

# UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS, BIOQUÍMICAS Y  
BIOTECNOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



***“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES  
A PARTIR DE ACEITE RESIDUAL DE COCINA POR UNA CEPA  
NATIVA AISLADA DE UN SUELO CONTAMINADO CON  
HIDROCARBUROS”***

***Tesis presentada por el Bachiller:***  
*Alpaca Acosta Bertín Eduardo*

***Para optar el título de***  
***INGENIERO BIOTECNÓLOGO***

***Asesor:***  
*José Villanueva Salas, PhD.*

**AREQUIPA- PERÚ**

**2016**

## DEDICATORIA

*A Dios, pues es quien me dio la dicha de vivir, me fortalece y me mantiene perseverante a pesar de los tropiezos que he tenido a lo largo de mi vida.*

*Y a mi familia, lo máspreciado que tengo en este mundo, pues son ellos los que siempre estarán allí para brindarme aliento y apoyo.*



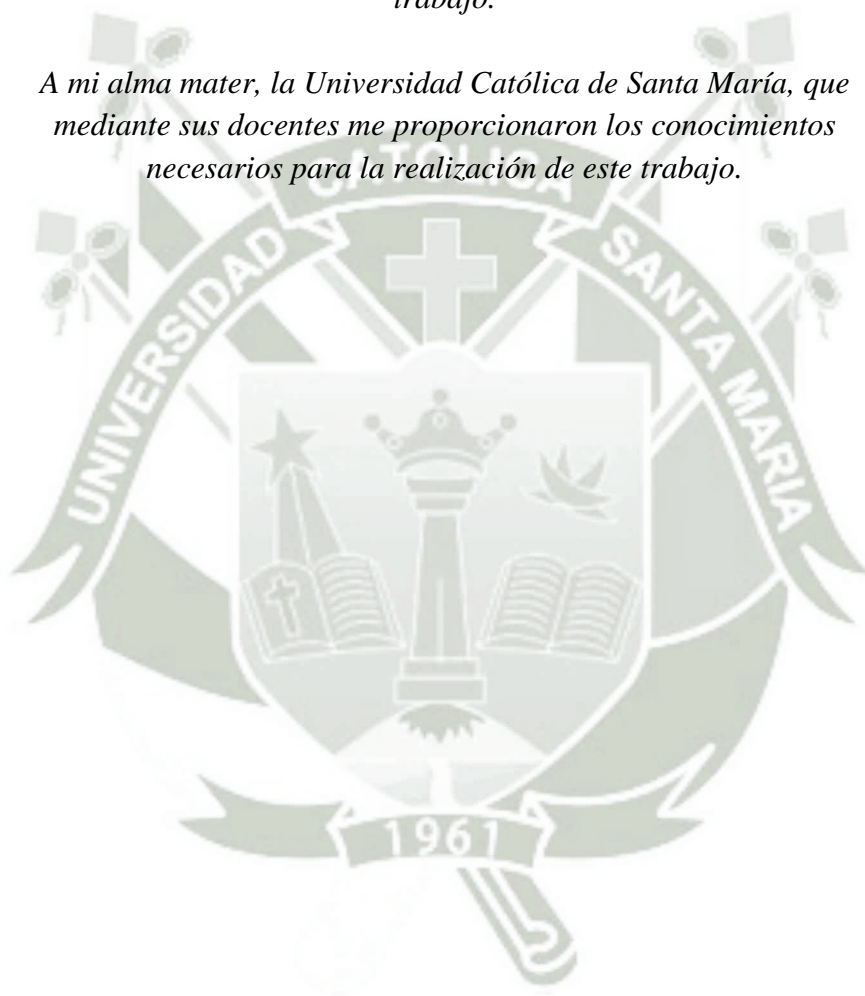
## AGRADECIMIENTOS

*A Dios de manera infinita por todo lo que tengo y por darme la oportunidad de cumplir con esta meta.*

*A mis padres y hermana quienes siempre estuvieron pendientes de mí y me apoyaron para que este trabajo se haga realidad.*

*A todas aquellas personas que de alguna manera a través de sus conocimientos contribuyeron para que yo pueda culminar este trabajo.*

*A mi alma mater, la Universidad Católica de Santa María, que mediante sus docentes me proporcionaron los conocimientos necesarios para la realización de este trabajo.*



## ÍNDICE

RESUMEN .....	10
ABSTRACT .....	12
INTRODUCCIÓN.....	14
OBJETIVOS .....	16
Objetivo general .....	16
Objetivos específicos.....	16
HIPÓTESIS .....	17
VARIABLES E INDICADORES .....	18
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO .....	19
1.1 BIOSURFACTANTES Y SUS PROPIEDADES .....	19
1.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS BIOSURFACTANTES.....	20
1.3 BIOSÍNTESIS Y MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE BIOSURFACTANTES.....	21
1.4 PAPEL FISIOLÓGICO DE LOS BIOSURFACTANTES .....	25
1.5 PRUEBAS DE DETECCIÓN DE PRODUCTORES DE BIOSURFACTANTES .....	26
1.5.1 Métodos basados en la actividad superficial .....	26
1.5.2 Métodos basados en la hidrofobicidad de la superficie celular.....	27
1.5.3 Métodos especiales.....	28
1.6 CLASIFICACIÓN DE LOS BIOSURFACTANTES .....	28
1.6.1 Glicolípidos .....	29
1.6.2 Lipopéptidos.....	30
1.6.3 Fosfolípidos y ácidos grasos .....	32
1.6.4 Biosurfactantes poliméricos .....	32
1.6.5 Biosurfactantes particulados .....	33
1.7 APLICACIONES DE LOS BIOSURFACTANTES .....	33
1.7.1 Aplicaciones ambientales.....	34
1.7.2 Aplicaciones industriales .....	34
1.7.3 Aplicaciones biomédicas.....	35
1.7.4 Aplicaciones agrícolas.....	35
1.8 PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES .....	35
1.9 RECUPERACIÓN DE BIOSURFACTANTES.....	39

1.10 ACEITE DE COCINA COMO FUENTE DE CARBONO .....	42
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS .....	44
2.1 LUGAR DE EJECUCIÓN .....	44
2.2 MATERIALES .....	44
2.2.1 Material biológico .....	44
2.2.2 Material inorgánico .....	44
2.2.3 Material de laboratorio .....	44
2.2.4 Reactivos e insumos .....	45
2.2.5 Equipos .....	46
2.2.6 Otros .....	47
2.3 MÉTODOS .....	47
2.3.1 Obtención de una muestra de suelo contaminado con hidrocarburos .....	47
2.3.2 Suspensión de la muestra de suelo .....	48
2.3.3 Realización de diluciones seriadas .....	48
2.3.4 Cultivo de bacterias del suelo .....	48
2.3.5 Aislamiento de la cepa nativa .....	49
2.3.6 Caracterización de la cepa aislada .....	49
2.3.6.1 Caracterización macroscópica .....	49
2.3.6.2 Caracterización microscópica .....	49
2.3.7 Identificación de la cepa aislada .....	50
2.3.7.1 Pruebas bioquímicas .....	50
2.3.7.2 Identificación Molecular .....	52
2.3.8 Pruebas de la producción de biosurfactante .....	53
2.3.8.1 Prueba de la dispersión del Aceite ( <i>Oil spreading assay</i> ) .....	55
2.3.8.2 Prueba del colapso de la gota ( <i>Drop collapse assay</i> ) .....	55
2.3.9 Evaluación de la cinética de crecimiento en la producción de biosurfactante .....	55
2.3.9.1 Elaboración de una curva de calibración .....	55
2.3.9.2 Determinación de las curvas de crecimiento y la velocidad específica de crecimiento .....	56
2.3.10 Producción del biosurfactante .....	57
2.3.11 Separación del biosurfactante .....	57
2.3.12 Recuperación del biosurfactante .....	58
2.3.13 Determinación del coeficiente de rendimiento $Y_{p/x}$ .....	58
2.3.14 Caracterización del biosurfactante .....	59

2.3.14.1 Determinación de la naturaleza del biosurfactante.....	59
2.3.14.2 Determinación del índice de emulsificación .....	60
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	61
3.1 AISLAMIENTO DE LA CEPA NATIVA .....	61
3.2 CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA AISLADA .....	64
3.2.1 Caracterización macroscópica.....	64
3.2.2 Caracterización microscópica .....	65
3.3 IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA AISLADA.....	66
3.3.1 Pruebas bioquímicas.....	66
3.3.2 Identificación molecular.....	70
3.4 PRUEBAS DE LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES.....	72
3.5 EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE.....	75
3.5.1 Elaboración de una curva de calibración.....	75
3.5.2 Determinación de las curvas de crecimiento y las velocidades específicas de crecimiento .....	78
3.6 PRODUCCIÓN DEL BIOSURFACTANTE .....	83
3.7 SEPARACIÓN DEL BIOSURFACTANTE .....	83
3.8 RECUPERACIÓN DEL BIOSURFACTANTE .....	84
3.9 DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO $Y_{p/x}$ .....	87
3.10 CARACTERIZACIÓN DEL BIOSURFACTANTE .....	87
3.10.1 Determinación de la naturaleza del biosurfactante .....	87
3.10.1 Determinación del índice de emulsificación .....	89
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES.....	91
RECOMENDACIONES .....	93
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	94
ANEXOS.....	100

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Representación de las diferentes formas que pueden adquirir las moléculas de biosurfactante al interactuar entre ellas .....	20
Figura N° 2: Representación de las cuatro diferentes formas en las que se puede dar la biosíntesis de los biosurfactantes propuestas por Syldatk y Wagner .....	24
Figura N° 3: Representación de la estructura química de los cinco tipos de biosurfactantes glicolípidos .....	29
Figura N° 4: Representación de la estructura química de dos de los principales biosurfactantes lipopeptídicos .....	31
Figura N° 5: Representación de la estructura química de un biosurfactante fosfolípido producido por <i>Acinetobacter sp</i> .....	32
Figura N° 6: Representación de la estructura química de un biosurfactante polimérico producido por <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> . .....	33
Figura N° 7: Esquema con la secuencia de etapas de la producción de biosurfactantes y los factores que la afectan.....	38
Figura N° 8: Placa Petri con crecimiento microbiano obtenido directamente de la suspensión.....	61
Figura N° 9: Placa Petri con crecimiento microbiano obtenido de la dilución $1 \times 10^{-1}$ ..	61
Figura N° 10: Placa Petri con crecimiento microbiano obtenido de la dilución $1 \times 10^{-2}$ . 62	
Figura N° 11: Placa Petri con crecimiento microbiano obtenido de la dilución $1 \times 10^{-3}$ . 62	
Figura N° 12: Placa Petri con crecimiento microbiano obtenido de la dilución $1 \times 10^{-4}$ . 62	
Figura N° 13: Células observadas bajo el microscopio con formas de bastón Gram positivas.....	63
Figura N° 14: Colonias de la cepa aislada, donde se puede observar sus principales características macroscópicas.....	64
Figura N° 15: Colonia de la cepa aislada en agar sangre con zona clara formada alrededor.....	65
Figura N° 16: Tinción de Gram realizada sobre un frotis de la cepa aislada. Se puede apreciar que la cepa es Gram positiva.....	65
Figura N° 17: Tinción de Wirtz-Conklin realizada sobre un frotis de la cepa aislada... 66	
Figura N° 18: Esquema para la identificación de la mayoría de las especies pertenecientes al género <i>Bacillus</i> basado en el Volumen III del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey.....	67
Figura N° 19: Secuencia de nucleótidos correspondientes al gen del rRNA 16S de la bacteria aislada.....	70

Figura N° 20: Parte del cromatograma de la secuencia de nucleótidos correspondientes al gen del rRNA 16S de la bacteria aislada generada por el programa BioEdit.....	71
Figura N° 21: Resultados del alineamiento del fragmento secuenciado del gen correspondiente al rRNA 16S de la cepa aislada con las secuencias almacenadas en el GenBank arrojados por BLAST. ....	71
Figura N° 22: Alineamiento múltiple del fragmento secuenciado del gen correspondiente al rRNA 16S de la cepa aislada con cinco secuencias de especies de <i>Bacillus</i> .....	72
Figura N° 23: Árbol filogenético elaborado por MEGA 7.0.14 con la secuencia del gen del rRNA 16S de la cepa aislada. ....	72
Figura N° 24: Recipiente de fermentación con el sistema de agitación acoplado a él... 73	
Figura N° 25: Características del medio finalizado el tiempo de fermentación.....	73
Figura N° 26: Resultados de la prueba preliminar del colapso de la gota.....	74
Figura N° 27: Resultado de la prueba preliminar de la dispersión del aceite.....	75
Figura N° 28: Vista de una célula de la cepa aislada bajo el microscopio durante el conteo celular en Cámara de Neubauer. ....	76
Figura N° 29: Curva de calibración y fórmula que relaciona la concentración celular con la densidad óptica.....	77
Figura N° 30: Curvas de calibración correspondientes a cada uno de los cuatro cultivos evaluados. ....	79
Figura N° 31: Resultados de la prueba del colapso de la gota sobre los cuatro cultivos ensayados.....	82
Figura N° 32: Vista lateral de la prueba del colapso de la gota de muestras provenientes de los cuatro cultivos evaluados. ....	82
Figura N° 33: Biosurfactante precipitado mediante la disminución de pH con ácido clorhídrico.....	84
Figura N° 34: Gráfica de intervalos de los valores de biosurfactante producido en los cuatro cultivos evaluados y la curva de tendencia que forman dichos intervalos. ....	86
Figura N° 34: Resultado de la prueba de fenol-ácido sulfúrico. ....	87
Figura N° 35: Resultado de la prueba de Biuret.....	88
Figura N° 36: Resultado de la prueba de determinación de fosfatos.. ....	89
Figura N° 37: Resultado de la determinación del índice de emulsión. ....	89

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Variables independiente y dependientes con sus respectivos indicadores ..	18
Tabla N°2: Lista de los diferentes tipos de biosurfactantes y de sus principales microorganismos productores.....	22
Tabla N° 3: Principales métodos de recuperación de biosurfactantes y algunos tipos de biosurfactantes que cada uno de ellos puede recuperar.....	40
Tabla N° 4: Composición del medio salino empleado en el presente trabajo .....	54
Tabla N° 5: Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a la cepa aislada.....	68
Tabla N° 6: Comparación de las principales características bioquímicas y del cultivo de cepas conocidas de <i>Bacillus licheniformis</i> con las de la cepa aislada. ....	69
Tabla N° 7: Resultados del conteo celular con la Cámara de Neubauer. ....	77
Tabla N° 8: Concentración celular determinada a partir de los resultados de la lectura de la Densidad Óptica de las muestras tomadas para la creación de las curvas de crecimiento .....	78
Tabla N° 9: Datos para determinar la velocidad específica de crecimiento promedio de los cuatro cultivos evaluados .....	80
Tabla N° 10: Condiciones volumétricas y físicas que permanecieron invariables durante la etapa de producción de biosurfactante.....	83
Tabla N° 11: Resultados de la recuperación de la cantidad de biosurfactante producida en los cuatro cultivos evaluados .....	85



## RESUMEN

Los microorganismos guardan en su genoma los códigos que dan origen a una serie de metabolitos de gran utilidad para el ser humano en amplios ámbitos de aplicación. Un claro ejemplo de ellos son los biosurfactantes cuyo potencial aplicativo es enorme, no solo en la industria sino también en el campo de la biorremediación; sin embargo, su uso se encuentra limitado al alto costo que demanda su producción debido en parte a la fuente de carbono. El presente trabajo de investigación buscó contribuir a la solución de ese problema, no solo planteando el uso de aceite residual de cocina como fuente de carbono barata, sino también haciendo una evaluación de su contribución en la producción de biosurfactante mediante su suplementación en un medio de cultivo definido.

Para ello, primeramente se procedió al aislamiento de una bacteria nativa a partir de un suelo contaminado con hidrocarburos de la ciudad de Arequipa. Dicha cepa fue identificada mediante distintas pruebas bioquímicas y la secuenciación del gen del rRNA 16s. Para verificar que la cepa aislada tiene la capacidad de producir biosurfactantes, ésta fue cultivada por 72 horas en un medio salino suplementado con aceite residual de cocina a 37°C en un recipiente de producción con un sistema de agitación diseñado especialmente para este trabajo. El crecimiento celular, el nuevo aspecto del medio de cultivo y las pruebas preliminares de verificación de la producción de biosurfactantes (prueba del colapso de la gota y prueba de la dispersión del aceite ) sobre el caldo de cultivo luego de separar la biomasa celular, permitieron determinar que la cepa aislada si era capaz de producir biosurfactante extracelular. Para evaluar la producción de biosurfactante, en el presente trabajo se optó por usar cuatro cultivos

suplementados cada uno con volúmenes de aceite equivalentes al 0.75%, 1%, 1.5% y 2.5% del volumen total del medio y cultivados bajo las condiciones indicadas anteriormente. Con estos cultivos no solo se evaluó si la velocidad específica de crecimiento propia de la cepa era afectada por la variación del aceite suplementado al medio sino también el propio caldo de cultivo a través de nuevas pruebas preliminares de verificación. Por otro lado, la cantidad de biosurfactante producida en cada uno de los cultivos se determinó a partir de nuevos cultivos en donde el caldo de cultivo sufrió una serie de procedimientos que incluían una precipitación ácida y una extracción con cloroformo-metanol hasta obtenerlo en seco. Finalmente, se procedió a caracterizar al biosurfactante producido sometiendo a una solución del mismo a una serie de pruebas bioquímicas.

