos claros alrededor de las colonias al interactuar con compuestos hidrofóbicos (Varjani *et al.*, 2017). Por otro lado, para el control negativo fue utilizada agua destilada.

Tabla 4. Composición de los agares azul de metileno utilizados para inocular los aislados fúngicos.

	MEDIO 1	MEDIO 2	MEDIO 3
COMPOSICIÓN MINERAL (g/L)	KH ₂ PO ₄ (0.7)	KH ₂ PO ₄ (0.7)	KH ₂ PO ₄ (0.7)
	NaNO ₃ (2)	NaNO ₃ (2)	NaNO ₃ (2)
	NaHPO ₄ (0.9)	NaHPO ₄ (0.9)	NaHPO ₄ (0.9)
	CaCl ₂ (0.2)	CaCl ₂ (0.2)	CaCl ₂ (0.2)
	MgSO ₄ (0.4)	MgSO ₄ (0.4)	MgSO ₄ (0.4)
	Agar	Agar	Agar
	bacteriológico (15)	bacteriológico (15)	bacteriológico (15)
	Azul de metileno (0.03)	Azul de metileno (0.03)	Azul de metileno (0.03)
FUENTE DE CARBONO (%)	Aceite de Soya comercial (2)	Glicerol (2)	Hexadecano (6)

7.5.2. Índice de Emulsión

La prueba de Índice de Emulsión se empleó para evaluar la capacidad de los biosurfactantes producidos por los aislados en los bioensayos (**Tabla 3**), para estabilizar emulsiones de hidrocarburos en agua. Como modelos de estudio se seleccionaron dos diferentes compuestos hidrofóbicos: aceite de soya comercial y hexadecano.

Se añadió en tubos de ensayo de 16x150 mm con tapa de rosca, una mezcla (1:1 v/v) de sustrato hidrofóbico, y sobrenadante libre de células (SLC). Posteriormente la mezcla se agitó en un vortex durante 1 min y se mantuvo en ausencia de perturbaciones por 24 horas. Para cada aislado el ensayo se realizó por triplicado.

En esta prueba, se incluyeron controles negativos y controles positivos, el control negativo consistía en una mezcla de agua destilada e hidrocarburo, lo que permitía asegurar que no se generara emulsificación en ausencia de un agente emulsificante activo. El control positivo contenía SDS al 2% v/v e hidrocarburo, ya que el SDS es un surfactante conocido por su capacidad para formar emulsiones estables, proporcionando un estándar de comparación para evaluar la capacidad emulsificante de los aislados (Pashley y Karaman, 2015). Transcurridas las 24 horas, se midieron las fases y se obtuvo el porcentaje de emulsión utilizando la siguiente formula:

$$IE_{24} \% = \frac{\text{altura de la emulsion}}{\text{altura total de la mezcla}} \times 100$$

7.5.3. Dispersión de Aceite

La prueba de dispersión de aceite se empleó para evaluar la capacidad de los biosurfactantes producidos por los aislados para reducir la tensión superficial y desplazar el aceite en la superficie del agua, lo que indica su efectividad en la degradación de compuestos hidrofóbicos. En este ensayo se emplearon platos de Petri que contenían 10 ml de agua destilada y 100 µL de aceite de soya para generar una capa hidrófoba. Posteriormente, se agregaron 10 µL de SLC sobre la capa de aceite para evaluar la actividad surfactante. Este ensayo se realizó por duplicado y se utilizó SDS al 2% v/v como control positivo, ya que es

reconocido por su capacidad para romper las barreras de tensión superficial y dispersar el aceite (Mulligan, 2005). El control negativo consistió en agua destilada, con el objetivo de descartar efectos no relacionados con la acción del biosurfactante.

7.6. Microscopia Óptica

Para examinar de forma más detallada las interacciones entre los hongos, el hexadecano y los posibles biosurfactantes producidos por los aislados, se tomó una muestra directamente desde la interfaz formada entre el micelio fúngico, el biosurfactante y el medio de cultivo, utilizando un asa bacteriológica estéril. Esta muestra fue colocada en un portaobjetos y cubierta con un cubreobjetos para su observación en fresco. Se utilizó microscopía de contraste diferencial de interferencia (DIC) a un aumento de 40X, lo que permitió visualizar en tiempo real las características morfológicas del sistema y posibles modificaciones estructurales asociadas a la interacción con compuestos hidrofóbicos. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio Axio Imager.Z2 (Zeiss) y procesadas mediante el software ZEN (Blue Edition), lo que facilitó un análisis preciso de los detalles microscópicos observados.

7.7. Análisis Estadístico

Para evaluar la distribución de los datos obtenidos en el ensayo de Índice de Emulsión (IE_{24}), se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y posteriormente se aplicó el coeficiente de correlación de Spearman para evaluar la relación entre las variables de estudio en el programa R en su versión 4.4.1.

8. RESULTADOS

8.1. Ensayos para la detección de biosurfactantes fúngicos

8.1.1. Agar azul de Metileno

Se observó un cambio notable en la coloración del medio de azul de metileno, lo que sugiere una interacción efectiva entre los biosurfactantes producidos y el tinte, confirmando su naturaleza aniónica. En la **Tabla 5** se muestran los resultados obtenidos en esta prueba, los cuales fueron evaluados de manera cualitativa, diferenciando claramente los controles positivos y negativos.

Tabla 5. Resultados de la prueba en agar azul de metileno para evidenciar la presencia de biosurfactantes en los aislados fúngicos.

AISLADO	FUENTE DE CARBONO		
	HEXADECANO	SOYA	GLICEROL
<i>H₂O</i>	-	-	-
<i>SDS</i>	+	+	+
<i>A. sydowii</i> (K)	++	++	+++
<i>A. terreus</i> (B)	+++	+++	+++
<i>P. miczynskii</i> (F)	+++	++	++
<i>Penicillium sp.</i> (P)	+++	++	+++

Nota. (+) El aislado presentó crecimiento y formó halos blancos, (++) el aislado presentó crecimiento y halos prominentes, (+++) el aislado presentó crecimiento con una cobertura total de halos en la caja Petri, (-) el aislado no creó halo.

En el medio que contenía hexadecano, todos los aislados manifestaron una actividad significativa (+++), lo que indica una alta afinidad por este compuesto hidrofóbico. En comparación, los medios que contenían aceite de soya y glicerol presentaron una respuesta más moderada, con un doble positivo (++), lo que sugiere una menor afinidad de los biosurfactantes hacia estos compuestos en las condiciones experimentales utilizadas.

8.1.2. Índice de Emulsión

La **Figura 9** muestra los resultados del ensayo de Índice de Emulsión (IE₂₄ %) de los diferentes aislados (*A. sydowii*, *A. terreus*, *P. miczynskii* y *Penicillium* sp.) a 30°C, comparados con el control positivo (SDS), utilizando aceite de soya y hexadecano como fuentes hidrofóbicas y evaluando dos condiciones de pH (4 y 8).

El control positivo (SDS) presentó valores constantes de emulsificación, del 62% con aceite de soya, y una ligera mejora con hexadecano a pH 8 (64%). En contraste, los controles abióticos no mostraron actividad emulsionante, con valores de 0% en todos los tratamientos.

Los biosurfactantes totales del SLC de *Penicillium* sp. (cepa de referencia) mostraron el mayor Índice de Emulsión con aceite de soya a pH 4 (55.27%) y hexadecano (55.20%) bajo la misma condición. Estos resultados posicionan a *Penicillium* sp. como un productor eficiente de emulsificantes en condiciones ácidas, con una ligera disminución del IE₂₄ a pH 8 en ambos sustratos, lo cual sugiere una mayor estabilidad de sus compuestos emulsificantes en ambientes ácidos. Entre los aislados, el SLC de *A. terreus* mostró una respuesta del 57.60% con hexadecano a pH 8. Por su parte, los SLC de *P. miczynskii* y *A. sydowii* evidenciaron niveles de emulsificación del 52.62% y 50.72%, respectivamente, con aceite de soya a pH 4.