Los resultados indicaron que la cepa aislada correspondía a una especie de *Bacillus* llamada *Bacillus licheniformis* y que, estadísticamente hablando, las velocidades de crecimiento de la misma en los cuatro cultivos evaluados no diferían unas de las otras. Por otro lado, las muestras del caldo de cultivo sometidas a las pruebas preliminares mostraron que el biosurfactante es un metabolito secundario al ser producido durante la fase estacionaria de crecimiento, además mostraba una alta actividad superficial a pesar de que se encontrara en bajas concentraciones pues una de las pruebas permitió anticipadamente saber que la cantidad de estas moléculas en el medio de cultivo era mínima, lo que coincidió con la cantidad de biosurfactante separada: 0.42 g/L con 0.75% de aceite, 0.36 g/L con 1% de aceite, 0.32 g/L con 1.5 % de aceite y 0.3g/L con 2.5% de aceite, los cuales están muy por debajo de lo que otros autores han logrado. Finalmente, se determinó que el biosurfactante producido era del tipo lipopeptídico capaz de crear emulsiones estables al menos durante 24 horas a concentraciones bajas, por lo que podría ser usada como un emulsionante efectivo.

**Palabras claves:** bacterias, biosurfactante, aceite residual de cocina

## ABSTRACT

Microorganisms stored in its genome codes that give rise to a set of useful metabolites for humans in broad application areas. Clear example of them are the biosurfactants whose potential application is enormous, not only in industry but also in the field of bioremediation; however, its use is limited because of the high cost of production due in part to the carbon source. This research sought to contribute to the solution of this problem, not only considering the use of waste cooking oil as a cheap carbon source, but also making an assessment of their contribution to the production of biosurfactant by its supplementation in a defined culture medium.

To do this, first it was made the isolation of an autochthonous bacterial strain belonging from soil contaminated with hydrocarbons from the city of Arequipa. That strain was identified by various biochemical tests and sequencing of 16s rRNA gene. To verify that the isolated strain has the capacity to produce biosurfactants, this was cultured for 72 hours in a saline medium supplemented with waste cooking oil at 37 °C into a production vessel with a stirring system specially designed for this work. Cell growth, the new look of the culture medium and preliminary screening methods for biosurfactants production (drop collapse assay and oil spreading assay) on the culture broth after separating cell biomass, allowed to determine that the isolated strain was able to produce extracellular biosurfactant. In order to evaluate the production of biosurfactant, in this study, four cultures were chosen, each one of them was supplemented with volumes of oil which are equivalent to 0.75%, 1%, 1.5% and 2.5% of the total volume of the culture medium and were cultured under the previously mentioned conditions. With these cultures not only it was evaluated if the specific growth rate of the strain was affected by the variation of the supplemented oil to the medium, but also the culture broth itself by new preliminary screening methods. On the other hand, the amount of produced biosurfactant in each one of the cultures was determined from new cultures where the culture broth was subjected to a set of processes that included an acid precipitation and extraction with chloroform-methanol until to obtain it dry. Finally, a characterization of the produced biosurfactant was made by subjecting a solution of it to a set of biochemical tests.

The results showed that the isolated strain corresponded to a *Bacillus* species named *Bacillus licheniformis*, and statistically speaking, the specific growth rates of the strain in the four cultures did not differ in each other. On the other hand, samples of the culture broth subjected to preliminary screening methods showed that the biosurfactant is a secondary metabolite because of it is produced during the stationary phase of growth, and showed a high surface activity even though it was in low concentrations as a test anticipated it to demonstrate that the amount of these molecules in the culture medium was minimal, which coincided with the amount of separate dry biosurfactant: 0.42 g/L with 0.75% of oil, 0.36 g/L with 1% of oil, 0.32 g/L with 1.5% of oil and 0.3

g/L with 2.5% of oil, which are below what others researchers have achieved. Finally, it was determined that the produced biosurfactant was a lipopeptide one and able to make stable emulsions for at least 24 hours at low concentrations, so it could be used as an effective emulsifier.

**Key words:** bacteria, biosurfactant, waste cooking oil



## INTRODUCCIÓN

Los biosurfactantes son moléculas anfífilas conformadas por dos regiones, la región hidrofílica o polar y la región hidrofóbica o no polar; estas moléculas poseen propiedades tensoactivas, emulsificantes y dispersantes importantes que da lugar a un descenso significativo de la tensión superficial del medio en el que se encuentren. Son producidos por varios microorganismos que han sido aislados a partir de muestras de sedimentos, suelos, aguas etc., la mayoría de los cuales se encontraron contaminados con compuestos hidrofóbicos. Dentro de estos microorganismos podemos destacar aquellos pertenecientes al género *Bacillus*, como el *Bacillus subtilis* y el *Bacillus licheniformis*, de quienes se dice producen un tipo de biosurfactante de alta versatilidad y con mucho futuro aplicativo. Estos microorganismos generalmente sintetizan los biosurfactantes cuando la fuente de carbono es parcialmente soluble o insoluble en agua, pues dichas moléculas con propiedades tensoactivas favorecen la biodegradación de los sustratos liposolubles.

El interés por los surfactantes microbianos ha estado en aumento en los últimos años debido a sus diversas características deseables tales como ser amigables con el medio ambiente, ser estables a elevadas temperaturas, a diferentes rangos de pH y a diferentes concentraciones de sales. Hay que añadir además que, los biosurfactantes son más versátiles en comparación a muchos surfactantes sintéticos y tienen la ventaja de poder producirse por fermentación

En la biotecnología ambiental, los biosurfactantes están ganando interés para aplicarlos en procesos de biorremediación de ambientes contaminados con compuestos orgánicos persistentes, debido a que, como ya se mencionó, incrementan su biodisponibilidad y biodegradabilidad. Cabe decir que desde el punto de vista biotecnológico, es importante para la producción de biosurfactantes no solo seleccionar una fuente de carbono adecuada sino también el microorganismo productor pues el tipo y cantidad de surfactante microbiano producido depende de estos factores y como la cantidad y fuente de nitrógeno, elementos traza, la temperatura adecuada, y la aireación.

Actualmente el uso de fuentes de carbono costosas, concentraciones de productos limitados, bajos rendimientos y la formación de mezclas de productos en lugar de los compuestos puros son factores que elevan los costos de producción de biosurfactantes, por lo que, la principal estrategia para lograr reducir estos costos es a través de la evaluación del sustrato apropiado para cada microorganismo y el uso de sustratos baratos o de residuos. Entre los sustratos renovables que se han utilizado para la producción de biosurfactantes destacan los aceites de origen vegetal los mismos que han servido como una fuente de carbono lipídica y que son en su mayoría derivados de ácidos grasos saturados o insaturados. Por otro lado, el uso de subproductos como

materia prima para este propósito se ha convertido en una alternativa actualmente para la producción de biosurfactantes. La implementación de aceite de cocina usado como materia prima para la generación de biosurfactantes es una de las posibilidades tecnológicas para este subproducto. Esta aplicación resolvería el problema ambiental de su disposición debido a los taponamientos que suelen ocasionar en tuberías y al incremento en la demanda bioquímica de oxígeno en los cuerpos de agua, ya que disminuiría los volúmenes de aceite usado producidos por restaurantes, cadenas hoteleras y a nivel doméstico.



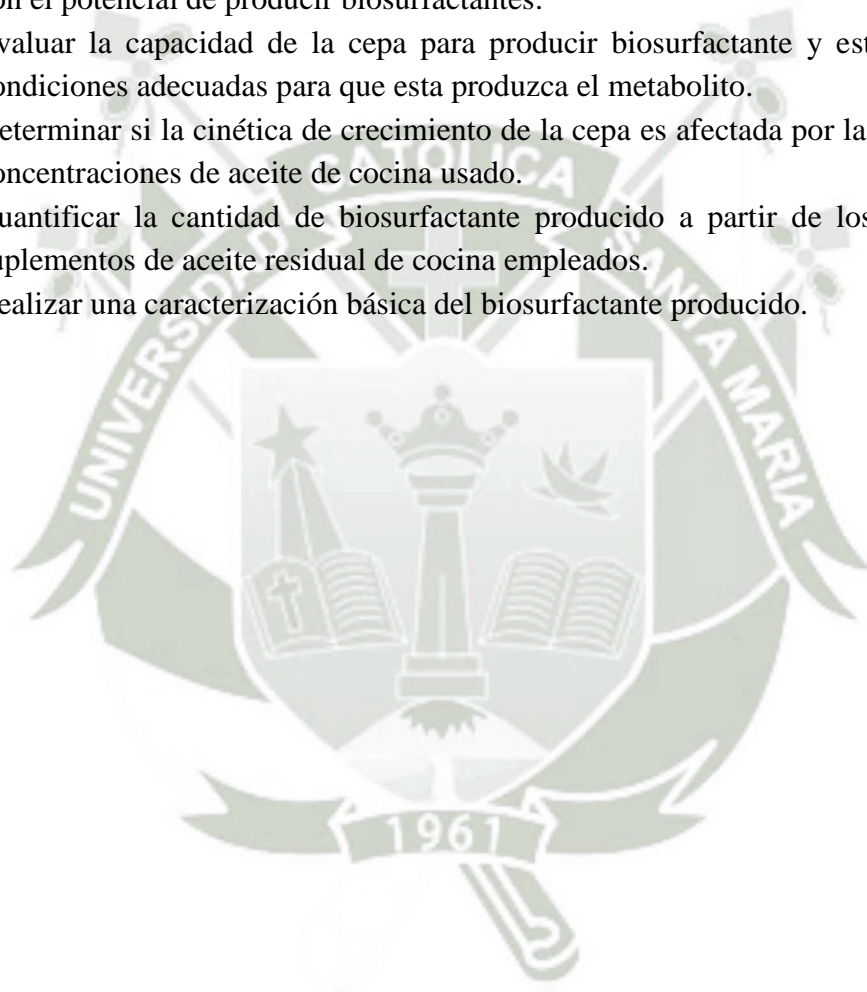
## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar la producción de biosurfactantes a partir de aceite residual de cocina por una cepa nativa aislada de un suelo contaminado con hidrocarburos.

### Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar una cepa nativa de un suelo contaminado con hidrocarburos con el potencial de producir biosurfactantes.
- Evaluar la capacidad de la cepa para producir biosurfactante y establecer las condiciones adecuadas para que esta produzca el metabolito.
- Determinar si la cinética de crecimiento de la cepa es afectada por las diferentes concentraciones de aceite de cocina usado.
- Cuantificar la cantidad de biosurfactante producido a partir de los diferentes suplementos de aceite residual de cocina empleados.
- Realizar una caracterización básica del biosurfactante producido.



## HIPÓTESIS

Dado que ciertas bacterias aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos son capaces de producir biosurfactantes para hacer más asequible el consumo de los compuestos alifáticos, es probable que una cepa nativa aislada de un suelo de ese tipo en la ciudad de Arequipa sea capaz de producir biosurfactantes bajo condiciones de laboratorio a partir de aceite residual de cocina.



## VARIABLES E INDICADORES

**Tabla N° 1:** Variables independiente y dependientes con sus respectivos indicadores

<b>VARIABLES INDEPENDIENTES</b>	<b>INDICADORES</b>
<b>Temperatura de cultivo y de procesamientos varios</b>	°C
<b>Velocidad angular de centrifugación y de agitación</b>	rpm
<b>pH de cultivo y separación de biosurfactante</b>	-
<b>Volúmenes varios</b>	mL, µL
<b>Pesos varios</b>	g, mg
<b>Longitud de onda electromagnética</b>	nm
<b>Altura de la emulsificación producida por el biosurfactante</b>	cm
<b>Diámetros las zonas claras de la prueba preliminar de la dispersión del aceite</b>	cm
<b>Tiempo</b>	hr, min,s
<b>Voltaje</b>	V
<b>VARIABLES DEPENDIENTES</b>	<b>INDICADORES</b>
<b>Velocidad específica de crecimiento</b>	s <sup>-1</sup>
<b>Densidad Óptica</b>	-
<b>Índice de Emulsificación del biosurfactante aislado</b>	%
<b>Concentración celular y de compuestos varios</b>	mg/L, N, % v/v,UFC/mL

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 BIOSURFACTANTES Y SUS PROPIEDADES

Los biosurfactantes son un grupo de moléculas anfifílicas con propiedades tensoactivas sintetizadas por microorganismos como hongos y bacterias, consideradas como productos metabólicos secundarios. El término no es aplicado a aquellos compuestos producidos por otros seres vivos con propiedades tensoactivas como las saponinas, sintetizadas por las plantas, y las sales biliares, producidas por los animales.<sup>1</sup> Son usualmente producidos en la fase exponencial o estacionaria del crecimiento microbiano cuando hay una alta densidad celular,<sup>1</sup> y para favorecer la biodegradación de aquellos compuestos fuente de carbono que son parcialmente solubles o insolubles en agua,<sup>2</sup> esto debido a la capacidad de reducir las tensiones superficial e interfacial de estos compuestos incrementando su solubilidad y área de contacto y por consiguiente su biodisponibilidad.<sup>3</sup>

La mayoría de los biosurfactantes están cargados negativamente o son neutrales y por lo general poseen pesos moleculares que van desde los 500 Da hasta los 1500 Da, aquellos de menor peso molecular, tales como los glicolípidos, son los más efectivos en reducir las tensiones superficial e interfacial mientras que aquellos de mayor peso molecular son considerados como efectivos estabilizadores de emulsiones como la del aceite en agua.<sup>4</sup>

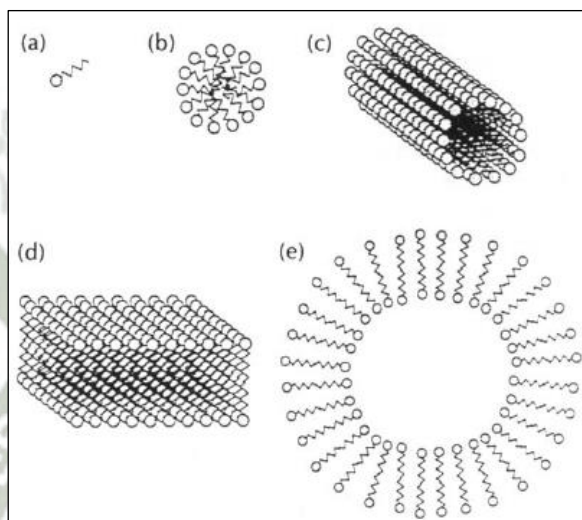
Muchos biosurfactantes y su actividad superficial no son afectados por condiciones ambientales tales como la temperatura, el pH, la presión, etc. Se han llegado a reportar biosurfactantes capaces de tolerar temperaturas superiores a los 50 °C, intervalos de pH de 5 a 11, concentraciones salinas de hasta 20% e incluso capaces de permanecer estables después de ser sometidos a las presiones y temperaturas de una autoclave.<sup>5</sup>

Debido a que son de origen natural, los biosurfactantes son moléculas no tóxicas y de fácil biodegradabilidad, varios estudios han demostrado que en comparación a sus contrapartes sintéticas, los biosurfactantes son inocuos para la vida y el medio ambiente llegando incluso a que algunos de ellos sean comercializados para diferentes propósitos.<sup>5</sup>

En cuanto a su estructura química, los biosurfactantes contienen una parte hidrofóbica y otra hidrofílica, los mismos que les confieren la habilidad de acumularse entre fluidos de diferentes polaridades para formar emulsiones.<sup>5</sup> La parte hidrofóbica está compuesta de ácidos grasos de cadena larga saturados o insaturados, mientras que la parte

hidrofílica puede ser un carbohidrato, aminoácido, un péptido cíclico, un fosfato, un ácido carboxílico o incluso un alcohol.<sup>3</sup> Algunos microorganismos en ciertos casos, producen biosurfactantes que son combinaciones de muchas estructuras químicas los cuales han sido llamados biosurfactantes poliméricos.

Finalmente, gracias a su naturaleza mixta, los biosurfactantes son capaces de formar micelas, micelas reversas o agregarse para formar micelas circulares, láminas y vesículas como se muestra en la Figura N°1.