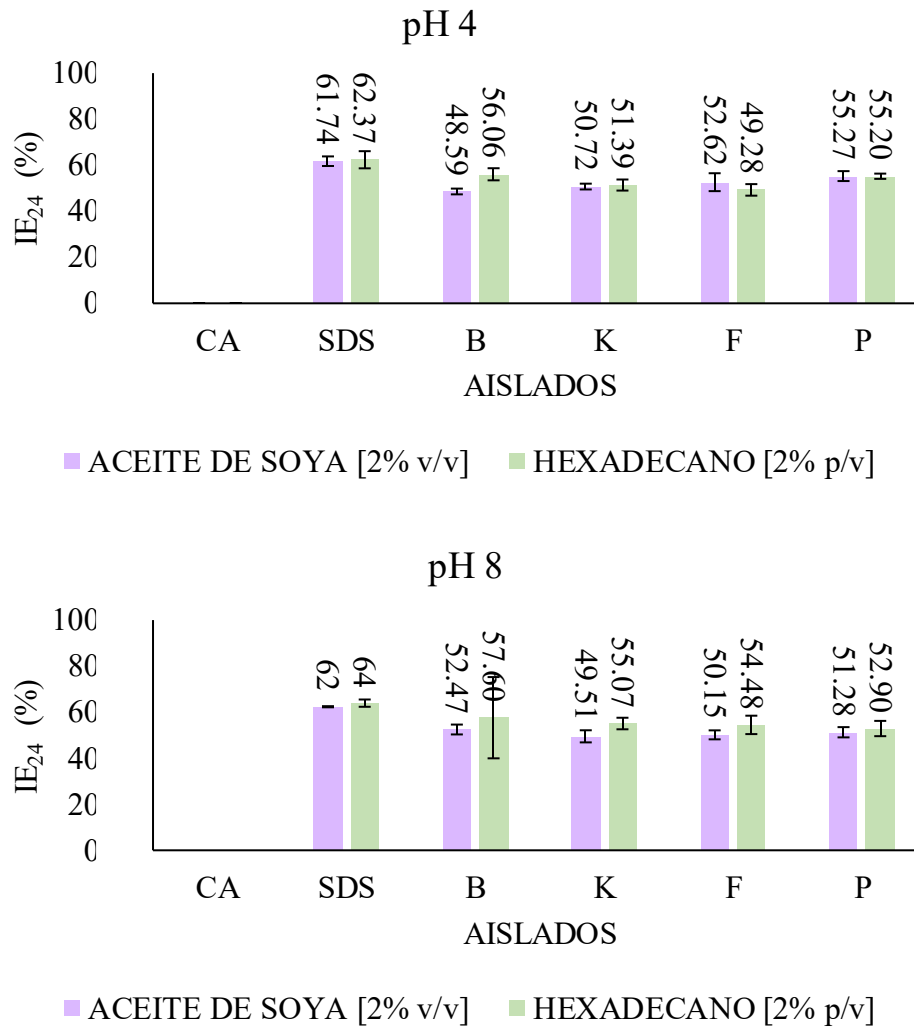


Figura 9. Índice de emulsión (IE₂₄ %) a temperatura de 30 °C. CA: Control Abiótico, SDS: Duodecilsulfato sódico, B: *A. terreus*, K: *A. sydowii*, F: *P. miczynskii*, P: *Penicillium* sp.

La **Figura 10** muestra el Índice de Emulsión (IE₂₄ %) determinado a 22 °C para el SLC de los cuatro aislados (*A. terreus*, *A. sydowii*, *P. miczynskii* y *Penicillium* sp.), comparados frente al SDS. La evaluación se realizó bajo dos condiciones de pH (4 y 8) y utilizando dos fases oleosas distintas: aceite de soya al 2% v/v, y hexadecano al 2% v/v.

A un pH 4, el SLC de *Penicillium* sp. presentó un IE₂₄ de 58% con aceite de soya y 53% con hexadecano. Estos valores fueron superados por SDS (61.97% y 66.29%, respectivamente) y por el SLC de *P. miczynskii* con hexadecano (53.62%). Los valores del SLC de *A. sydowii*

fueron similares o inferiores respecto a la cepa de referencia, especialmente con hexadecano, donde *A. sydowii* tuvo un IE₂₄ de 52.31% *P. miczynskii* y *A. terreus* mostraron un comportamiento comparable al de *Penicillium sp.*, especialmente en hexadecano.

En un pH 8, el SLC de *Penicillium sp.* mostró una disminución en aceite de soya (48.61%) y en hexadecano (50.72%). En este contexto, *P. miczynskii* presentó un IE₂₄ superior (60.47%), lo que indica una respuesta más eficiente a este pH y sustrato. En contraste, *A. sydowii* mantuvo un desempeño estable, pero por debajo de la cepa de referencia.

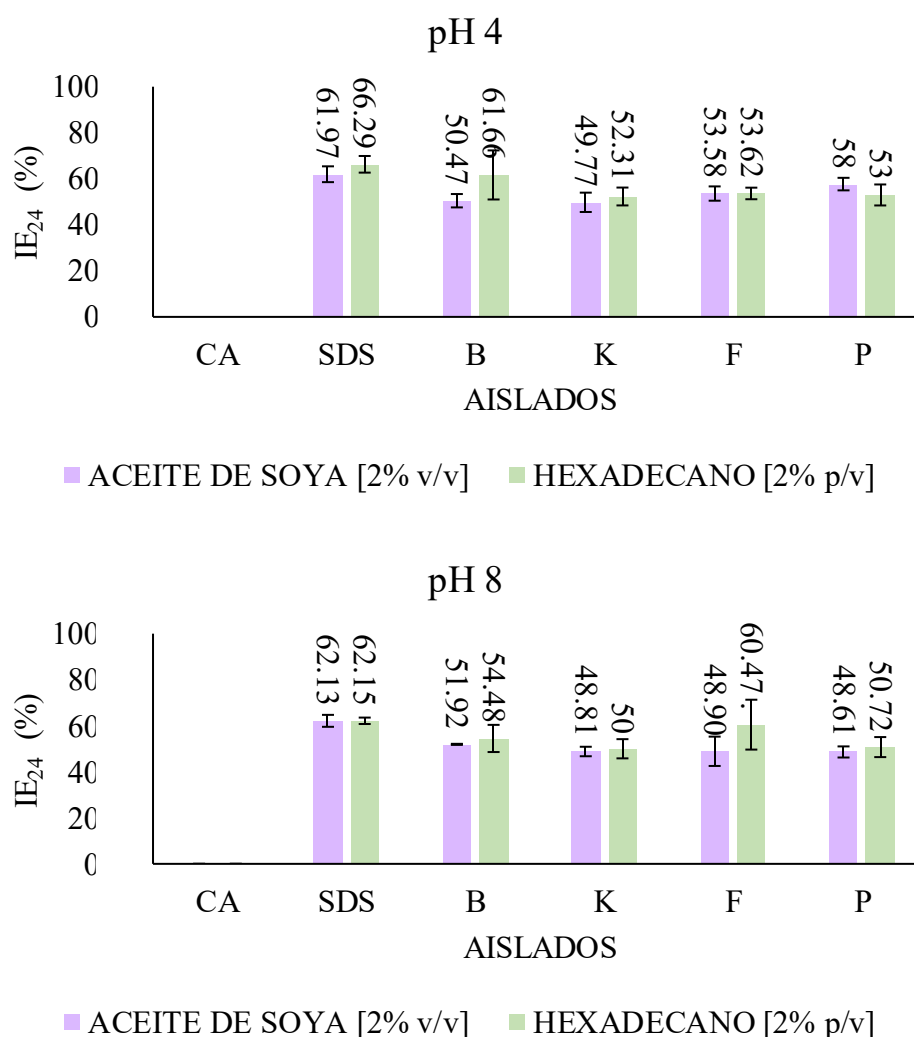


Figura 10. Índice de Emulsión (IE₂₄ %) a temperatura de 22 °C. CA: Control Abiótico, SDS: Duodecilsulfato sódico, B: *A. terreus*, K: *A. sydowii*, F: *P. miczynskii*, P: *Penicillium sp.*

8.1.3. Dispersión de aceite

La **Figura 11** muestra el diámetro de dispersión (en cm) obtenido mediante el ensayo de dispersión de gotas de aceite realizado a 30 °C. El SDS presentó el mayor diámetro de dispersión, confirmando su eficiencia como surfactante de referencia. Al comparar los aislados, se observa que el diámetro de dispersión tiende a incrementarse a pH 8 para todos los aislados, lo que sugiere que los compuestos tensoactivos producidos por estos microorganismos presentan mayor estabilidad y actividad en condiciones ligeramente alcalinas. Los aislados *P. miczynskii* (F) y *A. sydowii* (K) destacaron por sus diámetros de dispersión relativamente altos a pH 8, aunque sin alcanzar el nivel de eficiencia del SDS. Por otro lado, *A. terreus* (B) muestra una marcada diferencia entre ambos pH, con una muy baja actividad a pH 4 y una mejora considerable a pH 8, lo que podría indicar una producción de biosurfactantes dependiente de la alcalinidad o una mayor estabilidad estructural de las moléculas tensoactivas en ese rango de pH.

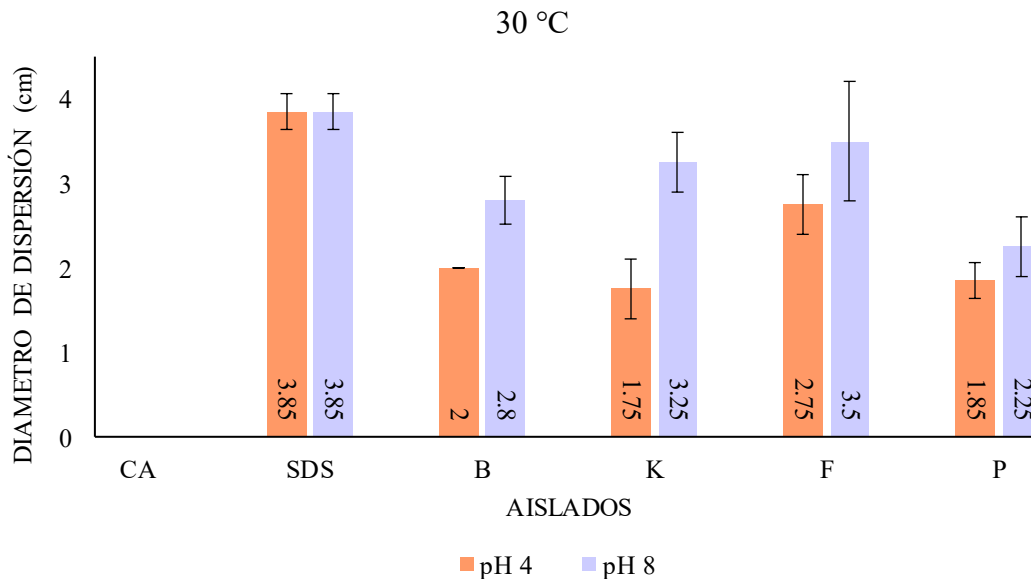


Figura 11. Dispersión de aceite a temperatura de 30 °C. CA: Control Abiótico, SDS: Duodecilsulfato sódico, B: *A. terreus*, K: *A. sydowii*, F: *P. miczynskii*, P: *Penicillium* sp.

En la **Figura 12** se presenta el comportamiento tensoactivo de los aislados (*A. terreus*, *A. sydowii*, *P. miczynskii* y *Penicillium* sp.), evaluado a través del diámetro de dispersión obtenido en la prueba de dispersión de gotas de aceite a 22 °C. Los resultados muestran que

el SDS genera los mayores diámetros de dispersión tanto a pH 4 como a pH 8, lo cual era previsible dada su naturaleza como surfactante químico altamente eficiente. Sin embargo, al comparar el desempeño de los aislados, se observa que la mayoría presenta una mayor actividad emulsificante a pH 8, lo que sugiere que los biosurfactantes producidos por estos microorganismos son más activos o estables en condiciones alcalinas.

A. terreus (B) destaca por su incremento notable en el diámetro de dispersión al pasar de pH 4 a pH 8, lo cual podría deberse a que el pH alcalino mejora la estabilidad de las moléculas producidas. Por otro lado, *A. sydowii* (K) muestra resultados más variables, reflejados en sus amplios intervalos de error, lo que podría indicar una emulsificación más sensible a condiciones ambientales.

P. miczynskii (F) y *Penicillium* sp. (P) presentaron un comportamiento que confirma su preferencia por pH 8, alcanzando diámetros de dispersión mayores en comparación con pH 4, lo que indica una mayor eficiencia interfacial en condiciones ligeramente alcalinas. A pesar de que ninguno de los aislados alcanzó los valores obtenidos con el SDS, varios muestran actividad significativa, lo que destaca su potencial como productores de biosurfactantes.

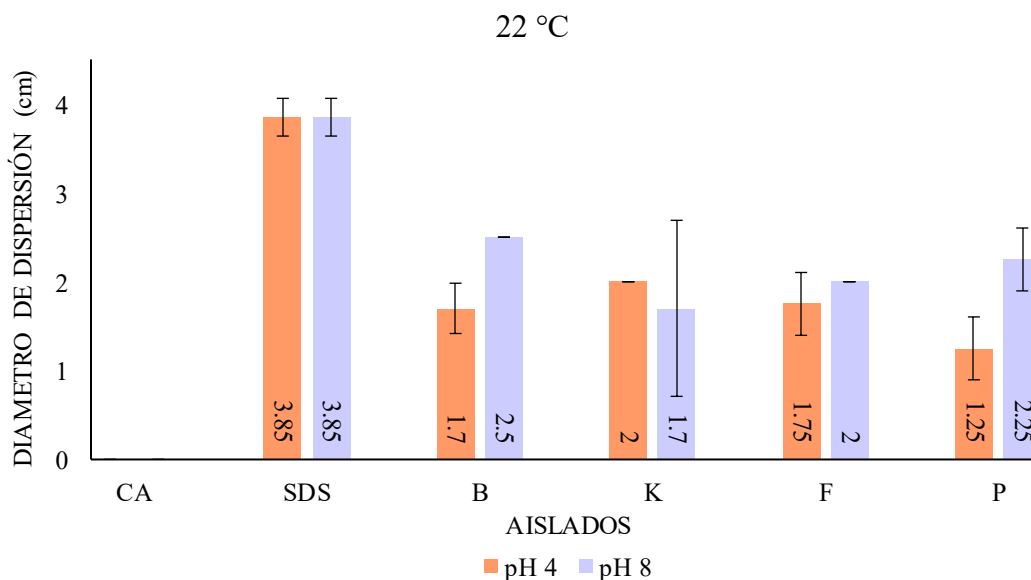


Figura 12. Dispersión de aceite a temperatura de 22 °C. CA: Control Abiótico, SDS: Duodecilsulfato sódico, B: *A. terreus*, K: *A. sydowii*, F: *P. miczynskii*, P: *Penicillium* sp.