**Figura N° 1:** Representación de las diferentes formas que pueden adquirir (a) las moléculas de biosurfactante al interactuar entre ellas: (b) micela circular, (c) micela en forma tubular, (d) lamina micelar, (e) vesícula.<sup>6</sup>

## 1.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS BIOSURFACTANTES

Cuando un biosurfactante es liberado al medio, sale a relucir una de las principales propiedades de este tipo de moléculas, la formación de micelas (Figura N°1b), es de este modo que el biosurfactante reduce la tensión superficial e interfacial entre el agua y un compuesto hidrofóbico, debido a la disminución de las fuerzas de repulsión entre los dos compuestos inmiscibles, de este modo se incrementa la exposición del compuesto hidrofóbico a la bacteria y al oxígeno favoreciéndose así su biodegradación.<sup>1</sup>

Para la formación de las micelas, los monómeros de biosurfactantes se organizan esféricamente, en una disposición donde la porción hidrofóbica se orienta hacia el centro, componiendo el núcleo de la micela, y la parte hidrofílica se orienta de manera que conforme la superficie esférica. Estos agregados son producidos como resultado de interacciones químicas débiles, tales como las fuerzas de Van der Waals y los puentes de hidrógeno.<sup>1</sup>

Según indican Souza et al.<sup>1</sup>, las modificaciones en la membrana plasmática, tales como cambios en la composición proteica o el incremento de la hidrofobicidad de la pared celular causada por la presencia de biosurfactantes, promueven una mayor accesibilidad del compuesto hidrófobo a las células, esto ocurre debido a la dispersión del compuesto hidrofóbico a través de su encapsulación en las micelas.

Por otro lado, la eficiencia de un biosurfactante está determinada por la concentración micelar crítica (CMC), propiedad conocida como la concentración a partir del cual las micelas se empiezan a formar. Un biosurfactante eficiente tiene una CMC baja, en otras palabras, una cantidad menor de biosurfactante es necesaria para disminuir la tensión superficial, mostrando una mejor efectividad y eficiencia que los surfactantes químicos<sup>1</sup>. Por lo tanto, es importante determinar y establecer la CMC de un biosurfactante para sus distintas aplicaciones pues esta CMC es un parámetro característico para cada biosurfactante.<sup>7</sup>

La reducción de la tensión superficial entre los compuestos inmiscibles, ocurre en concentraciones de biosurfactantes por debajo de la CMC, pues a valores inferiores a esta concentración, todo el biosurfactante presente en el medio se encuentra en forma de monómeros ubicados en la interfase.<sup>7</sup> El proceso de solubilización empieza en concentraciones por encima de la CMC debido a la formación de micelas que incrementan la solubilidad del compuesto hidrófobo.<sup>1</sup>

Finalmente, el proceso de emulsificación empieza cuando hay acumulación de biosurfactante que forma una solución que contiene diminutas gotas del compuesto hidrófobo suspendido en medio acuoso.<sup>1</sup>

### **1.3 BIOSÍNTESIS Y MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE BIOSURFACTANTES**

Un gran número de microorganismos, los cuales han sido aislados de lugares tan diversos como el suelo, el mar, sedimentos marinos, campos petrolíferos e incluso de ambientes extremos son capaces de producir biosurfactantes durante su crecimiento. Como se puede apreciar en la Tabla N°2, la mayoría de los biosurfactantes son sintetizados por bacterias como metabolitos extracelulares, intracelulares o anclados a las células.<sup>8</sup> Sin embargo, existen aun relativamente pocos estudios que establezcan la frecuencia y distribución de estos microorganismos en el medio ambiente, los cuales sugieren que solo una pequeña fracción de esta comunidad es capaz de producir biosurfactantes.<sup>9</sup> Según Siñeriz et al.<sup>8</sup>, esta fracción de microorganismos productores de biosurfactantes puede ser dividida en tres grupos con respecto al tipo de fuente de carbono que utilizan:

- Microorganismos que producen biosurfactantes durante su crecimiento exclusivo en compuestos insolubles en agua como especies de *Arthrobacter*, *Corynebacterium* y *Nocardia*.
- Microorganismos que producen biosurfactantes a partir de compuestos insolubles en agua o compuestos hidrosolubles. Un extraordinario número de microorganismos encajan en esta categoría como por ejemplo la *Pseudomonas aeruginosa* productora de ramnolipidos.
- Microorganismos que exclusivamente producen biosurfactantes durante su crecimiento en compuestos hidrosolubles como especies de *Rhodotorula*.

**Tabla N°2:** Lista de los diferentes tipos de biosurfactantes y de los principales microorganismos productores.

CLASE DE BIOSURFACTANTES	BIOSURFACTANTE	MICROORGANISMOS
Glicolípidos	Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		<i>Serratia rubidea</i>
	Trehalolípidos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
		<i>Corynebacterium spp.</i>
		<i>Mycobacterium spp.</i>
		<i>Nocardia erythropolis</i>
		<i>Arthrobacter paraffineus</i>
	Soforolípidos	<i>Torulopsis bombicola</i>
		<i>Torulopsis apícola</i>
		<i>Candida bombicola</i>
		<i>Candida lipolytica</i>
	Celobiolípidos	<i>Ustilago zaeae</i>
		<i>Ustilago maydis</i>
Lipopéptidos	Surfactina, Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
	Lichenisina	<i>Bacillus licheniformis</i>
	Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
	Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos grasos y fosfolípidos	Ácidos Grasos	<i>Corynebacterium lepus</i>
		<i>Nocardia erythropolis</i>
		<i>Arthrobacter paraffineus</i>
	Fosfolípidos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
		<i>Acinetobacter sp</i>
Biosurfactantes poliméricos	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
	Lipoproteínas de manano	<i>Candida tropicalis</i>
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biosurfactantes particulados	Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Células enteras	Varias bacterias

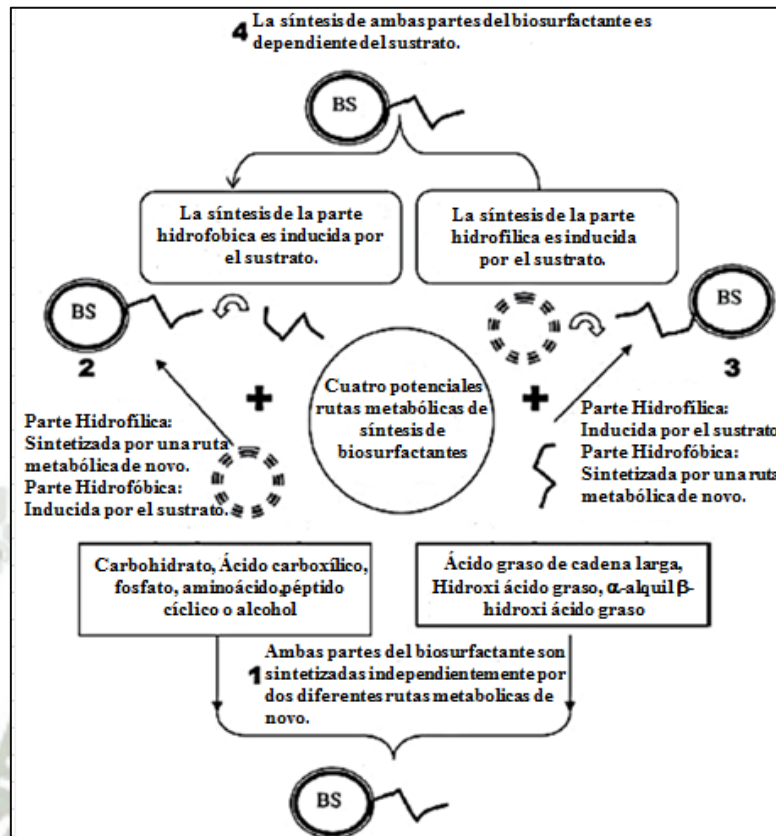
Dentro de estos microorganismos, algunas especies del género *Bacillus* son destacables debido a la fuerte actividad superficial y versatilidad que presentan los biosurfactantes que producen estas especies. Para reconocerlas es importante observarlas bajo el microscopio donde se presentan en forma individual o se agrupan en parejas siendo raro observarlas formando filamentos. Al ser sometidas a una tinción de Gram éstas son Gram positivas, siendo este procedimiento obligatorio para su identificación.<sup>10</sup> Otra característica importante que acompaña a estas bacterias es el hecho de que forman estructuras intracelulares altamente refringentes llamadas endosporas, las cuales se presentan en formas variadas dentro de la célula pudiendo ser esféricas, ovaladas o cilíndricas. Según indican Slepecky et al.<sup>11</sup>, las características que distinguen a las especies del género *Bacillus* de los demás miembros de la familia *Bacillaceae*, a la cual pertenecen, son su naturaleza aerobia, la cual puede ser estricta o facultativa, la forma abastionada bien definida que presentan y la producción de la enzima catalasa.

Las especies de este género son bien conocidas por producir una gran variedad de productos principalmente enzimas extracelulares, biopolímeros, y biosurfactantes de recursos renovables y ecoamigables. Los biosurfactantes de este género son de naturaleza lipopeptídica y se diferencian de los demás por su funcionalidad bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y salinidad por lo que poseen potencial para ser usados en la industria petrolera sin necesidad de una purificación muy elaborada ya que el mismo caldo de cultivo puede llegar a ser empleado.<sup>12</sup>

Por otro lado, aunque la genética y la biosíntesis de los biosurfactantes son complejas y no están bien caracterizadas, el enorme avance que ha tenido la ciencia en la actualidad ha permitido mejorar enormemente el entendimiento de los mecanismos de la síntesis de estos metabolitos. En relación a este punto, Satpute et al.<sup>13</sup> afirman que:

- Complejas y diversas rutas metabólicas así como enzimas específicas están envueltas en la síntesis de estos compuestos, la cual se lleva a cabo ya sea por una ruta de novo y/o una ruta ensamblada a partir del sustrato. Según Sylatk y Wagner<sup>14</sup> existen cuatro diferentes maneras por las cuales los biosurfactantes pueden ser sintetizados mediante estas dos formas, las cuales, son explicadas amplemente en la Figura N°2.
- La inducción y represión de la producción de biosurfactantes dependen de la presencia de carbono, nitrógeno, fosfato, elementos traza y cationes multivalentes. Leman<sup>15</sup> indica que estos mismos elementos influyen en la composición del biosurfactante; mas no en su localización final, la cual depende exclusivamente de la fuente de carbono y del tipo de microorganismo sintetizador.
- La biosíntesis es controlada por parámetros ambientales, es decir que, las condiciones de cultivo como el pH, temperatura, agitación, y nivel de oxígeno disuelto afectan la producción de biosurfactantes a través de sus efectos en el crecimiento y actividad celular.

- La maquinaria regulatoria es distinta para las diferentes bacterias productoras.
- Los microorganismos productores de biosurfactantes puede que alberguen plásmidos; no obstante los genes responsables de la síntesis están localizados en el ADN cromosomal.



**Figura N° 2:** Representación de las cuatro diferentes formas en las que se puede dar la biosíntesis de los biosurfactantes propuestas por Syldatk y Wagner.<sup>13</sup>

La elucidación de estos mecanismos biosintéticos es de vital importancia para el posterior diseño del medio de cultivo, la elección de las condiciones de crecimiento, así como para saber cuándo inducir el funcionamiento de las rutas metabólicas involucradas mediante la adición de moléculas precursoras. En la actualidad, algunos de los mecanismos biosintéticos bacterianos han sido parcial o completamente desenmarañados y son relativamente bien conocidos. He aquí algunos ejemplos:

- Las especies de *Acinetobacter* producen polímeros extracelulares como el emulsan o el biodispersan con propiedades tensoactivas, cuya biosíntesis está controlada por un complejo sistema operón y su posterior excreción mediada por enzimas.
- Un mecanismo de regulación por autoinducción juega un papel fundamental en la biosíntesis de los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas* y en la de la surfactina producida por *B. subtilis*. Dependiendo de la densidad celular, los

autoinductores, moléculas señales de vías regulatorias se encargan de la biosíntesis de los biosurfactantes.

- Se cree que la regulación de la síntesis de la serrawetina producida por especies de *Serratia*, se da a través de enzimas péptido sintetasa no ribosomales (NRPSs) y de N-acilhomoserina lactonas (AHLs) localizada en un transposon móvil y codificadas por autoinducción. Esta regulación está bajo control positivo y negativo de los productos del operón de autoinducción.
- En el caso de levaduras y hongos, la síntesis de los precursores del biosurfactante es catalizada por genes que codifican la enzima citocromo P450 monooxigenasa.

#### 1.4 PAPEL FISIOLÓGICO DE LOS BIOSURFACTANTES

El por qué algunos microorganismos producen biosurfactantes aún sigue siendo discutido, la respuesta más ampliamente aceptada ya ha sido mencionada antes al considerar que estos microorganismos los sintetizan para aumentar la biodisponibilidad de sustratos insolubles en agua mediante el incremento de su solubilidad y la extensión del área superficial entre el sustrato y el microorganismo generador, facilitándose así la transferencia de masa sobre la superficie de la célula para su crecimiento.<sup>16</sup> Sin embargo, gracias a estudios realizados en los últimos años se ha determinado que los biosurfactantes cumplen funciones destacadas a nivel fisiológico.

Se ha mencionado que pueden estar involucrados en la movilidad microbiana, ya que si el microorganismo productor se encuentra en la interfase, estos compuestos pueden reducir la tensión interfacial y favorecer el movimiento en la búsqueda de ambientes nuevos para el crecimiento, reproducción y colonización. Así también, se cree que la síntesis de biosurfactantes presentes en la parte externa de la membrana o en la pared celular puede contribuir a la unión y formación de biopelículas, al desprendimiento de los microorganismos productores de las superficies a las que están adheridas; así como a la inhibición de la unión de otros microorganismos a las interfaces donde se encuentran colonias productoras ya establecidas.<sup>16</sup>

Por otra parte, cuando los microorganismos productores son patógenos, estos compuestos cumplen la función de humectantes o agentes de dispersión sobre la superficie de las células huéspedes, principalmente estas funciones las cumplen biosurfactantes de tipo lipopéptido; un buen ejemplo de este tipo de moléculas es el producido por *Pseudomonas fluorescens*, un patógeno de las plantas, el cual reduce la tensión superficial en la epidermis de la planta acelerando la dispersión e infección bacteriana.<sup>16</sup>

Otro importante rol de los biosurfactantes es su actividad antimicrobiana, que le permite a la bacteria productora competir por su sobrevivencia y estabilidad en condiciones

biológicas y ambientales adversas; es bien sabido que la surfactina de *Bacillus subtilis* presenta actividad antimicrobiana, al solubilizar los principales componentes de las membranas celulares microbianas.<sup>7</sup> Así mismo, en algunas ocasiones estos compuestos son considerados como una fuente de energía y almacén extra de carbono extracelular ya que, por ejemplo, los biosurfactantes denominados soforolípidos son producidos por levaduras para ser empleadas como una opción para soportar altas presiones osmóticas existentes en cultivos con una elevada proporción de azúcares.<sup>16</sup>

## 1.5 PRUEBAS DE DETECCIÓN DE PRODUCTORES DE BIOSURFACTANTES

Buscar la manera de detectar cepas productoras de biosurfactantes es de mucha importancia, no solo debido a la posibilidad de descubrir nuevos tipos de biosurfactantes sino también a la probabilidad de encontrar una cepa nueva de interés comercial. Hasta la actualidad se han desarrollado una gran cantidad de pruebas que permiten detectar aquellos microorganismos capaces de producir biosurfactantes, los cuales han sido aplicados exitosamente en una gran variedad de trabajos. La mayoría de los mismos están basados en los efectos físicos que producen los biosurfactantes, es decir, la capacidad que poseen estos para reducir la tensión superficial. Por lo general son estos tipos de métodos los suficientes para corroborar que una cepa es productora de biosurfactantes.<sup>17</sup> A continuación se nombrarán aquellos métodos de mayor importancia:

### 1.5.1 Métodos basados en la actividad superficial

- **Medición directa de la tensión superficial:** Se realiza sobre el caldo de cultivo y es considerada la serie de métodos de detección más directo y a la vez apropiado para la detección preliminar de microorganismos productores de biosurfactantes. Cooper<sup>18</sup> considera que una cepa prometedora en la producción de biosurfactantes es aquel cuyo caldo reduce su tensión superficial a 40 mN/m o menos. Dentro de estos métodos destacan el método del anillo de Du-Nouy basado en la medición de la fuerza requerida para separar un anillo generalmente de aluminio de una superficie líquida, pues se considera que la fuerza de separación es proporcional a la tensión interfacial, es considerado un método preciso y de fácil uso; sin embargo, requiere de un equipamiento especializado como uno capaz de registrar los distintos valores de tensión alcanzados. Otro método dentro de este grupo es el estalagmométrico, el cual consiste esencialmente en una pipeta con una amplia punta aplanada, la cual permite la formación de gotas cuyo gran tamaño es reproducible en el tiempo y que finalmente caen por acción de la gravedad, es precisamente la cantidad de gotas que caen las que permiten determinar la tensión superficial mediante el uso de una fórmula específica. Finalmente, la técnica de la forma de la gota colgante, en el cual una gota del caldo de cultivo se deja colgar en el final de un capilar, la misma adopta una forma que está en función al radio del

tubo capilar, la tensión interfacial, la densidad y el campo gravitacional, las cuales son agrupadas en una fórmula que permite el cálculo de la tensión superficial.<sup>17</sup>

- Medición basada en la tensión superficial: Son un grupo de métodos que también trabajan con el caldo de cultivo y que a diferencia de los anteriores, no miden directamente la tensión superficial, son más rápidos y fáciles de ejecutar. Los más resaltantes dentro de este grupo se encuentran el método del colapso de la gota (*drop collapse assay*), el de la dispersión del aceite (*oil spreading assay*) y el de la microplaca. Con lo que respecta al método del colapso de la gota, desarrollada por Jain et al.<sup>19</sup>, este está basado en la desestabilización de una gota por la presencia de un biosurfactante y posee como ventaja que no requiere un equipamiento especializado y que solo necesita muy poca muestra; en este método las gotas del caldo de cultivo son colocadas en una superficie sólida de material hidrofóbico y si las gotas permanecen estables debido a que las moléculas polares del agua que las componen son repelidas de la superficie hidrofóbica significa que el caldo de cultivo no contiene biosurfactante, y si por el contrario las gotas colapsan, esto se deberá a que la tensión interfacial entre el líquido y la superficie hidrofóbica es reducida por la presencia de un biosurfactante; se dice que la estabilidad de las gotas depende de la concentración del biosurfactante. Por otro lado el método de la dispersión del aceite, desarrollado por Morikawa et al.<sup>20</sup>, es considerado un método confiable, que no necesita de un equipamiento especializado y que se realiza con poco volumen de muestra; el mismo consiste en la colocación de una gota de petróleo o cualquier otro derivado del mismo en la superficie de un volumen de agua destilada en una placa Petri, luego se añade una gota de caldo de cultivo en el centro de la delgada capa de hidrocarburo que se forma en la superficie; si hay presencia de biosurfactante el crudo es desplazado y se forma una zona clara, de la cual se dice el diámetro de ésta se correlaciona a la actividad superficial. Finalmente, el método de la microplaca, desarrollado y patentado por Vaux y Cottingham,<sup>21</sup> está basado en el cambio en la distorsión óptica causada por un biosurfactante en el caldo de cultivo. El agua pura en un pocillo de una microplaca con naturaleza hidrofóbica muestra una superficie plana, pero la presencia de un biosurfactante en esta o en el caldo de cultivo causa que esta superficie se vuelva cóncava y adquiera propiedades de un lente divergente. Es precisamente este efecto el que demuestra la presencia de algún biosurfactante en el caldo de cultivo por lo que para visualizarlo, los pocillos de la microplaca deben ser observados usando por debajo una hoja de papel con cuadrículas cuya imagen es distorsionada por la superficie cóncava producida por el biosurfactante.<sup>17</sup>

### 1.5.2 Métodos basados en la hidrofobicidad de la superficie celular

Los métodos basados en la hidrofobicidad de la superficie celular son considerados métodos indirectos para la detección de cepas productoras de biosurfactantes; sin embargo, permiten identificarlas más rápidamente. Una desventaja que presentan estos métodos es que la hidrofobicidad de una célula depende de manera significativa de

aspectos fisiológicos como las condiciones de crecimiento o la edad celular. Un ejemplo de este tipo de métodos es el ensayo de la adhesión bacteriana a hidrocarburos, un método fotométrico desarrollado por Rosenberg et al.<sup>22</sup> y el cual está basado en el grado de adherencia de la célula a varios hidrocarburos líquidos. Para este ensayo se hace uso de una suspensión acuosa de células bacterianas a la cual se le mide la turbidez y es mezclada luego con un volumen de hidrocarburo para posteriormente dejar separar las dos fases. Las células hidrofóbicas se unen a las gotas de hidrocarburo y suben con este a la parte superior. Las células son removidas de la fase acuosa y la turbidez de ésta es medida. La disminución en la turbidez de la fase acuosa se correlaciona con la hidrofobicidad de las células.<sup>17</sup>

### 1.5.3 Métodos especiales

- Agar CTAB: Este método es semicuantitativo para la detección de glicolípidos y otros biosurfactantes aniónicos. Fue desarrollado por Siegmund y Wagner<sup>23</sup>, y en él, el microorganismo de interés es cultivado en una placa Petri con agar que contiene sales minerales, el surfactante catiónico bromuro de cetiltrimetilamonio y el colorante azul de metileno. Si el surfactante es secretado por las bacterias cultivadas en la placa, estas estarán rodeadas de un halo de color azul oscuro. A pesar de ser un método confiable, este es solo específico para biosurfactantes aniónicos, inhibe el crecimiento de algunos microorganismos y su componente principal es tóxico.<sup>17</sup>
- Hemólisis: Está basado en el hecho de que los biosurfactantes pueden causar la lisis de eritrocitos, este principio es usado para este ensayo el cual es llevado a cabo mediante el uso de agar sangre. Las cepas que producen hemólisis causarán la lisis de las células de la sangre y exhibirán un halo descolorido alrededor de sus colonias. Es frecuentemente usado como una prueba preliminar para la detección de microorganismos capaces de producir biosurfactantes en un medio hidrofílico. Sin embargo, este método tiene algunas limitaciones como el no ser específico, pues enzimas líticas también pueden llevar a la aparición de halos alrededor de las colonias, además, ningún compuesto hidrofóbico puede ser incluido como la única fuente de carbono en este ensayo, finalmente puede haber restricciones para la difusión del biosurfactante y así inhibir la formación de las zonas claras alrededor de las colonias. Muchos autores consideran que es un método que puede dar muchos resultados falsos positivos y falsos negativo.<sup>17</sup>

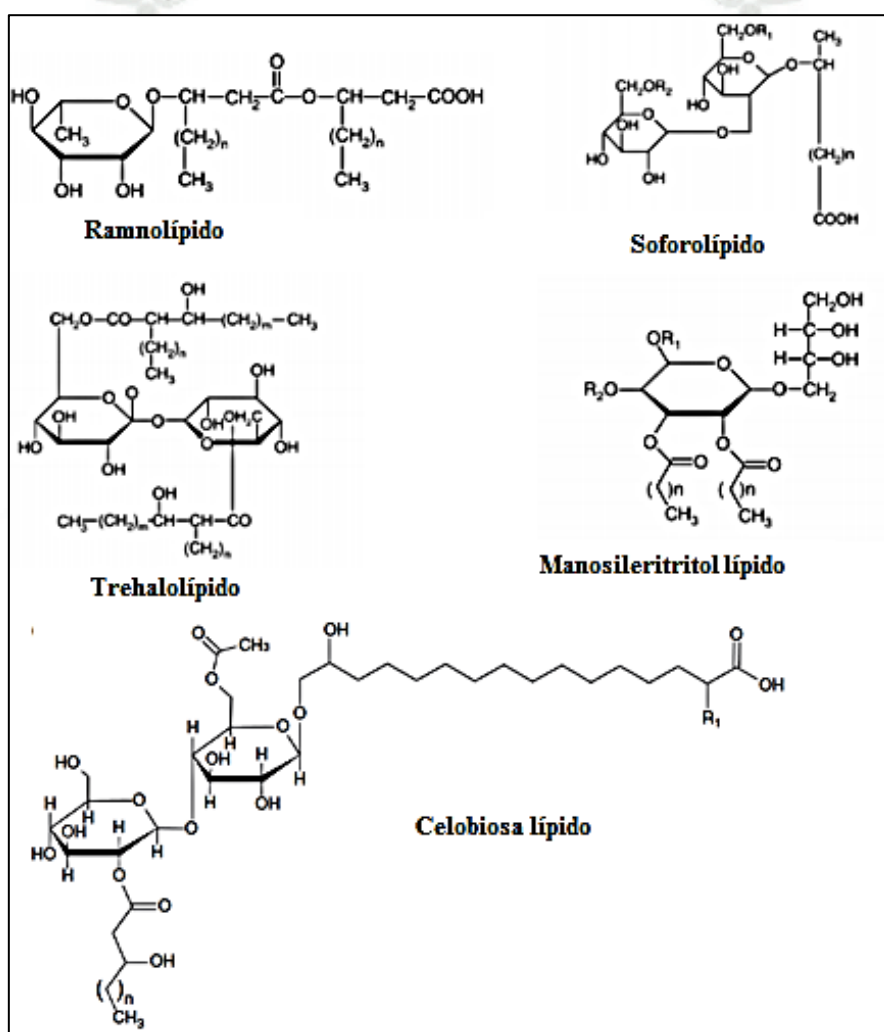
### 1.6 CLASIFICACIÓN DE LOS BIOSURFACTANTES

Como se puede apreciar en la Tabla N°2, la naturaleza química de los biosurfactantes depende mucho del tipo de especie que las sintetiza y aparentemente cada uno juega diferentes papeles en el ciclo de vida del microorganismo productor.<sup>24</sup> Gracias a que muchos de estos biosurfactantes han sido purificados, se conoce mucho más acerca de

sus estructuras químicas que han servido mucho para la clasificación de estas moléculas en base a la composición química del grupo polar.<sup>25</sup>

### 1.6.1 Glicolípidos

Son los biosurfactantes más comunes en el mundo microbiano y están compuestos por mono-, di-, tri- y tetrasacáridos que pueden estar acilados o unidos glicosídicamente a ácidos grasos de cadena larga.<sup>26</sup> Entre los glicolípidos más conocidos están los ramnolípidos, trehalolípidos, soforolípidos, celobiosa lípidos y manosileritritol lípidos, producidos por un amplio rango de géneros como *Torulopsis*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Candida*, *Shizonella*, etc., cuyas estructuras químicas de un ejemplar de cada uno de ellos pueden ser apreciadas en la Figura N°3.



**Figura N° 3:** Representación de la estructura química de los cinco tipos de biosurfactantes glicolípidos.<sup>2,29</sup>

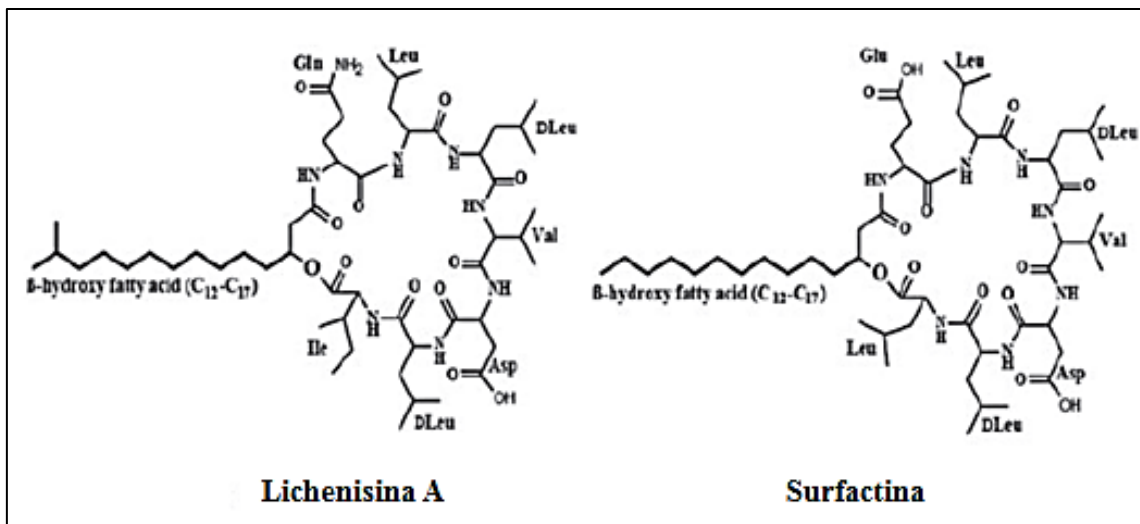
- Los ramnolípidos son producidos por varias especies de *Pseudomonas* y *Burkholderia*. Están constituidos por mono- y disacáridos de ramnosa ligados por un enlace glicosídico a una molécula de  $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato. Presentan interesantes propiedades superficiales, reduciendo la tensión superficial

del agua a valores cercanos a 30 mN/m. El tipo de ramnolípido producido depende la cepa bacteriana, fuente de carbono y condiciones de cultivo.<sup>25</sup>

- Los trehalolípidos poseen estructuras variadas y están ampliamente distribuidos en la comunidad microbiana. Están constituidos por el disacárido trehalosa unidos por el C-6 y C-6' a  $\beta$ -hidroxi ácidos grasos de cadena larga, llamados ácidos micólicos, y están asociados a la estructura de la pared celular de la mayoría de especies de los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Corynebacterium* entre otros.<sup>27</sup> Los trehalolípidos de estos diferentes microorganismos se diferencian en el tamaño y estructura de los ácidos micólicos, en el número de átomos de carbono y el grado de insaturación.<sup>28</sup>
- Los soforolípidos son producidos por ciertas cepas de levaduras como *Starmerella bombicola*, *Wickerhamiella domercqiae* y *Candida batistae*. Se caracterizan por tener como base al disacárido soforosa, el cual se encuentra ligado glicosídicamente al grupo 17-hidroxilo de una molécula de ácido esteárico o de ácido oleico. Dos características estructurales destacan en los soforolípidos, el grupo carboxilo está usualmente ligado a la segunda unidad de glucosa mediante el grupo 4'-hidroxilo para formar una lactona; por otra parte, los grupos 6-hidroxilo de cada unidad de glucosa pueden o no encontrarse acetilados.<sup>7</sup> Los soforolípidos tienen la capacidad de disminuir la tensión superficial del agua de 72.8 mN/m a 30 mN/m.<sup>28</sup> Sin embargo, y a pesar de esta característica, los soforolípidos no son buenos agentes emulcificantes.<sup>30</sup>
- Los manosileritritol lípidos consisten de un azúcar llamado manosileritritol unido a un ácido graso que puede ser un ácido hexanoico, dodecanoico, tetradecanoico o tetradecenoico. Aquel producido por *Candida sp.* SY 1626 disminuye la tensión superficial del agua a 29 dinas/cm.<sup>28</sup>
- Los celobiosa lípidos son producidos por varios hongos como el *Ustilago maydis* y la *Pseudozyma flocculosa*. Ellos están compuestos de celobiosa (4-O-b-D-glucopiranosil-D-glucopir-anosa) unida a un ácido palmítico hidroxilado. Los celobiosa lípidos de *Pseudozyma flocculosa* han sido usados como fungicidas biológicos. Por otra parte, cabe indicar que, *Ustilago maydis* produce celobiosa lípidos bajo condiciones limitantes de nitrógeno sino, por el contrario, producirá manosileritritol lípidos.<sup>29</sup>

### 1.6.2 Lipopéptidos

Este tipo de biosurfactantes están caracterizados por la presencia de un oligopéptido pequeño, lineal o circular acoplado a un  $\beta$ -hidroxiácido, el número y naturaleza de aminoácidos que componen la parte oligopeptídica de compuestos varían de un tipo a otro. Estas moléculas poseen actividad antibacteriana debido a su capacidad de solubilizar enzimas de la membrana celular. Dentro de los lipopéptidos más conocidos están:

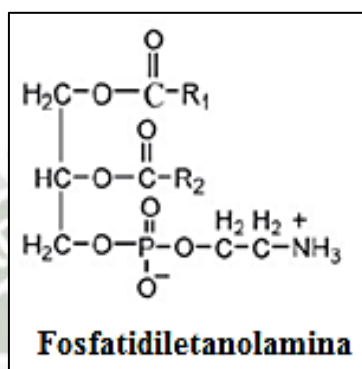


**Figura N° 4:** Representación de la estructura química de dos de los principales biosurfactantes lipopeptídicos.<sup>31</sup>