8.2. Microscopía Óptica

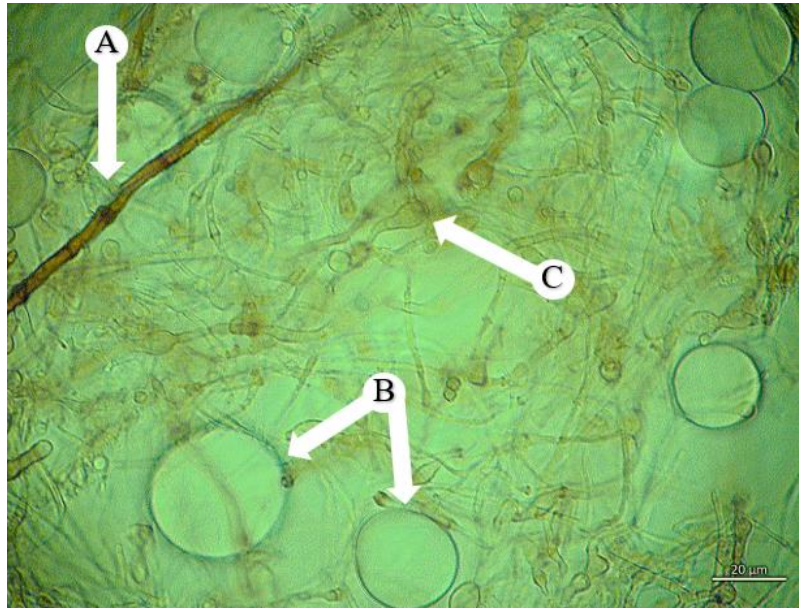


Figura 13. *Aspergillus sydowii*. Estructura observada con microscopía de Contraste de Interferencia Diferencial (DIC) en un pH 8 a temperatura de 22 °C, en donde se observan: A: hifas, B: micelas, C: conidios.

Las imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste interferencial diferencial (DIC) de *A. sydowii* (K) revelaron detalles morfológicos distintivos del hongo. Se observaron hifas septadas con bordes bien definidos, así como micelas, que indican la posible acumulación de compuestos hidrofóbicos, presumiblemente biosurfactantes. Además, se observaron conidios, esporas producidas de forma asexual.

8.3. Análisis Estadístico

Para evaluar la normalidad de los datos correspondientes al Índice de Emulsión en cada aceite utilizado (aceite de soya y hexadecano), se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk. Aunque los resultados en el aceite de soya, indicaron que los datos seguían una distribución normal, se aplicó la prueba de Spearman debido a que eran pocos datos. La **tabla 6** presenta los

resultados de la prueba de correlación de Spearman aplicada al Índice de Emulsión (IE 24%) en diferentes condiciones de temperatura (30°C y 22°C) y pH (4 y 8). Los valores de p indican la significancia estadística de la correlación, mientras que ρ representa la intensidad y dirección de la correlación, ya sea positiva o negativa.

Tabla 6. Resultados de la prueba Spearman obtenidos en la evaluación del Índice de Emulsión.

AISLADO	T.30		T.22		pH 4		pH 8		
	p	ρ	p	ρ	P	ρ	p	P	
SOYA	SDS	0.333	0.866	1	0.5	1	0.5	0.333	0.866
	B	1	0.5	0.333	-1	0.333	1	1	-0.5
	K	1	0	1	0	0.333	-0.866	0.333	0.866
	F	1	-0.5	0.333	1	1	-0.5	1	-0.5
	P	0.333	-0.866	0.666	-0.5	1	0	0	-1
HEXADECANO	SDS	0.333	-0.866	1	-0.5	1	0	0.333	1
	B	1	0	1	0.5	0.333	-0.866	0.333	1
	K	0.666	0.5	1	0	0	-1	0.333	-0.866
	F	0.666	-0.5	1	0	0.666	-0.5	0.333	-0.866
	P	0.333	-0.866	1	-0.5	0.333	0.866	0.333	1

Nota. SDS: duodecilsulfato sódico, B: *A. terreus*, K: *A. sydowii*, F: *P. miczynskii*, P: *Penicillium* sp, p: significancia estadística, ρ : coeficiente de correlación, T: temperatura.

Para el aceite de soya, el SDS mostró una alta compensación en sí mismo en todas las condiciones ($\rho = 0.866$ o $\rho = 0.5$), como era de esperarse. En comparación, el aislado *A. terreus* (B) presentó correlaciones moderadas en varias condiciones, especialmente a pH 4 ($\rho = 1$), lo que sugiere un comportamiento similar al SDS en esta condición específica. El aislado *A. sydowii* (K) mostró valores de valoración nula o negativos en la mayoría de las condiciones, con la excepción del pH 8 ($\rho = 0.866$), lo que indicaría una afinidad más marcada hacia el SDS únicamente bajo esa condición. El aislado *P. miczynskii* (F) tuvo una valoración negativa general ($\rho = -0.5$), evidenciando un patrón diferente al SDS. En

contraste, *Penicillium* sp. (P) presentó una compresión negativa alta ($\rho = -0.866$ y $\rho = -1$) a 30 °C y pH 8, indicando un comportamiento opuesto al SDS en estas condiciones.

Con respecto al hexadecano, el SDS solo tuvo una alta graduación a pH 8 ($\rho = 1$). El aislado *Penicillium* sp. (P) fue el único que mostró una graduación perfecta ($\rho = 1$) a pH 8, lo cual sugiere una emulsificación muy similar a la del SDS en estas condiciones. En contraste, los aislados *A. sydowii* (K) y *P. miczynskii* (F) presentaron correlaciones negativas fuertes ($\rho = -0.866$) a pH 8, lo que evidencia una emulsificación muy distinta a la del SDS bajo esas condiciones. El aislado *A. terreus* (B), por su parte, tuvo una clasificación perfecta ($\rho = 1$) únicamente a pH 8, indicando una afinidad con el comportamiento del SDS en ambientes ligeramente alcalinos.

9. DISCUSIÓN

En los ensayos con agar azul de metileno el cambio de color, de azul a verde en el medio sugiere la interacción de los biosurfactantes con azul de metileno y cloruro de calcio. Esto confirma la presencia de biosurfactantes de naturaleza aniónica, capaces de interactuar con iones catiónicos como el calcio.

Todos los aislados estudiados demostraron la capacidad de producir biosurfactantes en presencia de hexadecano, aceite de soya y glicerol, siendo el hexadecano el sustrato que promovió la mayor actividad biosurfactante, en la mayoría de los casos. En particular, *A. terreus* mostró la mayor actividad biosurfactante entre todos los aislados, con cobertura total de halo (+++) en las tres fuentes de carbono. Este comportamiento es consistente con estudios previos. Por ejemplo, *A. terreus* ha mostrado una alta eficiencia de emulsificación (IE) del 83% utilizando Dectol como sustrato (Pitocchi *et al.*, 2020). Además, investigaciones han demostrado que *A. terreus* puede degradar eficazmente el azul de metileno, lo que respalda su capacidad para interactuar con compuestos aniónicos (Parshetti *et al.*, 2006).

En comparación, el hongo control *Penicillium sp.* también presentó una alta actividad biosurfactante, especialmente en hexadecano y glicerol, pero su desempeño fue levemente inferior al de *A. terreus* en medio de soya. Esto sugiere que, aunque *Penicillium sp.* es un productor eficiente, ciertos aislados como *A. terreus* pueden superar su rendimiento bajo condiciones específicas, lo que destaca su potencial en aplicaciones biotecnológicas como la biorremediación.

Esta tendencia también se reflejó en los resultados del Índice de Emulsión, el cual varió significativamente según el pH y la temperatura. Por ejemplo, *A. terreus* presentó un 52.47% de emulsión en aceite de soya a 30 °C y pH 8, frente al 48.59% a pH 4, mientras que *P. miczynskii*, en hexadecano a 22°C y pH 4 mostró un Índice de Emulsión de 53.62 y a pH 8 del 60.47%, superando al aislado de referencia (*Penicillium sp.*) que tuvo una emulsión del 53% a pH 4 y del 50.72% a pH 8. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Pitocchi *et al.* (2020), quienes identifican en *A. terreus* la producción de ceratoplataninas con alta eficiencia emulsionante, y con lo observado por Maamar *et al.* (2020) en *A. sydowii*, que mostró alta actividad biosurfactante a una temperatura de 28 °C.

Además, los aislados presentaron un Índice de Emulsión superior en hexadecano respecto al aceite de soya en todas las condiciones evaluadas, lo que sugiere una mayor afinidad de los biosurfactantes por compuestos hidrocarbonados apolares y una mejor capacidad de emulsificación bajo diferentes condiciones ambientales. Este comportamiento podría atribuirse a que la estructura del biosurfactante producido está mejor adaptada para interactuar con moléculas apolares como el hexadecano, cuya emulsión estable resulta particularmente útil en aplicaciones industriales, incluyendo la biorremediación y la extracción mejorada de petróleo.