- La surfactina, mostrada en la Figura N°4 es producida por *Bacillus subtilis* y es reconocida como uno de los biosurfactantes con actividad superficial muy poderosa y que en concentraciones menores del 0.005% en peso reduce la tensión superficial del agua de 72 a 27.9 N/m.<sup>7</sup> La estructura de la surfactina consiste en un anillo de siete aminoácidos enlazados covalentemente por un extremo al grupo carboxílico y por el otro extremo al grupo hidroxilo de un  $\beta$ -hidroxi ácido.<sup>25</sup> Estudios recientes indican que la surfactina muestra grandes cualidades que; sin embargo, no han sido debidamente explotados hasta ahora, dentro de las que se puede destacar su actividad antiviral, antimicoplásmica, antitumoral, anticoagulante e inhibidora de enzimas.<sup>28</sup>
- Las iturinas son un grupo de varios lipopéptidos aislados de *Bacillus subtilis*, que deben su nombre al descubrimiento del primero de ellos, la iturina A, en Ituri, Zaire. Las otras iturinas como la iturina AL, micosubtilina, bacilomicina L, D, F y LC tienen un patrón común en su constitución química, todos ellos son lipopeptídicos cíclicos que contienen un  $\beta$ -amino ácido graso en su cadena lateral. Son compuestos considerados agentes antifúngicos poderosos por lo que han sido usados como biopesticidas.<sup>28</sup>
- La lichenisina, también mostrada en la Figura N°4 producida por *Bacillus licheniformis* exhibe una estructura y propiedades fisicoquímicas similares a las de la surfactina pues contiene un  $\beta$ -hidroxiácido graso de cadena larga. *Bacillus licheniformis* produce varios otros biosurfactantes que actúan sinérgicamente y exhiben una excelente estabilidad a diferentes rangos de temperatura, pH y concentración salina. También se ha indicado que la lichenisina es un quelante de cationes más eficiente que la surfactina.<sup>28</sup>

### 1.6.3 Fosfolípidos y ácidos grasos

Son producidos generalmente por bacterias y levaduras durante su crecimiento con n-alcenos. El *Thiobacillus thiooxidans* produce fosfolípidos cuyo rol principal es la solubilización del azufre elemental.<sup>27</sup> Por otro lado, *Acinetobacter sp.* produce vesículas ricas en un fosfolípido llamado fosfatidiletanolamina (Figura N°5), las cuales son capaces de producir una microemulsión de alcanos en agua, aquella fosfatidiletanolamina producida por *R. erythropolis* crecida en presencia de n-alceno es capaz de reducir la tensión interfacial entre el agua y el hexadecano a menos de 1mN/m.<sup>30</sup>



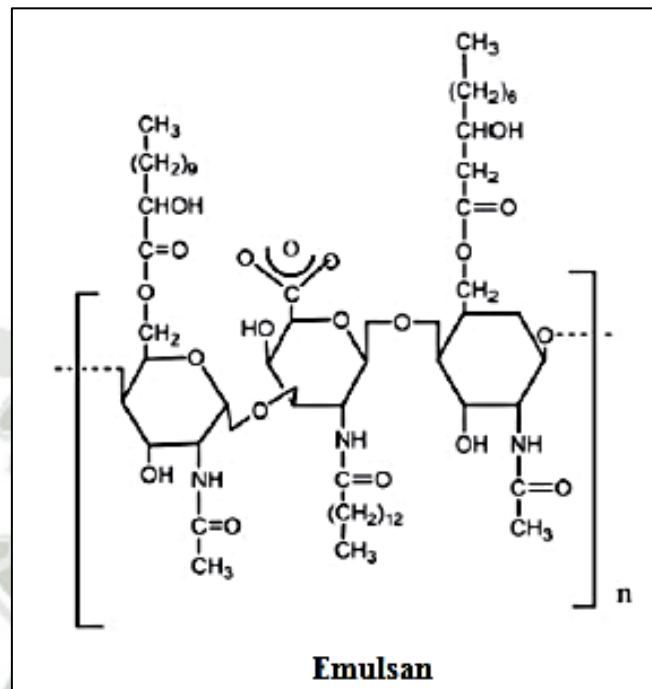
**Figura N° 5:** Representación de la estructura química de un biosurfactante fosfolípido producido por *Acinetobacter sp.*<sup>30</sup>

Por su parte, los ácidos grasos extracelulares producidos por microorganismos crecidos en alcanos también muestran actividad superficial. Estos ácidos grasos pueden ser saturados con 12 a 14 carbonos o complejos con ramificaciones alquilo que contienen grupos hidroxilos. Cepas como la *Arthrobacter* AK-19 y la *P. aeruginosa* 44T1 acumulan lípidos entre el 40% y 80% cuando son cultivados con hexadecano y aceite de oliva, respectivamente.<sup>27</sup>

### 1.6.4 Biosurfactantes poliméricos

Son biopolímeros de alto peso molecular que se caracterizan por presentar elasticidad y viscosidad altas. Los biosurfactantes poliméricos mejor estudiados son el emulsan, el biodispersan y el liposan. La cepa de *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 produce el emulsan (Figura N°6), un bioemulsificante polianiónico capaz de formar emulsiones de hidrocarburos en agua incluso a concentraciones tan bajas como al 0.001%. Por su parte, el biodispersan es un agente dispersante extracelular producido por *A. calcoaceticus* A2, es un heteropolisacárido que contiene cuatro azúcares reductores. Finalmente, el liposan es un emulsificante extracelular soluble en agua sintetizado por

*Candida lipolytica* y está compuesta en un 83% por carbohidratos como la glucosa, galactosa, galactosamina y ácido galacturónico y el restante 17% por proteína<sup>28</sup>.



**Figura N° 6:** Representación de la estructura química de un biosurfactante polimérico producido por *Acinetobacter calcoaceticus*.<sup>30</sup>

### 1.6.5 Biosurfactantes particulados

Las vesículas y células microbianas con actividad superficial son denominadas biosurfactantes particulados, los cuales forman una microemulsión que cumple un importante papel en el consumo de alcanos por parte de las células microbianas. Las vesículas producidas por *Acinetobacter sp.* HO1-N con un diámetro de 20 a 50 nm están compuestas por proteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos.<sup>30</sup>

Por otro lado, especies de cianobacterias y algunos microorganismos patógenos del género *Serratia* son los microorganismos con una elevada hidrofobicidad superficial.<sup>7</sup>

### 1.7 APLICACIONES DE LOS BIOSURFACTANTES

El creciente interés en las potenciales aplicaciones de los biosurfactantes se debe al hecho de que estas moléculas poseen un amplio rango de propiedades; por lo tanto, hay muchas áreas para su aplicación en el cual los surfactantes químicos podrían ser sustituidos por:

### 1.7.1 Aplicaciones ambientales

La contaminación ambiental causada por la actividad industrial mediante la liberación accidental o deliberada de compuestos orgánicos e inorgánicos al ambiente demanda la aplicación de compuestos como los biosurfactantes. Estas moléculas, en la remediación de compuestos orgánicos tales como hidrocarburos, pueden incrementar la biodisponibilidad de los contaminantes, su movilización o remoción por pseudosolubilización mediante un tratamiento de lavado. Por otro lado, la aplicación de estos metabolitos en la remediación de compuestos inorgánicos como metales pesados, se enfoca en la remoción de tales iones durante una etapa de lavado facilitado por la interacción química entre los iones anfifílicos y los iones metálicos.<sup>32</sup>

### 1.7.2 Aplicaciones industriales

Una aplicación importante de los biosurfactantes a nivel industrial se encuentra en el campo de la petroquímica y procesamiento del petróleo. Actualmente existen unas nuevas tecnologías definidas como recuperación mejorada de petróleo, dentro de las cuales, la recuperación microbiana (MEOR) se considera como aquella que tiene el potencial más rentable. Esta novedosa tecnología hace uso de biosurfactantes ya sea promoviendo su producción en bacterias autóctonas del yacimiento, añadiendo microorganismos alóctonos o adicionando al yacimiento directamente biosurfactantes producidos en biorreactores.<sup>32</sup>

En la industria alimentaria, es de valiosa utilidad la habilidad que tiene los biosurfactantes para formar emulsiones estables que mejoran la textura y cremosidad de los productos lácteos. Los biosurfactantes también son usados para retardar el enranciamiento, solubilizar aceites saborizantes, mejorar las propiedades organolépticas en formulaciones de panadería y helados y actuar como estabilizadores de grasas durante la cocción de estas últimas.<sup>32</sup>

Las propiedades humectantes, dispersantes, el poder de reducción de la tensión superficial así como la baja toxicidad y alta biodegradabilidad los que confieren a los biosurfactante, la posibilidad de ser usados en formulaciones de detergentes dentro de la industria de la limpieza. Los soforolípidos poco espumantes provenientes de *Candida bombicola* parecen ser los que más posibilidades tienen para ser utilizados en este rubro, debido a su capacidad de detergencia, baja citotoxicidad y alta biodegradabilidad.<sup>32</sup>

En la industria de los cosméticos, los biosurfactantes tienen varias aplicaciones debido a sus excepcionales propiedades como la capacidad de detergencia, humectación, emulsificación, solubilización y formación de espuma. Los biosurfactantes, en este caso, tienen la ventaja de ser menos irritantes, poseer mejores propiedades de hidratación y

ser compatibles con la piel en comparación con aquellos de origen sintético. Los biosurfactantes más ampliamente usados en este campo son los soforolípidos, ramnolípidos y manosileritritol lípidos.<sup>33</sup>

### 1.7.3 Aplicaciones biomédicas

El interés en el uso de biosurfactantes en el campo médico ha estado incrementándose en los últimos años, pues estos compuestos no solo son útiles como agentes antibacterianos, antifúngicos y antivirales, sino también pueden servir como moléculas inmunomoduladoras y tienen potencial para ser usadas en vacunas y en terapia génica. Estas moléculas también han sido usadas para la transfección de genes en células, como ligandos para unir inmunoglobulinas, como adyuvantes para antígenos y como inhibidores de la formación de coágulos de fibrina. Estos compuestos también tienen el potencial para ser usados como recubrimientos biológicos antiadherentes para biomateriales, y así reducir las infecciones hospitalarias y el uso de fármacos sintéticos. También podrían ser incorporados en preparaciones probióticas para combatir infecciones en el tracto gastrointestinal y urogenital.<sup>34</sup>

### 1.7.4 Aplicaciones agrícolas

En la agricultura, los biosurfactantes son usados para la hidrofiliación de suelos pesados con el fin de obtener buena humectabilidad, y también para lograr una distribución equitativa de fertilizantes en el suelo<sup>6</sup>. Los biosurfactantes también son usados para la eliminación de patógenos de las plantas, tal es el caso del biosurfactante lipopeptídico de *Bacillus subtilis*, el cual ha demostrado tener una actividad insecticida contra la mosca de la fruta.<sup>28</sup> También se ha comprobado que pueden incrementar la biodisponibilidad de nutrientes para beneficio de microbios asociados a plantas.<sup>35</sup> Algunos biosurfactantes son utilizados en la formulación de herbicidas como lo son los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas syringae*.<sup>7</sup>

## 1.8 PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES

La etapa de biosíntesis en el proceso de producción de un biosurfactante es una etapa crítica que representa grandes dificultades si se quiere rendimientos altos y de buena calidad, así como su viabilidad económica para la producción a gran escala. Para tener un proceso de producción de biosurfactantes económicamente competitivo, es recomendable que se den los siguientes factores: El uso de sustratos baratos o de desecho que disminuyan los costos del proceso, el desarrollo de bioprocesos eficientes que incluya la optimización de las condiciones de cultivo y procesos de separación rentables para la máxima producción y recuperación de biosurfactantes y, finalmente, el desarrollo y uso de cepas sobreproductoras, mutantes o recombinantes, para aumentar los rendimientos.<sup>7</sup>

En la última década se han centrado los esfuerzos en la mejora de la producción con el fin de facilitar el potencial uso comercial de los biosurfactantes mediante diversas estrategias. Actualmente la gran mayoría de los procesos de producción de biosurfactantes ha sido llevada a cabo como fermentaciones tradicionales donde el biosurfactante es liberado en el caldo durante la fase estacionaria o durante la fase exponencial en un biorreactor tipo tanque.<sup>36</sup> Beuker et al.<sup>38</sup> señalan que los procesos de fermentación usados para la producción de estos metabolitos incluyen tres tipos de cultivos ampliamente difundidos en la industria:

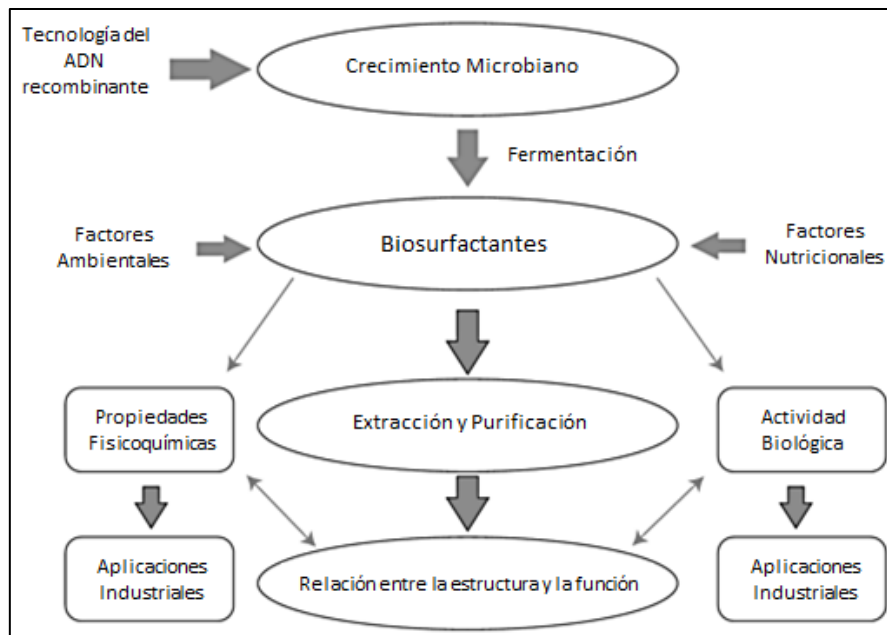
- Cultivo discontinuo o en batch, donde no se regula o altera la concentración de los nutrientes y la tasa de crecimiento microbiano durante el proceso de producción. Este tipo de cultivo ha sido empleado ampliamente en varios procesos de síntesis de biosurfactantes, un claro ejemplo de ello es su uso en la producción de ramnolípidos con *Pseudomonas aeruginosa*.
- Cultivo semicontinuo, donde la concentración del sustrato y la tasa de crecimiento microbiano pueden ser controladas mediante el suministro constante o semiconstante de los nutrientes, además, se caracteriza por la inexistencia de efluentes en el sistema. Este tipo de cultivo ha sido empleado para mejorar el rendimiento en la producción de biosurfactante obtenido en cultivos continuos, por lo que también es usado en la producción de ramnolípidos con *Pseudomonas aeruginosa*. Otro ejemplo característico de la utilización de este tipo de cultivo es la producción de soforolípidos de distintas fuentes alcanzándose los mayores rendimientos.
- Cultivo continuo, que como su nombre lo indica, está caracterizado por el suministro ininterrumpido o continuo de los nutrientes y el retiro constante del producto de interés, manteniéndose así inalterable el volumen del medio en el biorreactor. Este tipo de cultivo ha sido empleado en los procesos de producción de surfactina con *Bacillus subtilis* y ramnolípidos con *Pseudomonas aeruginosa*.

Dado los avances tecnológicos de nuestros días, otras estrategias de fermentación están siendo empleadas para la producción de biosurfactantes y están reemplazando a los procesos tradicionales de fermentación mencionados en líneas anteriores, tal es el caso de la utilización de la fermentación en dos fases acuosas, los biorreactores air-lift y fermentaciones en estado sólido como la inmovilización de células en alginato de calcio, todos ellos actualmente empleados en la producción de surfactina con *Bacillus subtilis*.<sup>36</sup>

Ahora bien, durante estos procesos de fermentación se han encontrado diferentes patrones de producción para cada una de las distintas especies de microorganismos productores, los cuales, como señalan Joshi y Desai<sup>36</sup>, pueden ser agrupados en los siguientes cuatro tipos:

- Producción asociada al crecimiento microbiano: Donde existe una relación entre la utilización del sustrato, el crecimiento y la producción de biosurfactante. En este patrón de producción la fuente de carbono juega un papel importante. Los biosurfactantes son producidos en la fase exponencial del crecimiento como se observa en el proceso de producción de ramnolípidos por algunas cepas de *Pseudomonas sp.*
- Producción bajo condiciones limitantes de crecimiento: Este patrón de producción se caracteriza por el fuerte incremento en la cantidad de biosurfactante producido a causa de la limitación de uno o más componentes del medio como el nitrógeno y/o algún elemento traza. Se observa este patrón en un gran número de cepas productoras pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Nocardia* entre otros.
- Producción por células inmovilizadas o en reposo: En este patrón de producción las células empleadas son recolectadas en un estado de producción del metabolito y son mantenidas en ese mismo estado durante todo el proceso, por lo que las células no se multiplican pero continúan utilizando la fuente de carbono para la síntesis del biosurfactante. Se ha reportado este patrón en la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas sp.*, soforolípidos por *Torulopsis bombicola* y manosileritritol lípidos por *Candida antártica*. La producción de biosurfactantes por células en reposo es importante desde el punto de vista de la recuperación del producto, el cual resulta ser una etapa menos costosa.
- Producción con suplementación de precursores: La adición de ciertos precursores, como compuestos lipofílicos, al medio de cultivo ayuda al incremento cualitativo y cuantitativo en la producción de biosurfactantes, tales son los casos observados en los procesos de producción de glicolípidos con *Torulopsis bombicola* y soforolípidos con *Torulopsis magnoliae*.

Si bien ya se ha mencionado que la síntesis de esta clase de metabolitos es llevada a cabo por una diversidad de microorganismos cuyo tipo afecta el rendimiento general, así como la estructura química del biosurfactante, existen otros factores cuya presencia o ausencia al momento de empezar el proceso de producción a través de las distintas estrategias de fermentación ya mencionadas, pueden influir de manera significativa en el proceso. Según indican Joshi y Desai<sup>36</sup> estos factores pueden ser agrupados en tres categorías: los constituyentes del medio, los factores ambientales y las condiciones de cultivo. El esquema presentado en la Figura N°7 muestra en qué etapa de la producción influyen estos factores.



**Figura N° 7:** Esquema con la secuencia de etapas de la producción de biosurfactantes y los factores que la afectan.<sup>37</sup>

Los constituyentes del medio son aquellos factores que podrían considerarse como los más importantes por su influencia significativa en la producción de biosurfactantes y son tan diversos que van desde la naturaleza de la fuente de carbono hasta la presencia de vitaminas, sin embargo, podemos señalar que los más importantes y ampliamente estudiados son los siguientes:

- La naturaleza de la fuente de carbono es un parámetro importante debido a que, como se observó en un punto anterior, tiene incidencia en la síntesis de los componentes lipófilico e hidrofílico del biosurfactante, sin embargo, esto no es del todo cierto pues se ha encontrado casos donde el crecimiento en hidrocarburos no es un prerequisite indispensable para iniciar la síntesis de biosurfactantes en algunos microorganismos.<sup>6</sup> Se ha demostrado también que cambiar el sustrato en el cultivo altera frecuentemente la estructura química así también como las propiedades del biosurfactante producido. Por lo tanto, la elección de la correcta fuente de carbono está determinada por la utilidad final que se dará al biosurfactante y es un aspecto importante a tomar en cuenta para su posible comercialización.
- La naturaleza de la fuente de nitrógeno, su concentración final en el cultivo y la relación existente entre esta y la fuente de carbono juega un papel preponderante en la síntesis de los biosurfactantes, especialmente en aquellos que son sintetizados en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano.<sup>6,14</sup> Claros ejemplos se encuentran en la producción de biosurfactante con *Pseudomonas aeruginosa* y *Nocardiosis sp.* B4, en el primero de los casos se demostró que el nitrato de sodio es más eficiente que el sulfato de amonio y urea en la producción de ramnolípidos,<sup>7</sup> mientras que en el segundo de ellos se encontró que un mayor rendimiento en la producción se obtenía haciendo uso de una fuente de nitrógeno de naturaleza orgánica.<sup>16</sup>

- Los elementos traza también juegan un papel crucial en la producción de biosurfactantes, pues la apropiada suplementación de elementos como el hierro, potasio, magnesio o calcio mejoran de manera substancial la cantidad producida de biosurfactante. Como ejemplo se tiene que para una alta producción de ramnolípidos con *Pseudomonas aeruginosa*, es indispensable una cierta concentración de hierro pues este tiene una influencia muy marcada como lo señala Khire<sup>24</sup> en su trabajo. Sin embargo, la presencia de estos elementos no necesariamente tiene que ser abundante pues se ha encontrado que concentraciones altas de algunos iones en el medio pueden inhibir la producción de biosurfactantes al afectar sus propiedades, como se observa en la producción de glicolípidos con *Torulopsis apícola*, donde altas concentraciones de NaCl inactivan su síntesis.<sup>7</sup>

Las condiciones de cultivo que incluyen a la temperatura, pH, agitación y disponibilidad de oxígeno, son de los otros factores que, como lo demuestran varios estudios, tienen un efecto significativo en la producción y características del biosurfactante. Como ejemplos, se pueden mencionar la importancia de la temperatura y el pH de incubación en la producción de biosurfactantes con *Pseudomonas putida*, donde la máxima producción de biosurfactantes es alcanzada a temperaturas entre 30 °C y 40 °C y pHs entre 6.4 y 7.2;<sup>7</sup> las condiciones semiaeróbicas que mejoran la producción de biosurfactantes con *Bacillus licheniformis*<sup>33</sup>; y además, la agitación en cultivos de *Nocardia amarae* con aceite de oliva como fuente de carbono; la cual favorece una mayor producción de biosurfactantes que los cultivos estáticos.<sup>7</sup>

## 1.9 RECUPERACIÓN DE BIOSURFACTANTES

El proceso de recuperación del biosurfactante del medio de cultivo es un paso muy importante del cual se dice abarca el 60% del costo de producción total. Esta etapa generalmente depende del uso final que se le da al biosurfactante, por ejemplo para la mayoría de las aplicaciones ambientales no se requiere que el biosurfactante sea de alta pureza; sin embargo, en la fabricación de productos alimenticios y cosméticos si es necesario biosurfactantes libres de impurezas. También se dice que un proceso de recuperación óptimo varía con el tipo de fermentación empleada, el medio de cultivo usado, las propiedades fisicoquímicas del biosurfactante, la localización final del biosurfactante (intracelular, extracelular o si está unido a la célula) entre otros factores.<sup>36</sup>

Esta etapa se caracteriza por hacer uso de las propiedades fisicoquímicas únicas presentes en todos los biosurfactantes y que los distingue de aquellas otras moléculas presentes en el medio de fermentación. Dentro de estas propiedades únicas se encuentra principalmente, su naturaleza anfifílica, que permite a estas moléculas colocarse en la interfase de dos compuestos inmiscibles, esta habilidad para comportarse como

moléculas hidrofóbicas o hidrofílicas o como una mezcla de ambas dio la posibilidad de utilizar ciertos métodos de purificación adecuados para cada tipo de biosurfactante.<sup>39</sup>

Los métodos de recuperación de biosurfactantes más comunes se muestran en la Tabla N° 3 y son explicados a continuación:

**Tabla N° 3:** Principales métodos de recuperación de biosurfactantes y algunos tipos de biosurfactantes que cada uno de ellos puede recuperar.<sup>24,36</sup>

MÉTODOS DE RECUPERACIÓN	BIOSURFACTANTE	FUENTE DE BIOSURFACTANTE
<b>Precipitación con sulfato de amonio</b>	emulsan	<i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
<b>Precipitación ácida</b>	lipopéptido	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus coagulans</i>
<b>Extracción con solventes</b>	soforolípidos, trehalosalípidos, liposan	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i>
<b>Ultrafiltración</b>	glicolípidos, lipopéptidos	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>Fraccionamiento en flujo con campo de flujo asimétrico (AsFIFFF)</b>	glicolípidos, lipopéptidos	<i>Pseudomonas sp.</i>
<b>Fraccionamiento por espuma</b>	lipopéptidos	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>Carbón activado</b>	glicolípidos, lipopéptidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>Cromatografía</b>	glicolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

- La precipitación ácida hace uso de ácido clorhídrico para bajar el pH hasta 2, esto ocasiona que el biosurfactante adquiera una carga positiva reduciéndose así la efectividad de la parte hidrofílica de la molécula que permite su precipitación como sólido. La precipitación con sulfato de amonio puede cumplir el mismo rol que el de la precipitación ácida convirtiendo la molécula de biosurfactante en una molécula de naturaleza exclusivamente hidrofóbica; sin embargo, y al igual que la precipitación ácida, puede conllevar a la precipitación de otras moléculas más pequeñas.<sup>39</sup>
- Extracción líquido-líquido, la cual puede ser realizada sobre el cultivo celular al cual se le agrega directamente un solvente orgánico o después de una precipitación ácida que permite la purificación completa del biosurfactante. Se puede hacer uso de una gran variedad de solventes tales como cloroformo, metanol, diclorometano, butanol, acetato de etilo, pentano, hexano, etc.<sup>39</sup>

- Filtración a través de una membrana, el cual evita la necesidad de hacer uso de reactivos químicos y minimiza problemas con la resuspensión debido a que el biosurfactante permanece disuelto. La ultrafiltración ha sido usada para una gran variedad de biosurfactantes mediante membranas disponibles comercialmente, sin embargo, no es apropiado su uso para todos los tipos de condiciones. Aunque la mayoría de los biosurfactantes son filtrados debido a su bajo peso molecular, las micelas pueden ser dejadas de lado por lo que es necesario que la ultrafiltración se lleve a cabo en concentraciones por debajo de la CMC. Por otro lado, la formación de micelas ha sido usada como una ventaja en un método que incluye dos procesos de ultrafiltración, la primera de las cuales usa una membrana especial que aísla las micelas del medio; posteriormente, estas son reducidas a sus moléculas componentes mediante la adición de metanol y una nueva membrana es utilizada para separarlas de los demás componentes del medio atrapados en las micelas.<sup>39</sup>
- Fraccionamiento en flujo con campo de flujo asimétrico, hace uso de un líquido inmiscible que reemplaza la membrana de la técnica anterior, es decir, hace uso de membranas líquidas como fase estacionaria. Si el flujo de las dos fases se controla cuidadosamente, la partición del biosurfactante, o su movimiento a través de una sola fase, puede proporcionar información valiosa sobre el peso molecular y la forma del compuesto estudiado. Un arreglo ligeramente más complejo de la membrana líquida ha sido descrito recientemente, en este caso una tercera fase es construida en la cual el medio acuoso de alimentación y el medio de salida que contiene el producto son separados por una membrana compuesta de un tercer líquido el cual no es soluble en las otras fases. La elección de los disolventes implicados en esta técnica es crucial para una extracción exitosa, también se encontraron que los valores de pH de las fases de alimentación y de salida son importantes.<sup>39</sup>
- Fraccionamiento por espuma, el cual requiere de la generación de espuma algo que es generalmente evitado a toda costa en bioprocesos. En el fraccionamiento por espuma las burbujas son formadas en la interfase aire-medio acuoso y luego son guiadas a un cilindro ubicado más arriba. Mientras las burbujas se mueve a través de la columna que la conecta con el cilindro, el medio drena hacia abajo gracias a la gravedad. A medida que la espuma sube, esta se vuelve más seca y concentra cada vez más el biosurfactante. El colapso de la espuma por medios mecánicos o químicos resulta en una solución que contiene unas 50 a 60 veces más biosurfactante que el medio original. Muchos parámetros influyen en la eficiencia del proceso e incluye la longitud de la columna, el diámetro de la columna, la tasa de flujo de aire, el tamaño de las burbujas formadas en la espuma, además de las propiedades fisicoquímicas del biosurfactante.<sup>39</sup>
- Enriquecimiento superficial, basado en el movimiento de las moléculas de actividad superficial a una interfase, la cual es colectada cuando todo el biosurfactante se encuentre en ella. Esta colección se hace mediante un dispositivo especial, con un área superficial aire/agua maximizado debido a que el crecimiento celular ocurre en una plataforma horizontal. La recolección del biosurfactante ocurre al final de este crecimiento y es un proceso repetitivo pues el recipiente en el cual se realiza el

cultivo es constantemente cambiado de una posición horizontal a una vertical por al menos 100 veces.<sup>39</sup>

- Adsorción a superficies sólidas basada en el hecho de que se ha encontrado que los biosurfactantes se unirán preferentemente a algunos compuestos sobre otros. Un ejemplo claro es el carbono activado, el cual ha sido usado para clarificar biosurfactantes extraídos mediante precipitación ácida o solventes orgánicos, incluso se ha encontrado que es adecuado para aislar directamente el biosurfactante del medio de fermentación. Otro ejemplo es el uso de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), la cual ha sido aplicada ampliamente en la purificación de biosurfactantes demostrando ser no solo una técnica de separación efectiva, sino también una herramienta sensitiva para el análisis de biosurfactantes. Sin embargo, la separación de estas moléculas de grandes volúmenes de cultivo mediante HPLC es un proceso que toma mucho tiempo es muy costoso.<sup>39</sup>

### 1.10 ACEITE DE COCINA COMO FUENTE DE CARBONO

Como se mencionó líneas atrás, la elección de la correcta fuente de carbono es muy importante si se quiere disminuir los costos de producción de biosurfactantes, ya que ésta, según se ha determinado, representa un alto porcentaje del costo de producción final.<sup>36</sup> Una de las mejores alternativas es la elección de materias primas residuales cuyo coste es barato y son de fácil adquisición.

Hasta ahora varios sustratos renovables de varias fuentes, especialmente residuos industriales, han sido extensamente estudiados para la producción de biosurfactantes a nivel de laboratorio. Una variedad de materias primas baratas y renovables, incluyendo aceites residuales, residuos ricos en almidón, agua residual de la industria de lácteos, residuos de destilería, molasas y residuos agroindustriales, todos ellos ricos en carbohidratos o lípidos, han sido considerados como potenciales sustratos para la producción de biosurfactantes<sup>36</sup> como lo demuestran algunos ejemplos: El suero producido en las industrias de los lácteos fue el sustrato más barato y viable para la producción de ramnolípidos con *Pseudomonas aeruginosa* BS2 y *Streptococcus thermophilus*. Similarmente, sustratos amiláceos como los provenientes de efluentes del procesamiento de papas han sido utilizados como sustratos para la producción de lipopéptidos con *Bacillus subtilis*. Varios residuos agrícolas como el salvado de cebada, brotes de maíz, viruta de madera de eucalipto fueron usadas como materia prima para la producción simultánea de biosurfactantes y ácido láctico con *Lactobacillus pentosus*.

Entre las materias primas baratas que ha llamado la atención en los últimos años se encuentra el aceite residual de cocina, considerada una fuente rica en nutrientes, proviene de un proceso de fritura de alimentos a alta temperatura (160-190°C) que contiene, además de glicéridos grasos y sal, cis- o trans- ácidos grasos junto con unos pocos productos originados de procesos de oxidación e hidrogenación.<sup>40</sup>

Actualmente, miles de galones de aceite de cocina son usados cada semana en los restaurantes de todo el mundo; por ejemplo, se ha estimado que en promedio 100 billones de litros por semana de aceite residual de cocina son producidos en los Estados Unidos<sup>41</sup>, en China, por su parte, cerca de 7 millones de toneladas de aceite residual son producidos al año.<sup>40</sup>

Esta cantidad de aceite se va incrementando y volviéndose un grave problema global en varios aspectos, como la seguridad alimentaria, pues actualmente este residuo está siendo empleado en la alimentación de algunos animales poniendo en riesgo la salud del ser humano debido a que aquellas sustancias tóxicas que componen el aceite residual pueden entrar a la cadena alimentaria y llegar al hombre. Lo peor es el problema ambiental que ocasiona, ya que una gran cantidad de aceite residual se vierte en las alcantarillas directamente sin el tratamiento adecuado, ocasionando atascos en las tuberías, incrementando la demanda bioquímica de oxígeno en los cuerpos de agua y afectando negativamente la etapa del tratamiento biológico de las aguas residuales. Por lo tanto, la disposición efectiva del aceite residual de cocina ha llegado a ser un urgente problema a solucionar. Teniendo en cuenta el énfasis actual que recae en la gestión y reciclaje de todo tipo de residuo, ha sido de gran interés el desarrollo de procesos prácticos para transformar el aceite residual de cocina en productos para el beneficio humano.<sup>40</sup>

Recientemente, la producción de biosurfactantes a partir de recursos renovables ha ganado gran popularidad por lo que la implementación de aceite residual de cocina como materia prima para su generación es una de las posibilidades tecnológicas para este subproducto. Esta aplicación resolvería el problema ambiental indicado ya que disminuiría los volúmenes de aceite usado producidos por restaurantes, cadenas hoteleras y a nivel doméstico.<sup>42</sup>

Actualmente hay pocos informes que reportan la utilización del enorme potencial de estos aceites para la producción de biosurfactantes. Por ejemplo, Shah et al.<sup>39</sup> estudiaron la producción de soforolípidos por *Candida bombicola* en cultivos batch y semicontínuo logrando obtener un rendimiento de 34 g/L usando aceite residual de restaurantes. Sadouk et al.<sup>43</sup> en un intento por reducir el costo de producción de soforolípidos con *Rhodococcus erythropolis*, cultivó esta bacteria en aceite de girasol residual. De Lima et al.<sup>44</sup> investigó la eficiencia y magnitud de la producción de biosurfactante con *Pseudomonas aeruginosa* usando diferentes tipos de aceite de soya residuales concluyendo que esta bacteria tiene el potencial para producir biosurfactantes a partir de aceite de soya a bajas tasas de aireación. Estos estudios enfatizan la potencial aplicación de los aceites residuales para la producción de biosurfactantes; sin embargo se han de requerir mayores esfuerzos para hacerlo realidad.