Hasta donde se ha documentado, no existen informes previos que evalúen el índice de emulsificación en *A. sydowii*, *A. terreus* o *P. miczynskii* utilizando hexadecano y aceite de soya como fases oleosas, por lo que estos resultados podrían representar una primera aproximación al estudio de su actividad biosurfactante en estas condiciones. En el caso de *Penicillium* sp., si bien se ha reportado previamente su capacidad para emulsionar hexadecano (Zhao *et al.*, 2024), la información disponible sobre su comportamiento con aceite de soya es escasa. Estos hallazgos amplían el conocimiento sobre la versatilidad de estos hongos marinos en la producción de biosurfactantes y su potencial uso en procesos que requieren emulsificación de compuestos apolares.

En cuanto a la capacidad de dispersión, se observó que *P. miczynskii* mostró la mayor eficacia a pH 8 y 30 °C. Este resultado es coherente con lo reportado por Luepongpatana *et al.* (2017), quienes documentaron una elevada actividad tensoactiva en *Aureobasidium pullulans* bajo condiciones alcalinas. La capacidad de los biosurfactantes para reducir la tensión superficial y dispersar aceites es clave para su aplicación en ambientes contaminados con hidrocarburos. En este sentido, *P. miczynskii* se perfila como un candidato prometedor para el tratamiento de suelos o cuerpos de agua contaminados con compuestos hidrofóbicos, especialmente en condiciones ligeramente alcalinas, donde su desempeño es más eficaz.

Por otro lado, el análisis estadístico basado en la prueba de correlación de Spearman reveló que tanto la temperatura como el pH influyen significativamente en la producción de biosurfactantes, aunque el grado de correlación depende del tipo de aceite y del aislado en cuestión. Las correlaciones más fuertes se observaron con hexadecano, lo cual podría reflejar

una mayor afinidad de los biosurfactantes por hidrocarburos altamente hidrofóbicos, resultando en una emulsificación más eficiente bajo condiciones controladas. En contraste, las correlaciones fueron más débiles en medios con aceite de soya, lo que podría deberse a una menor eficiencia de los biosurfactantes bajo estas condiciones. Esto indica que la eficacia de los biosurfactantes no solo está determinada por las variables físico-químicas, sino también por la compatibilidad estructural entre el biosurfactante y el compuesto hidrofóbico, subrayando la importancia de elegir tanto el microorganismo como las condiciones óptimas según la aplicación deseada.

Finalmente, los valores de p asociados a los coeficientes de Spearman, presentados en la **Tabla 10**, mostraron que las correlaciones fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los casos extremos, lo que confirma que los efectos observados no fueron aleatorios y que las variables experimentales influyeron efectivamente en el Índice de Emulsión. En aquellos casos con correlaciones débiles, los valores de p no mostraron significancia estadística ($p > 0.05$), lo que refuerza la idea de que el impacto de la temperatura y el pH puede variar dependiendo del tipo de aceite y del hongo evaluado.

10. CONCLUSIONES

Los aislados *A. terreus*, *A. sydowii* y *P. miczynskii* produjeron biosurfactantes con actividad emulsificante, siendo óptima su eficiencia a pH 8 y 30 °C. Asimismo, se demostró que la eficiencia de estos biosurfactantes varía dependiendo del sustrato utilizado y las condiciones experimentales de temperatura y pH.

Los biosurfactantes producidos mostraron una alta capacidad emulsificante, destacándose por su afinidad hacia compuestos hidrofóbicos como el hexadecano, con el cual formaron emulsiones estables

Las condiciones experimentales de pH y temperatura afectan directamente la producción y actividad de los biosurfactantes, sugiriendo que su aplicación debe adaptarse a entornos específicos para maximizar su rendimiento, especialmente en procesos industriales o de biorremediación.

11. REFERENCIAS

- Adegoke, S. A., & Odibo, F. J. C. (2019). Production, purification and characterization of α -amylase of *Aspergillus sydowii* IMI 502692. *Plant cell biotechnology and molecular biology*, 20, 1050-1058.
- Adekunle, A. T., Ester, B. B., Olabisi, A., Peter, O. S. B., Joshua, I. U. J., & Alfa, S. (2015). Characterization of new glycosphorolipid-surfactant produced by *Aspergillus Niger* and *Aspergillus flavus*. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 3(4), 34-39.
- Ahmadli, A. (2024). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by fungi strains of *Aspergillus* sp.-17, *Rhizopus* sp.-81, *Penicillium* sp.-94 isolated from oil-contaminated soils of Azerbaijan. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 100, p. 02007). EDP Sciences.
- Al-Dossary, M. A., Ahmed, Z. A., & Al-Khatib, F. M. (2024) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in Basrah heavy crude oil by *Aspergillus terreus*.
- Alberts, A. W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., ... & Springer, J. (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(7), 3957-3961.
- Albuquerque, K. K., Albuquerque, W. W., Costa, R. M., Batista, J. M. S., Marques, D. A., Bezerra, R. P., ... & Porto, A. L. (2020). Biotechnological potential of a novel tannase-acyl hydrolase from *Aspergillus sydowii* using waste coir residue: Aqueous two-phase system and chromatographic techniques. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101453.
- Alker, A. P., Smith, G. W., & Kim, K. (2001). Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan corals. *Hydrobiologia*, 460, 105-111.
- Alwakeel, S. S., Ameen, F., Al Gwaiz, H., Sonbol, H., Alghamdi, S., Moharram, A. M., & Al-Bedak, O. A. (2021). Keratinases produced by *Aspergillus stelliformis*,

- Aspergillus sydowii*, and *Fusarium brachygibbosum* isolated from human hair: yield and activity. *Journal of Fungi*, 7(6), 471.
- Aguiar, A., Gama, L., Fornari, M., Neto, A., de Souza, R., Perna, R., ... & Ottoni, C. (2024). Bioprospecting of Mangrove Filamentous Fungi for the Biodegradation of Polyethylene Microplastics. *Journal of Marine Science and Engineering*, 12(9), 1629.
- Amend, A., Burgaud, G., Cunliffe, M., Edgcomb, V. P., Ettinger, C. L., Gutiérrez, M. H., & Gladfelter, A. S. (2019). Fungi in the marine environment: Open questions and unsolved problems. *MBio*, 10(2), 10-1128.
- Domsch, K. H., Gams, W., & Anderson, T. H. (1980). Compendium of soil fungi. Volume 1. *Aspergillus and Aspergillosis*. (2016, 9 febrero). Vogel's Minimal Medium - *Aspergillus* and *Aspergillosis*. *Aspergillus* And *Aspergillosis*. https://www.aspergillus.org.uk/lab_protocols/vogels-minimal-medium/
- Atlas, R. M., & Hazen, T. C. (2011). *Oil biodegradation and bioremediation: A tale of the two worst spills in U.S. history*. *Environmental Science & Technology*, 45(16), 6709–6715.
- Baker, E.T., & German, C.R. (2021). Venting of deep-sea hydrothermal fields: volcanic and tectonic controls. *Nature Geoscience*, 14 (1), 1-9.
- Barnes, N. M., Khodse, V. B., Lotlikar, N. P., Meena, R. M., & Damare, S. R. (2018). Bioremediation potential of hydrocarbon-utilizing fungi from select marine niches of India. *3 Biotech*, 8, 1-10.
- Bhardwaj, G., Cameotra, S.S., and Chopra, H.K. (2013) Biosurfactants from fungi: a review. *J Pet Environ Biotechnol* 4:1-6.
- Biango-Daniels, M. N., & Hodge, K. T. (2018). Sea salts as a potential source of food spoilage fungi. *Food Microbiology*, 69, 89-95.