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

La parte experimental de la tesis fue realizada en los laboratorios H-402, H-403, H-301 y H-302 de la Universidad Católica de Santa María y en los laboratorios de la empresa ADN Uchumayo.

#### 2.2 MATERIALES

##### 2.2.1 Material biológico

- Aceite residual de cocina de origen vegetal.
- Aceite vegetal.

##### 2.2.2 Material inorgánico

- 10 g de tierra contaminada con hidrocarburos de una estación de servicios.
- Aceite usado de motor.

##### 2.2.3 Material de laboratorio

- Matraces de 50 mL, 250 mL y 1000 mL.
- Tubos de ensayo de 15x125 mm.
- Tubos de ensayo con tapa rosca de 13x100 mm.
- Beakers de 400 mL.
- Probeta de 50 mL.
- Pipetas de 1 mL y 5 mL.
- Placas Petri de 100x20 mm.
- Micropipetas de 50  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L.
- Puntas de micropipeta.
- Portaobjetos de 25.4x76.2 mm.
- Cubreobjetos de 18x18 mm.
- Baguetas.
- Picetas.
- Gradilla.
- Cámara de Neubauer. MARIENFELD
- Tubos Eppendorf de 200  $\mu$ L, 1.5  $\mu$ L y 2  $\mu$ L.
- Tubos Falcon de 15 mL.

- Peras de decantación de 100 mL.
- Viales.
- Asa de Kolle.
- Asa de Digraski.
- Soportes universales.
- Papel indicador de pH.
- Propipeta.

#### 2.2.4 Reactivos e Insumos

- Medio TSI.
- Medio SIM.
- Medio úrea.
- Medio citrato de Simmons.
- Caldo MRVP.
- Caldo nutritivo.
- Medio manitol salado.
- Medio agar sangre.
- Medio nutritivo.
- Medio Mueller-Hinton.
- Peróxido de hidrógeno.
- Cristal violeta.
- Solución alcohol-acetona.
- Lugol.
- Safranina.
- Verde de malaquita.
- Reactivo de Kovac.
- Indicador rojo de metilo al 0.04%.
- Solución de  $\alpha$ -naftol.
- Solución de hidróxido de potasio al 40% (KOH).
- Fenol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH).
- Solución de ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).
- Solución de ácido nítrico 6M (HNO<sub>3</sub>).
- Solución de cloruro de Sodio al 0,9% (NaCl).
- Reactivo de Biuret.
- Aceite de inmersión.
- Solución de ácido clorhídrico 0,6N (HCl).
- Molibdato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4 H<sub>2</sub>O).
- Fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).
- Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O).
- Sulfato de manganeso tetrahidratado (MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O).

- Sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).
- Fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).
- Sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ).
- Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ).
- Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ).
- Lactosa.
- Agarosa.
- Bromuro de etidio.
- Tween 80.
- Peptona.
- Cloroformo.
- Metanol.
- Marcador de peso molecular.
- MPC Protein Precipitation Reagent.
- Platinum PCR Supermix High Fidelity INVITROGEN.
- QIAquick PCR Purification QIAGEN.
- Solución de primers.
- Isopropanol.
- Buffer de lisis.
- Buffer TAE 1X.
- Buffer de carga.
- Agua destilada.
- Agua ultrapura.
- Hielo.

### 2.2.5 Equipos

- Microscopio CARL ZEISS Primo Star.
- Incubadora J.P SELECTA.
- Autoclave BD Eastern EA 650.
- Agitador shaker J.P SELECTA.
- Espectrofotómetro SPECTRUM SP 1105.
- Centrífuga GEMMY INDUSTRIAL PLC Series.
- Microcentrífuga KERT LAB.
- Rotavapor BÜCHI RII.
- Agitador vórtex SCIENTIFIC INDUSTRIES INC Vortex-Genie 2.
- Potenciómetro JENWAY 3510.
- Refrigeradora BOSCH.
- Cámara de flujo laminar ESCO LABCULTURE Class II.
- Balanza OHAUS Scout Pro.
- Balanza analítica OHAUS Pioneer.

- Cocinilla eléctrica MAGEFESA MGF 8022.
- Equipo de baño termostático VICKING Modelo Masson.
- Termociclador TECHNE CYCLOGENE.
- Transiluminador UV.
- Cámara electroforética.
- Fuente de poder.

### 2.2.6 Otros

- Motores de DVD.
- Paletas de plástico.
- Cables eléctricos.
- Pilas tamaño D.
- Frascos de vidrio con tapa.
- Pala pequeña.
- Contenedor estéril.
- Algodón.
- Alcohol medicinal.
- Gasa.
- Parafilm-M.
- Papel Kraft.
- Papel milimetrado.
- Pabilo.
- Lapicero.
- Cinta de Masking Tape.
- Guantes.
- Mechero.
- Ron de quemar.

## 2.3 MÉTODOS

### 2.3.1 Obtención de una muestra de suelo contaminado con hidrocarburos

Se recolectó aproximadamente 20 g de tierra de una zona que circunda la estación de servicios “San Pedro” ubicada cerca a la Urb. Piedra Santa en el distrito de Yanahuara de la ciudad de Arequipa. La tierra fue recolectada con la ayuda de una pala para trabajos de jardinería a una profundidad media de 5 cm desde la superficie y fue colocada en un contenedor estéril debidamente rotulado para su transporte al laboratorio.

### 2.3.2 Suspensión de la muestra de suelo

Se procedió a cernir la tierra haciendo uso de una malla de construcción con el fin de separar aquellas piedras u objetos grandes que alteran la homogeneidad de la tierra recolectada. Una vez homogénea la tierra, se seleccionó 10 g de la misma mediante su pesaje en una balanza, los cuales fueron colocados dentro de un matraz de 250 mL. Se suspendió la tierra en 90 mL de agua destilada esterilizada con el fin de suspender todos aquellos microorganismos presentes en este tipo de suelo contaminado. Se agitó la suspensión con la ayuda de una bagueta y se lo dejó reposar por aproximadamente 10 min, tiempo luego del cual se pudo observar por debajo de la fase líquida de interés tierra sedimentada.

### 2.3.3 Realización de diluciones seriadas

Para favorecer el aislamiento de una cepa del suelo se procedió a realizar una serie de diluciones en una batería de cuatro tubos de ensayo con un factor de dilución igual a 0.1, para ello, estos tubos fueron llenados previamente con 9 mL de agua destilada cada uno. Se empezó las diluciones seriadas mediante la toma de 1 mL de la fase líquida de la suspensión de tierra preparada en el método anterior, el cual se adicionó al primer tubo de la batería. Luego de asegurarse de homogenizar esta primera dilución mediante su leve agitación, se procedió a extraer de este primer tubo 1 mL de la dilución para su adición al segundo tubo de la batería. Las diluciones seriadas se finalizaron siguiendo el mismo procedimiento señalado en líneas anteriores para los otros dos tubos de la batería, de esta manera, la concentración final obtenida en el último tubo de ensayo fue de  $1 \times 10^{-4}$ .

### 2.3.4 Cultivo de bacterias del suelo

Se hizo uso del método de siembra en superficie con el asa de Drigalski, para ello, de las diluciones anteriormente preparadas, se tomó 100  $\mu$ L de cada una, los cuales sirvieron como inóculos que fueron añadidos a una cantidad idéntica de placas Petri previamente preparadas con agar nutritivo, ideal para el aislamiento de microorganismos poco exigentes en cuanto a los nutrientes. Una vez esterilizada el asa de Drigalski con alcohol y fuego, se hizo extensión de estos inóculos sobre toda la superficie del medio asegurándose siempre las condiciones de esterilidad. Se realizó también la toma de 100  $\mu$ L directamente de la suspensión y se sembró en otra placa Petri con el fin de asegurar la obtención de cepas bacterianas en caso estas sean muy escasas en la tierra. Las cinco placas Petri inoculadas fueron colocadas por 24 horas a 37°C dentro de una incubadora para propiciar el crecimiento microbiano.

### **2.3.5 Aislamiento de la cepa nativa**

Transcurridas las 24 horas de incubación, se observaron las placas Petri en busca de colonias aisladas. Ubicadas dichas colonias, se obtuvo una muestra de algunas de ellas con un asa de Kolle y fueron fijadas al calor en portaobjetos para ser sometidas a la tinción de Gram, esto con el fin de identificar bacterias a través de su morfología. Para este propósito, cada uno de los frotis fijados fueron empapados con abundante cristal violeta, transcurrido un minuto se procedió al enjuague de estos con agua destilada, a continuación, se añadió lugol como mordiente y se lo dejó actuar sobre lo frotis por un minuto, luego se procedió nuevamente al enjuague de los frotis para enseguida añadirles una solución de alcohol acetona, después de un minuto y luego de una nueva enjuagada, se añadió el colorante safranina como contraste, al cual también se dejó actuar por el lapso de un minuto, finalmente y luego de una nueva enjuagada, se secaron los frotis mediante su flameado en fuego. Con la ayuda de un microscopio se observaron cada uno de los frotis identificándose las características morfológicas de las células que forman cada una de las colonias seleccionadas. En base estas observaciones, se seleccionó una y se sembró una asada de esta en una nueva placa Petri con agar nutritivo mediante el método de siembra por estrías y se la incubó a 37 °C por 24 horas. A partir de una colonia obtenida en la placa, se realizó un repique que asegurara el correcto aislamiento de la cepa en una nueva placa con agar nutritivo.

### **2.3.6 Caracterización de la cepa aislada**

De las colonias obtenidas en el repique, se procedió a realizar dos tipos de caracterizaciones:

#### ***2.3.6.1 Caracterización macroscópica***

La cual consistió en la observación del tamaño, la forma, el aspecto y otras características de las colonias crecidas en agar nutritivo. A partir de una de estas colonias, se sembró por el método de siembra por estría una asada en una placa Petri con agar Sangre previamente preparada, las colonias crecidas después de 24 horas en esta placa también fueron sometidas a la observación de las características morfológicas de las colonias, pero principalmente se intentó observar la presencia o ausencia de hemólisis.

#### ***2.3.6.2 Caracterización microscópica***

Se procedió a realizar nuevamente una tinción de Gram de la cepa ya totalmente aislada para comprobar que la misma fue aislada correctamente y poseía las características observadas originalmente en la placa Petri proveniente de la dilución seriada. Por otro lado, para saber de la capacidad de la cepa aislada para producir

esporas se hizo uso de la tinción de Wirtz-Conklin, para ello se fijó al calor un frotis sobre un portaobjetos, a este se le añadió abundante cantidad del colorante verde de malaquita, a continuación se procedió a calentar el frotis en un mechero hasta la emisión de vapores, se evitó en todo momento que el frotis quede seco por lo que constantemente se iba añadiendo colorante; luego de aproximadamente seis minutos, el frotis fue enjuagado con agua destilada y se le empapó con el colorante safranina por un minuto, acto seguido se enjuagó el frotis y se lo secó mediante su flameado al fuego. Finalmente se observó el frotis en el microscopio con el objetivo 100X.

### 2.3.7 Identificación de la cepa aislada

También de las colonias obtenidas en el repique, se procedió a realizar la identificación de la cepa a través de pruebas bioquímicas y a partir de técnicas moleculares:

#### 2.3.7.1 Pruebas bioquímicas

Se eligieron una serie de pruebas bioquímicas que permitieron confirmar el aislamiento de una cepa del género *Bacillus* y el descarte de otros, esto debido que los anteriores métodos pusieron en la mesa posibilidad de que la cepa aislada perteneciera al género mencionado. Además, otras pruebas bioquímicas fueron seleccionadas para diferenciar las distintas especies del género *Bacillus*, muchas de ellas en base a un esquema elaborado a partir del Volumen III del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey publicado en el 2009, siendo una importante fuente de taxonomía bacteriana basada en el fenotipo.

Dichas pruebas bioquímicas que a continuación se nombrarán, se realizaron por duplicado para resultados confiables a partir de colonias bacterianas relativamente frescas obtenidas de un nuevo repique en una placa Petri con agar nutritivo:

- Ensayo de la catalasa: Se llevó a cabo en un portaobjetos, donde previamente se realizó un frotis simple partiendo de una colonia bacteriana con la ayuda de un asa de siembra en punta. A continuación, se agregó 2 gotas de peróxido de hidrógeno sobre el frotis y se observó la aparición sostenida de burbujas sobre el frotis.
- Hidrólisis del almidón: Se llevó a cabo en placas Petri haciendo uso del medio Mueller-Hinton, en cuya composición se encuentra el almidón como única fuente de carbono. En estas placas se sembró una asada solo por el centro, luego fueron incubadas por 48 horas a 37 °C. Transcurrido dicho tiempo, se procedió a añadir lugol sobre toda la superficie del medio de cultivo, este colorante sirvió como indicador de la hidrólisis o no del almidón.
- Ensayos de rojo de metilo y Voges-Proskauer: Se llevaron a cabo en cuatro tubos de ensayo con 3 mL del medio líquido MRVP, los cuales fueron sembrados con una asada del cultivo en agar nutritivo de manera directa con un asa de Kolle e

incubados a 37 °C por 96 horas. Luego de ese lapso de tiempo, a dos de los tubos se la adicionaron 3 gotas del indicador rojo de metilo al 0.04% y se observó el color del medio luego de una buena mezcla. A los otros dos tubos se les hizo la prueba de Voges–Proskauer, de suma importancia para la identificación de la cepa, para ello se les añadieron 0.72 mL de una solución de  $\alpha$ -naftol al 5% en alcohol etílico absoluto y luego 0.24 mL de KOH al 40% a cada uno. Los tubos fueron agitados vigorosamente, y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante al menos 10 minutos. Finalmente se observó el color que tomó el caldo.

- Producción de H<sub>2</sub>S, indol y movilidad: Se llevó a cabo en tubos de ensayo con 3 mL del agar semisólido SIM, el cual fue utilizado principalmente para determinar la movilidad de la cepa. Estos tubos se sembraron mediante el método de siembra por picadura, el cual consistió en introducir un asa de siembra en punta hasta el fondo del medio de cultivo y en posición central. Los tubos fueron incubados por 24 horas a 37 °C. Se aprovechó el medio para evaluar otras características como la producción de H<sub>2</sub>S y la presencia de indol mediante la adición al cultivo de cinco gotas del reactivo de Kovac.
- Utilización del Citrato: Se llevó a cabo en tubos de ensayo con 3 mL del agar Citrato de Simons, cuya particularidad es la disposición inclinada del mismo dentro del tubo. Se sembraron los tubos con una asada del cultivo en agar nutritivo mediante el método de siembra por picadura y estría, el cual consistió en la realización de forma correlativa de estos dos métodos explicados anteriormente. Los tubos fueron incubados por 48 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo indicado, se procedió a la observación del color del medio de cultivo, relacionado al consumo o no del citrato.
- Crecimiento en altas concentraciones de sal (NaCl) e hidrólisis del manitol: Se llevó a cabo en placas Petri haciendo uso del medio manitol salado, caracterizado por contener cloruro de sodio en un 7,5% de concentración. En estas placas se sembró también una asada haciendo uso del método por estría, luego las placas inoculadas fueron incubadas por 24 horas a 37 °C. Transcurrido dicho lapso de tiempo, se procedió a observar principalmente el crecimiento o no de colonias sobre la superficie del medio y el color de este último alrededor de las colonias.
- Crecimiento a 55 °C: Se llevó a cabo en placas Petri con agar nutritivo, las cuales se sembraron mediante el método de siembra por estría. Estas placas fueron incubadas por 24 horas en una incubadora especialmente programada a 55 °C para esta prueba. Transcurrido dicho lapso de tiempo, se observó la presencia o ausencia de colonias sobre la superficie del medio.
- Fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa: Se llevó a cabo en tubos de ensayo con 3 mL del medio TSI, cuya particularidad es la disposición semi-inclinada del mismo dentro de los tubos, posición conocida como pico de flauta. Estos tubos fueron sembrados con una asada del cultivo en agar nutritivo mediante el método de siembra por picadura y estría. Los tubos fueron incubados por 18 horas a 37 °C. Finalmente y luego de transcurrido el tiempo indicado, se procedió a la observación de los diferentes tonos de color que el medio de cultivo adquirió, el patrón de colores observado está relacionado a la fermentación de cualquiera de los tres

azúcares que componen el medio. Como características adicionales se tomó en cuenta la observación de la presencia o ausencia de un precipitado negro en el fondo del tubo, indicativo de la formación de  $H_2S$ , y de grietas por todo el medio, indicativo de la formación de  $CO_2$ .

- Hidrólisis de la urea: También se llevó a cabo en tubos de ensayo con 3 mL del medio urea en posición semi-inclinada. Estos tubos fueron sembrados mediante el método de siembra por estría sobre toda la superficie inclinada. Luego, los tubos fueron incubados por 48 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo indicado, se observó el cambio de color del medio de cultivo.