- Biango-Daniels, M. N., Wang, T. W., & Hodge, K. T. (2018). Draft genome sequence of the patulin-producing fungus *Paecilomyces niveus* strain CO7. *Genome Announcements*, 6(25), 10-1128.
- Brandt, S. C., Ellinger, B., Van Nguyen, T., Harder, S., Schlüter, H., Hahnke, R. L., ... & Gand, M. (2020). *Aspergillus sydowii*: genome analysis and characterization of two heterologous expressed, non-redundant xylanases. *Frontiers in microbiology*, 11, 2154.
- Bregnard, D., Leins, A., Cailleau, G., Vieth-Hillebrand, A., Eichinger, F., Ianotta, J., ... & Junier, P. (2023). Unveiling microbial diversity in deep geothermal fluids, from current knowledge and analogous environments. *Geothermal Energy*, 11(1), 28.
- Carey, F. A., & Giuliano, R. M. (2017). *Química Orgánica* (10^a ed.). McGraw-Hill.
- Chuo, S. C., Ahmad, A., Mohd-Setapar, S. H., Mohamed, S. F., & Rafatullah, M. (2019). Utilization of green sophorolipids biosurfactant in reverse micelle extraction of antibiotics: kinetic and mass transfer studies. *Journal of Molecular Liquids*, 276, 225-232.
- Cicatiello, P., Gravagnuolo, A. M., Gnani, G., Varese, G. C., & Giardina, P. (2016). Marine fungi as source of new hydrophobins. *International journal of biological macromolecules*, 92, 1229-1233.
- Coates, M., Connell, D. W., & Barron, D. M. (1985). Aqueous solubility and octan-1-ol-water partition coefficients of aliphatic hydrocarbons. *Environmental science & technology*, 19(7), 628-632.
- Coleine, C., Stajich, J. E., & Selbmann, L. (2022). Fungi are key players in extreme ecosystems. *Trends in ecology & evolution*, 37(6), 517-528.
- Cortés-Sánchez, A. D. J., & Mosqueda-Olivares, T. (2013). Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Química viva*, 12(2), 64-90.
- Cunha da Cruz, J., Machado de Castro, A., & Camporese Sérvulo, E. F. (2018). World market and biotechnological production of itaconic acid. *3 Biotech*, 8, 1-15.

- da Silva, A. F., Banat, I. M., Giachini, A. J., & Robl, D. (2021). Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *44*(10), 2003-2034.
- Da Silva, A. F., Banat, I. M., Robl, D., & Giachini, A. J. (2023). Fungal bioproducts for petroleum hydrocarbons and toxic metals remediation: recent advances and emerging technologies. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *46*(3), 393-428.
- Da Silva, M. K., Barreto, D. L. C., Vieira, R., Neto, A. A., de Oliveira, F. S., Convey, P., ... & Rosa, L. H. (2024). Diversity and enzymatic, biosurfactant and phytotoxic activities of culturable Ascomycota fungi present in marine sediments obtained near the South Shetland Islands, maritime Antarctica. *Extremophiles*, *28*(2), 20.
- Dai, S., Wang, Z. y Zhang, X. (2017). Hydrothermal vent fungi as sources of new bioactive compounds.. *Marine Drugs*, *15* (8), 259.
- Dagnas, S., & Membré, J. M. (2013). Predicting and preventing mold spoilage of food products. *Journal of food protection*, *76*(3), 538-551.
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, *2011*(1), 941810.
- Deak, E., Wilson, S. D., White, E., Carr, J. H., & Balajee, S. A. (2009). *Aspergillus terreus* accessory conidia are unique in surface architecture, cell wall composition and germination kinetics. *PLOS one*, *4*(10), e7673.
- Floyd, J. (2021). Assessing the impact of microorganisms capable of degrading biodiesel and diesel fuel in storage tanks.
- Ganesh Kumar, A., Manisha, D., Sujitha, K., Magesh Peter, D., Kirubakaran, R., & Dharani, G. (2021). Genome sequence analysis of deep sea *Aspergillus sydowii* BOBA1 and effect of high pressure on biodegradation of spent engine oil. *Scientific Reports*, *11*(1), 9347.
- Gao, T., Cao, F., Yu, H., & Zhu, H. J. (2017). Secondary metabolites from the marine fungus *Aspergillus sydowii*. *Chemistry of Natural Compounds*, *53*, 1204-1207.

- González-Abradelo, D., Pérez-Llano, Y., Peidro-Guzmán, H., del Rayo Sánchez-Carbente, M., Folch-Mallol, J. L., Aranda, E., ... & Batista-García, R. A. (2019). First demonstration that ascomycetous halophilic fungi (*Aspergillus sydowii* and *Aspergillus destruens*) are useful in xenobiotic mycoremediation under high salinity conditions. *Bioresource technology*, 279, 287-296.
- es-academic.com. (s.f.). Imagen del *n*-hexadecano [Ilustración]. es-academic.com. <https://es-academic.com/dic.nsf/eswiki/1309012>
- González, M., Pérez, L., & Ramírez, J. (2019). *Impacto ambiental de los hidrocarburos en ecosistemas terrestres y acuáticos*. Editorial Ciencias Ambientales.
- Hamasaki, T., Nakajima, H., Yokota, T., & Kimura, Y. (1983). A new metabolite, 3-carboxy-2, 4-diphenyl-but-2-enoic anhydride, produced by *Aspergillus nidulans*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(4), 891-892.
- He, S., Ma, M., Epstein, S., & Yin, Y. (2023). Microbes from marine distinctive environments. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1300210.
- Hechmi, N., Bosso, L., El-Bassi, L., Scelza, R., Testa, A., Jedidi, N., & Rao, M. A. (2016). Depletion of pentachlorophenol in soil microcosms with *Byssoschlamys nivea* and *Scopulariopsis brumptii* as detoxification agents. *Chemosphere*, 165, 547-554.
- Heredia, G. (2022, 1 noviembre). *Visualizando lo invisible del reino de los hongos*. INECOL. Recuperado 12 de agosto de 2024, de <https://www.inecol.mx/index.php/divulgacion/ciencia-hoy/visualizando-lo-invisible-del-reino-de-los-hongos>
- Iñiguez, I. M. (2022). Geometría y estructura de sistemas hidrotermales sub-superficiales en la cuenca Pescadero Sur, Golfo de California, a partir de batimetría de alta resolución y perfiles acústicos someros.
- Jimoh, A. A., & Lin, J. (2019). Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 184, 109607.
- Khan, A. H. A., Tanveer, S., Kiyani, A., Barros, R., Iqbal, M., & Yousaf, S. J. A. B. (2023). Biosurfactant-producing *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Candida* performed higher

- biodegradation of diesel oil than a non-producing fungal strain. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 59(3), 282-289.
- Kim, K., & Harvell, C. D. (2004). The rise and fall of a six-year coral-fungal epizootic. *the american naturalist*, 164(S5), S52-S63.
- Kiran, G. S., Hema, T. A., Gandhimathi, R., Selvin, J., Thomas, T. A., Ravji, T. R., & Natarajaseenivasan, K. (2009). Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73(2), 250-256.
- Kohlmeyer J, Kohlmeyer E (1979) Marine mycology. The higher fungi. Academic Press, New York
- Kozakiewicz, Z. (1989). *Aspergillus species on stored products* (No. 161, pp. 188-pp).
- Lai, Q., Shao, Z. y Cui, Z. (2020). Fungal biodegradation of hydrocarbons in deep-sea hydrothermal vents. *Frontiers in Microbiology*, 11, 310.
- Lass-Flörl, C. (2012). *Aspergillus terreus*: how inoculum size and host characteristics affect its virulence. *Journal of Infectious Diseases*, 205(8), 1192-1194.
- Lemos, J. L. S., Rizzo, A. C., Millioli, V. S., Soriano, A. U., de Moura Sarquis, M. I., Santos, R., & Cruz, O. (2002, October). Petroleum degradation by filamentous fungi. In *The 9th Annual International Petroleum Environmental Conference* (pp. 22-25).
- Lifeder. (2022). *Biosurfactantes: qué son, clasificación, producción y aplicaciones* [Imagen]. Recuperado de <https://www.lifeder.com/surfactantes-biosurfactantes/>
- Liu, S., Wang, H., Su, M., Hwang, G. J., Hong, J., & Jung, J. H. (2017). New metabolites from the sponge-derived fungus *Aspergillus sydowii* J05B-7F-4. *Natural Product Research*, 31(14), 1682-1686.
- López-García, P., Vereshchaka, A., and Moreira, D. (2007). Eukaryotic diversity associated with carbonates and fluid-seawater interface in Lost City hydrothermal field. *Environ. Microbiol.* 9, 546–554.

- Luepongpattana S., et al (2017) Detection of yeast and yeast-like fungi for biosurfactant production isolated from the coastal areas of Koh Si Chang. En: 26.^a reunión anual de la Sociedad tailandesa de biotecnología y conferencia internacional, págs. 469-477.
- Luna, J. M., Rufino, R. D., Jara, A. M. A., Brasileiro, P. P., & Sarubbo, L. A. (2015). Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 480, 413-418.
- Maamar, A., Lucchesi, M. E., Debaets, S., Nguyen van Long, N., Quemener, M., Coton, E., ... & Matallah-Boutiba, A. (2020). Highlighting the crude oil bioremediation potential of marine fungi isolated from the Port of Oran (Algeria). *Diversity*, 12(5), 196.
- Mascarenhas Jr, A. S., Castro, R., Collins, C. A., & Durazo, R. (2004). Seasonal variation of geostrophic velocity and heat flux at the entrance to the Gulf of California, Mexico. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 109(C7).
- Mata, R., Figueroa, M., Rivero-Cruz, I., & Macías-Rubalcava, M. L. (2018). Insights in fungal bioprospecting in Mexico. *Planta médica*, 84(09/10), 594-605.
- McMurry, J. (2016). *Química Orgánica*. Cengage Learning.
- Md, F. (2012). Biosurfactant: production and application. *J Pet Environ Biotechnol*, 3(4), 124.
- Menini, E., Calado, H., Danovaro, R., Manea, E., & Halpin, P. N. (2023). Towards a global strategy for the conservation of deep-sea active hydrothermal vents. *npj Ocean Sustainability*, 2(1), 22.
- Menon, V., Prakash, G., Prabhune, A., & Rao, M. (2010). Biocatalytic approach for the utilization of hemicellulose for ethanol production from agricultural residue using thermostable xylanase and thermotolerant yeast. *Bioresource technology*, 101(14), 5366-5373.
- Mnif, I., Ghribi, D., Ayedi, Y., Ellouze-Chaabouni, S., & Chamkha, M. (2017). *Biosurfactant production by microorganisms and related applications in environmental*

- biotechnology*. In D. Ghribi (Ed.), *Biodegradation and Bioremediation of Polluted Systems* (pp. 127–144). Springer.
- Morikawa, M., Hirata, Y., & Imanaka, T. (2000). A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(3), 211-218.
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133(2), 183-198.
- Mullins, O. C. (2010). *The Asphaltenes*. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 3(1), 179-200.
- Naranjo-Briceño, L., Pernía, B., Perdomo, T., González, M., Inojosa, Y., De Sisto, Á., ... & León, V. (2019). Potential role of extremophilic hydrocarbonoclastic fungi for extra-heavy crude oil bioconversion and the sustainable development of the petroleum industry. *Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance*, 559-586.
- Nitschke, M., & Costa, S. G. V. A. O. (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 252-259.
- Oarga, A. (2009). Life in extreme environments. *Revista de Biologia e ciencias da Terra*, 9(1), 1-10.
- Othman, A. R., Ismail, N. S., Abdullah, S. R. S., Hasan, H. A., Kurniawan, S. B., Sharuddin, S. S. N., & Ismail, N. I. (2022). Potential of indigenous biosurfactant-producing fungi from real crude oil sludge in total petroleum hydrocarbon degradation and its future research prospects. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(3), 107621.
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International journal of molecular sciences*, 12(1), 633-654.
- Padmapriya, B., Suganthi, S. y Anishya, R.S. (2013). Screening, optimization, and production of biosurfactants from *Candida* species isolated from petroleum-contaminated soils.

- Paduan, J. B., Zierenberg, R. A., Clague, D. A., Spelz, R. M., Caress, D. W., Troni, G., ... & Wheat, C. G. (2018). Discovery of hydrothermal vent fields on Alarcón Rise and in Southern Pescadero Basin, Gulf of California. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 19(12), 4788-4819.
- Palanivel, T. M., Pracejus, B., & Novo, L. A. (2023). Bioremediation of copper using indigenous fungi *Aspergillus* species isolated from an abandoned copper mine soil. *Chemosphere*, 314, 137688.
- Pang, K. L., Overy, D. P., Jones, E. G., da Luz Calado, M., Burgaud, G., Walker, A. K., ... & Bills, G. F. (2016). 'Marine fungi' and 'marine-derived fungi' in natural product chemistry research: toward a new consensual definition. *Fungal Biology Reviews*, 30(4), 163-175.
- Parshetti, G. K., Kalme, S. D., Saratale, G. D., & Govindwar, S. P. (2006). Biodegradation of malachite green by *Kocuria rosea* MTCC 1532. *Acta Chimica Slovenica*, 53(4), 492-498.
- Pashley, R. M., & Karaman, M. E. (2021). *Applied colloid and surface chemistry*. John Wiley & Sons.
- Patowary, R., Patowary, K., Kalita, M. C., & Deka, S. (2017). Characterization of biosurfactant produced during degradation of hydrocarbons using crude oil as sole source of carbon. *Frontiers in Microbiology*, 8, 279.
- Pérez Reyes, M. C. J., Sánchez Hernández, G., Martínez Flores, R., Garza Rivera, J. L., & Espinosa Rodríguez, J. (2021). *Mohos productores de micotoxinas*. Recuperado 23 de septiembre de 2024, de: https://masam.cuautitlan.unam.mx/mohos_toxigenos_unigras/penicillium.html
- Pitocchi, R., Cicatiello, P., Birolo, L., Piscitelli, A., Bovio, E., Varese, G. C., & Giardina, P. (2020). Cerato-platanins from marine fungi as effective protein biosurfactants and bioemulsifiers. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2913.
- Reed, C. J., Lewis, H., Trejo, E., Winston, V., & Evilia, C. (2013). Protein adaptations in archaeal extremophiles. *Archaea*, 2013(1), 373275.

- Reyes-Reyes, M. A., Puentes-Cala, E. A., Casanova-Montes, E. L., López-Deluche, F., Panqueva-Álvarez, J. H., & Castillo-Villamizar, G. A. (2018). Inmovilización de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo crudo en matrices orgánicas naturales y sintéticas. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 34(4), 597-609.
- Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J., & Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57(4), 609-618.
- Romero Villacis, L. M. (2023). *Aislamiento e identificación de hongos con capacidad biodegradadora de plásticos pet del centro de reciclaje Fabricio Valverde en puerto Ayora-Galápagos* (Bachelor's thesis).
- Sahana, L. A. A., Mohamad, Y., & Br, G. R. C. B. (2024). Isolation and Identification of Mercury-Resistant Fungi as Bioremediation Agents from Gold Mining. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 12(2), 57-65.
- Salomão, B. D. C. M. (2018). Pathogens and spoilage microorganisms in fruit juice: an overview. *Fruit juices*, 291-308.
- Sen, R. (2020). Biosurfactantes en biotecnología sostenible: producción y aplicaciones. *Tendencias en biotecnología*, 38 (9), 907-915.
- Souza, E. C., Azevedo, P. O. D. S. D., Domínguez, J. M., Converti, A., & Oliveira, R. P. D. S. (2017). Influence of temperature and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434. *CyTA-Journal of Food*, 15(4), 525-530.
- Speight, J. G. (2014). *Handbook of Petroleum Product Analysis*. John Wiley & Sons.
- Spoeckner, S., Wray, V., Nimtz, M., & Lang, S. (1999). Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 33-39.
- Van Dover, C. L. (2021). The ecology of deep-sea hydrothermal vents. In *The ecology of deep-sea hydrothermal vents*. Princeton University Press.

- Vanhulle, S., Enaud, E., Trovaslet, M., Billottet, L., Kneipe, L., Jiwan, J. L. H., ... & Marchand-Brynaert, J. (2008). Coupling occurs before breakdown during biotransformation of Acid Blue 62 by white rot fungi. *Chemosphere*, 70(6), 1097-1107.
- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277–286.
- Varjani, S. J., Upasani, V. N., & Junnarkar, A. (2017). Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant by indigenous pseudomonas aeruginosa and its application for removal of hydrophobic organic compound (hexadecane) from hydrophobic surfaces. *Bioresource Technology*, 235, 49-58.
- Velez, P., Gasca-Pineda, J., & Riquelme, M. (2020). Cultivable fungi from deep-sea oil reserves in the Gulf of Mexico: Genetic signatures in response to hydrocarbons. *Marine environmental research*, 153, 104816.
- Velez, P., Gasca-Pineda, J., Hernandez-Monroy, A., Martinez-Hernandez, M., Arista-Romero, A., López-Lobato, M. A., Rangel-Grimaldo, M., Salcedo, D. L., Figueroa, M. Culturomics and bioactivity potential of fungi from deep-sea hydrothermal vents and an oxygen minimum zone. *Botanica Marina*, en prensa.
- Velez, P., Salcedo, D. L., Espinosa-Asuar, L., Gasca-Pineda, J., Hernandez-Monroy, A., & Soto, L. A. (2022). Fungal Diversity in Sediments From Deep-Sea Extreme Ecosystems: Insights Into Low-and High Temperature Hydrothermal Vents, and an Oxygen Minimum Zone in the Southern Gulf of California, Mexico. *Frontiers in Marine Science*, 9, 802634.
- Salazar Vidal, V. (2016). *Manual de Micología Básica: Introducción al Estudio de los Hongos*.
- Villegas-Mendoza, J., Gómez-Ocampo, E., Velásquez-Aristizábal, J., & Rodríguez-Escobar, D. (2022). Microbial metabolic activity in two basins of the Gulf of Mexico influenced by mesoscale structures. *Journal of Marine Systems*, 234, 103781.

- Wang, L., Liu, Y., Ma, Y., Wu, Y., & Li, Y. (2011). *Biodegradation of n-hexadecane by bacterial consortium enriched from oil-contaminated soil and its potential use in bioremediation*. *Journal of Environmental Sciences*, 23(9), 1533-1541.
- Wang, M., Mao, W., Wang, X., Li, F., Wang, J., Chi, Z., ... & Liu, G. (2019). Efficient simultaneous production of extracellular polyol esters of fatty acids and intracellular lipids from inulin by a deep-sea yeast *Rhodotorula paludigena* P4R5. *Microbial Cell Factories*, 18, 1-13.
- Wang, T. W., Strickland, D. A., Haredy, Y., Cox, K. D., & Hodge, K. T. (2023). A quantitative PCR assay for detection of the mycotoxigenic plant pathogen and food spoiling mold *Paecilomyces niveus* in fruit, food, and soil. *bioRxiv*, 2023-02.
- Wang, T. W., Wilson, A. G., Peck, G. M., Gibney, P. A., & Hodge, K. T. (2024). Patulin contamination of hard apple cider by *Paecilomyces niveus* and other postharvest apple pathogens: Assessing risk factors. *International Journal of Food Microbiology*, 412, 110545.
- Wang, W., Shao, Z., & Liu, J. (2020). Hydrocarbon degradation by extremophiles: Current progress and future directions. *Journal of Environmental Sciences*, 99, 290-306.
- Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., Mikhailov, K. V., Péter, G., Aptroot, A., Pires-Zottarelli, C. L., ... & Karpov, S. A. (2024). Classes and phyla of the kingdom Fungi. *Fungal diversity*, 1-165.
- Williams, J. O., & Owonka, A. Biodegradation Potentials of *Aspergillus sydowii* and *Fusarium lichenicola* on Total Petroleum Hydrocarbon in an Oilfield Wastewater in Rivers State.
- Ye, M., Sun, M., Wan, J., Feng, Y., Zhao, Y., Tian, D., ... & Jiang, X. (2016). Feasibility of lettuce cultivation in sophorolipid-enhanced washed soil originally polluted with Cd, antibiotics, and antibiotic-resistant genes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124, 344-350.

- Zafra, G., Absalón, Á. E., & Cortés-Espinosa, D. V. (2017). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by two fungal strains isolated from tropical soils in Mexico. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(3), 499-510.
- Zhang, G., Fang, Y., and Sun, W. (2016). Thermophilic fungi from deep-sea hydrothermal vents and their potential applications. *Journal of Applied Microbiology*, 121 (2), 348-360.
- Zhang, X., Li, Z., Wang, L., & Zhou, Q. (2020). Selective media and colorimetric indicators for screening biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Environmental Sciences*, 92, 11-18.
- Zhao, X., Wu, Y., & Li, M. (2024). Biosurfactant production and hydrocarbon emulsification by marine *Penicillium* sp. isolated from oil-contaminated sediments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(2), 88.

12. ANEXOS

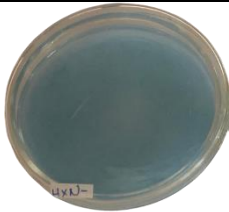

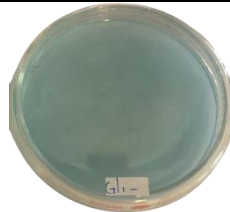
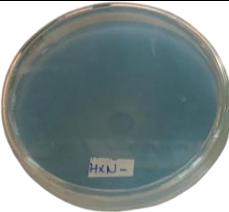
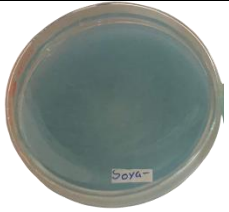
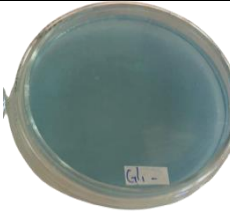
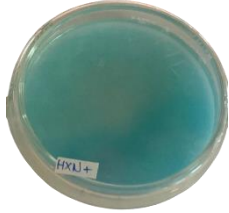
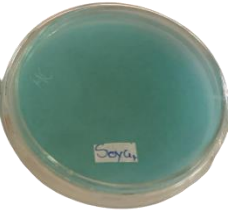
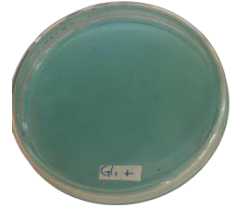

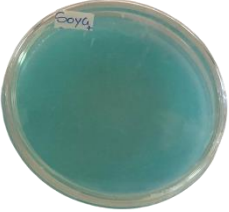
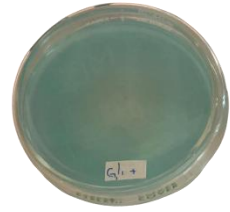



RESULTADOS MEDIO AZUL DE METILENO

















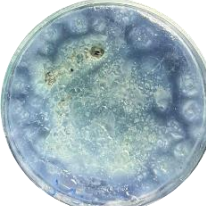



+ Crecimiento y Halo

++ Crecimiento y abundancia de halos

+++ Crecimiento, totalidad de halo en el plato Petri

- No crea Halo

Aislado	Rep		HEXADECANO		SOYA		GLICEROL
H2O	1	-		-		-	
	2	-		-		-	
SDS	1	+		+		+	
	2	+		+		+	
<i>Penicillium</i> sp.	1	++ +		++ +		++ +	

	2	++ +		+ + +		+ + +	
<i>A. sydowii</i> (K)	1	+		+ +		+ + +	
	2	++ +		+ +		+ + +	
<i>A. terreus</i> (B)	1	++ +		+ + +		+ + +	
	2	++ +		+ + +		+ + +	
<i>P. miczynskii</i> (F)	1	++ +		+ +		+ +	
	2	++ +		+ +		+ +	