### 2.3.7.2 Identificación Molecular

Este procedimiento se llevó a cabo en los laboratorios de la empresa ADN Uchumayo, a donde una placa con la cepa aislada fue enviada. Lo que se realizó allí a *grosso modo* fue, en primera instancia, aislar el ADN de una asada obtenida de dicha placa, esta muestra celular fue colocada en un tubo eppendorf y disuelto en buffer de lisis para romper las células, luego se le añadió MPC Protein Precipitation Reagent con el cual fue mezclado, esta mezcla fue luego centrifugada para separar los restos celulares en forma de pellet. El sobrenadante resultante fue recolectado y colocado en un nuevo tubo eppendorf al cual se le añadió isopropanol con el cual se lo mezcló invirtiendo el tubo varias veces. Posteriormente se llevó a cabo una nueva centrifugación a máxima velocidad y a bajas temperaturas, en esta etapa fue el sobrenadante el que se eliminó y el pellet hecho completamente de ADN fue finalmente resuspendido en agua ultra pura.

A continuación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa donde el gel se preparó previamente con un contenido de 1  $\mu$ L de bromuro de etidio, este gel fue colocado en una cámara electroforética de manera que los pocillos estuvieran orientados hacia el cátodo, luego la cámara electroforética fue llenada con buffer TAE 1x casi en su totalidad y con la ayuda de una micropipeta se cargó uno de los pocillos del gel con 5  $\mu$ L del ADN aislado el cual previamente fue mezclado con buffer de carga, otro de los pocillos fue cargado con 4  $\mu$ L de un marcador de peso molecular. La electroforesis se puso a funcionar con un voltaje de 95 V proporcionada por la fuente de poder y se lo dejó correr por aproximadamente 1 hora. Transcurrido dicho periodo de tiempo, el gel fue retirado y observado en un Transiluminador UV en total oscuridad, donde las bandas correspondientes al ADN aislado y al marcador fueron observadas nítidamente gracias al bromuro de etidio que les concedió luminosidad a una longitud de onda de 302 nm.

Luego de separar el ADN del gel, se realizó la amplificación de la secuencia correspondiente al gen del rRNA 16S, por lo que 3  $\mu$ L de la muestra de ADN aislada fueron colocados en un tubo de PCR, al que se la añadieron 4  $\mu$ L de la solución de

primers (cada uno con una concentración final de 200  $\mu\text{M}$ ) y 30  $\mu\text{L}$  de Platinum PCR Supermix High Fidelity. El tubo fue colocado en un termociclador, el cual fue programado de la siguiente manera: Primero que la temperatura subiera a 95  $^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos para la desnaturalización completa del ADN y la activación de la Taq polimerasa presente en el Supermix. Posteriormente se programaron 25 ciclos donde la temperatura oscilaría entre 90  $^{\circ}\text{C}$  para la desnaturalización, 50  $^{\circ}\text{C}$  para el alineamiento y 70  $^{\circ}\text{C}$  para la extensión, cada uno por 70 segundos. Luego, se programó 1 ciclo a 72  $^{\circ}\text{C}$  por 7 minutos para una extensión final y para culminar se programó el termociclador para que mantuviese la muestra a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Los productos de la amplificación de la PCR fueron sometidos a una nueva electroforesis, la cual permitió separar los fragmentos de interés del resto del ADN.

Siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante del kit llamado QIAquick PCR Purification se purificaron los productos de la PCR. Los fragmentos de ADN correspondientes a la rRNA 16S sirvieron para secuenciar este gen en el Departamento de Biología Molecular del Massachusetts General Hospital en Boston, Estados Unidos, por lo que al tubo que contenía los fragmentos se le añadió un volumen del primer forward necesario para la secuenciación del gen rRNA 16S, se lo etiquetó adecuadamente y se lo envió bajo el resguardo de la empresa ADN Uchumayo.

La secuencia resultante llegó en formato digital e inmediatamente se procedió a realizar su alineamiento y comparación con la serie de secuencias encontradas en la base de datos de Genbank a través del algoritmo BLAST, específicamente haciendo uso del nucleotide BLAST encontrado gratuitamente dentro de la web del National Center for Biotechnology Information (NCBI), de todas aquellas secuencias se escogieron unas cinco que mostraron un valor alto tanto en el Score máximo, en el Score Total y en el porcentaje de identidad, es decir, aquellas primeras cinco secuencias que produjeron un alineamiento significativo con la secuencia amplificada de la cepa aislada. Con estas cinco secuencias se realizó un alineamiento de secuencias múltiples mediante el algoritmo MUSCLE dentro de la web de la European Bioinformatics Institute. Finalmente se elaboró un árbol filogenético donde se pudo determinar las distancias genéticas entre la cepa en estudio y las cepas a las que correspondían las secuencias seleccionadas del BLAST, este procedimiento se hizo mediante el uso del programa MEGA 7.0.14 utilizando la opción Neighbor-Joining y el modelo de parámetros Kimura-2.

### **2.3.8 Pruebas de la producción de biosurfactante**

La habilidad de la cepa aislada para producir biosurfactantes se probó mediante su adaptación y cultivo en 147 mL de un medio salino cuya composición se indica en la Tabla N°4, el cual fue suplementado con 1% v/v de aceite residual de cocina, como fuente de carbono barata, obtenido de un restaurante de la ciudad de Arequipa. Para que

sea adecuado para este experimento fue necesario previamente retirarle los sólidos suspendidos mediante su filtración a través de un papel filtro y almacenado en un recipiente estéril. Todo el medio en su conjunto fue elaborado para promover la producción exitosa de biosurfactante, pues fueron sus componentes los indicados como indispensables para la promoción de la producción de estos metabolitos. Aquellas sales cuya cantidad fuera menor a 50 mg y fueran imposibles de pesar en una balanza analítica se prepararon aparte mediante la elaboración de soluciones concentradas de las mismas partiendo de cantidades de fácil pesaje, estas sales fueron añadidas posteriormente al medio de producción en los volúmenes requeridos, previamente calculados, con tal de mantener la concentración indicada.

**Tabla N° 4:** Composición del medio salino empleado en el presente trabajo

COMPUESTO	FÓRMULA	CONCENTRACIÓN
Fosfato de Potasio Monobásico	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.5 g/L
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g/L
Sulfato de Manganeso Tetrahidratado	$\text{MnCl}_2$	3.3 mg/L
Sulfato Ferroso Heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8 mg/L
Fosfato de Potasio Dibásico	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1 g/L
Sulfato de Zinc	$\text{ZnSO}_4$	4.4 mg/L
Cloruro de Calcio	$\text{CaCl}_2$	50 mg/L
Sulfato de Cobre	$\text{CuSO}_4$	0.1 g/L
Peptona		2 g/L

Aparte se elaboró un inóculo de 24 horas en 3 mL de caldo nutritivo, equivalente al 2% del volumen total del medio de producción, el cual fue preparado en un tubo de ensayo al que se le sembró la cepa aislada en condiciones de esterilidad. Se decidió idear un sistema de agitación que estaría adosado al recipiente de producción para que garantizara el crecimiento celular por todo el medio de producción, el cual consistió de un pequeño motor de DVD de 5.9 V, que cumplía la función de rotor, que proporcionara la potencia suficiente para que un agitador plástico adosado a ella pueda girar. Este sistema se puso en funcionamiento mediante la energía proporcionada por una pila de tamaño D con suficiente energía como para que el sistema funcione por 3 días. Se verificó que el medio preparado en un matraz estuviera en un pH de 7 para posteriormente ser esterilizado en un autoclave y colocado en su correspondiente recipiente de fermentación. Después de dejar que enfríe, fue inoculado con los 3 mL de inóculo en condiciones de esterilidad e incubado a 37 °C por 72 horas con el sistema de agitación en funcionamiento. A partir de este cultivo se sacó muestras de 10 mL que fueron colocadas en tubos Falcon, los cuales fueron centrifugados a 8000 rpm durante 10 minutos para separar el caldo de cultivo de las células bacterianas.

### ***2.3.8.1 Prueba de la dispersión del Aceite (Oil spreading assay)***

Se realizó en una placa Petri a la cual se le llenó con 20 mL de agua destilada, posteriormente, con la ayuda de una micropipeta, se añadió una sola gota de aceite usado de auto equivalente a 20  $\mu$ L en el centro de la placa dejándolo esparcirse por toda la superficie del agua. A continuación, se extrajo 20  $\mu$ L del caldo de cultivo libre de células de uno de los tubos con la ayuda de una micropipeta y se añadieron en el centro de la placa y sobre el aceite esparcido. Se procedió a observar si se da la formación de una zona clara en crecimiento a partir del centro esparciendo el aceite a su alrededor.

### ***2.3.8.2 Prueba del colapso de la gota (Drop collapse assay)***

Para esta prueba se hizo uso de un pedazo de lámina de parafilm-M, caracterizada por su superficie hidrofóbica, sobre la cual se colocaron, con la ayuda de un gotero, dos gotas del caldo de cultivo libre de células, una gota de agua destilada como control negativo, y una gota de una solución de Tween 80 (1 mg/mL) como control positivo. A continuación, se observó después de 1 minuto la forma y dispersión de las dos gotas sobre la superficie, es decir, ver si estas gotas colapsaban y se hacían planas como el control positivo o no como el control negativo debido a la presencia de una sustancia en ellas que reduce su tensión superficial.

## **2.3.9 Evaluación de la cinética de crecimiento en la producción de biosurfactante**

La cinética de crecimiento de la cepa se evaluó en el medio de producción con distintos volúmenes de aceite de cocina residual correspondientes a aquellos escogidos aleatoriamente para la realización de este trabajo. Para ello se volvió a elaborar un inóculo con caldo nutritivo pero esta vez se prepararon 30 mL en un matraz los cuales fueron inoculados con una asada extraída de una colonia procedente de un nuevo repique. Este mayor volumen que se preparó obedecía al hecho de que se utilizaría más cantidad de medio de producción. El inóculo fue incubado a 37 °C por 24 horas sobre un agitador shaker a una velocidad de 100 rpm con el fin de garantizar el crecimiento de la cepa en todo el caldo y así obtener un inóculo homogéneo.

### ***2.3.9.1 Elaboración de una curva de calibración***

Se preparó una serie de diluciones en siete tubos eppendorf a partir del inóculo preparado con anterioridad, del cual se tomó una muestra de 2 mL que fue sometido a centrifugado en una microcentrifuga a 7000 rpm por 10 minutos para separar el caldo de las células. El caldo de cultivo fue retirado y desechado con la ayuda de una

micropipeta y el pellet celular fue resuspendido en 2 mL de una solución de NaCl al 0.9%. A partir de allí se inició las diluciones seriadas consistentes en la transferencia de 1 mL del primer tubo eppendorf al segundo previamente lleno con la solución de NaCl al 0.9% y de este último al tercero hasta completar los siete tubos eppendorf con el mismo procedimiento. A continuación se procedió al conteo de células presentes en cada una de las diluciones haciendo uso de la Cámara de Neubauer, para ello se sacó una muestra de 10  $\mu\text{L}$  para cada una de las diluciones y se la colocó sobre las cuadrículas de la zona deprimida de la cámara a la que previamente se le había colocado un cubreobjetos encima. Posteriormente, bajo un microscopio, se contaron aquellas células localizadas en cinco cuadrantes de 0.04  $\text{mm}^2$  de área escogidos al azar, y se determinó la concentración celular en cada una de las diluciones. Por otro lado, se determinó la Densidad Óptica de cada una de las diluciones mediante el uso de un espectrofotómetro, para ello se programó el equipo para que emitiera ondas de 600 nm de longitud y se hizo uso de la solución de NaCl al 0,9% como blanco. A partir de los datos obtenidos mediante el conteo y la lectura en el espectrofotómetro, se elaboró una curva de calibración que relacionara la concentración celular con la Densidad Óptica.

#### ***2.3.9.2 Determinación de las curvas de crecimiento y la velocidad específica de crecimiento***

Cuatro volúmenes de 245 mL del medio de producción fueron colocados dentro de un número igual de recipientes de producción y suplementados cada uno con distintos volúmenes de aceite residual de cocina libre de sólidos suspendidos equivalentes al 0.75%, 1%, 1.5% y 2.5% v/v del volumen final del medio en cada recipiente, tomando en consideración que los 5 mL restantes corresponden a la cantidad de inóculo añadido equivalente al 2% del total. Luego de esterilizar el medio en autoclave y de montar adecuadamente los sistemas de agitación, se inoculó, bajo condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar, cada uno de los recipientes con 5 mL del inóculo previamente preparado. A partir de ese momento, considerado el tiempo cero, se procedió a realizar por duplicado la toma de muestras de 2 mL con una micropipeta de cada uno de los recipientes, dichas muestras fueron colocadas en tubos eppendorf estériles de 2 mL. La toma de muestras se realizó en intervalos de tiempo variables hasta la culminación de las 72 horas de incubación de los recipientes a 37 °C. Cabe indicar que este procedimiento se realizó evitando en todo momento la posible contaminación del cultivo por lo que se hizo uso de mecheros y puntas que se usaron una sola vez para cada recipiente e intervalo de tiempo. Cada una de las muestras fueron sometidas a centrifugación por 10 minutos a 7000 rpm, lo cual permitió separar en forma de pellets la biomasa presente en cada tubo del caldo de cultivo, esto último fue desechado a excepción de aquellas provenientes de las muestras extraídas a las 16, 24, 48 y 72 horas, las cuales sirvieron no solo para demostrar la producción de biosurfactante por parte de la cepa sino también para realizar las pruebas preliminares anteriormente mencionada, en esta ocasión, cabe indicar que se midió el diámetro de

las zonas claras formadas en la prueba de la dispersión del aceite con la ayuda de papel milimetrado. Los pellets obtenidos fueron lavados dos veces con 2 mL de una solución de NaCl al 0,9% y centrifugados nuevamente con el fin de eliminar residuos de aceite tanto de la biomasa como de los tubos eppendorf que pudieran impedir la correcta performance de los siguientes procedimientos. Finalmente, los pellets fueron resuspendidos en volúmenes de solución de NaCl al 0,9% regidos por la marca de 2 mL encontrada en cada uno de los tubos, es decir, equivalentes al volumen retirado de caldo de cultivo. A continuación, se procedió a la lectura de la Densidad Óptica de cada uno de los tubos en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm, teniendo como blanco a la misma solución de NaCl. A partir de la conversión previa a concentración celular de cada una de las lecturas obtenidas con la ayuda de la curva de calibración realizada con anterioridad, se elaboró las cuatro distintas curvas de crecimiento que permitieron encontrar, mediante una fórmula, distintos valores de la velocidad específica de crecimiento que podría ser afectada por los diferentes volúmenes de aceite empleados.

### **2.3.10 Producción del biosurfactante**

Se volvió a preparar el medio salino de producción en dos matraces de 1 L, de los cuales se repartió 245 mL equitativamente en cuatro matraces más pequeños asegurándose previamente de que el medio se encuentre a un pH de 7. A cada uno de los matraces se lo suplementó con los diferentes volúmenes indicados anteriormente de aceite residual de libre de sólidos suspendidos (0.75%, 1%, 1.5%, 2.5% v/v). Una vez repartidos en sus respectivos recipientes de fermentación, dentro de una cámara de flujo laminar se inocularon cada uno de ellos con la ayuda de una micropipeta con 5 mL de un nuevo inóculo previamente preparado en un matraz pero obtenido a las 12 horas para garantizar que las células se encontrasen en su etapa de crecimiento, se los incubó a 37 °C durante 72 horas con los sistemas de agitación ideados en pleno funcionamiento. El litro restante del medio sirvió para realizar un segundo ensayo de producción que siguió también los métodos que serán indicados a continuación para la obtención de resultados más precisos.

### **2.3.11 Separación del biosurfactante**

Transcurrida las 72 horas, los sistemas de agitación fueron apagados y separados de los recipientes de fermentación, los mismos que fueron retirados de la incubadora y posteriormente mantenidos refrigerados a 4 °C por aproximadamente 24 horas con el fin de detener el crecimiento celular y evitar la contaminación del caldo. Seguidamente el contenido de cada uno de los recipientes fue colocado en tubos falcon de 15 mL y sometido a centrifugación por 10 minutos a 8000 rpm por turnos con el fin de separar caldo de cultivo con biosurfactante de la biomasa precipitada. Se recogió todo el caldo libre de células y fue colocado en otros cuatro nuevos frascos previamente esterilizados

y rotulados conforme a los suplementos de aceite empleados, cabe indicar que los pellets de biomasa no fueron desechados debido a que fueron empleados para determinar el coeficiente de rendimiento de producción  $Y_{p/x}$ . El caldo libre de células se acidificó con una solución de HCl 1N hasta un pH de 2, no solo siendo monitoreado este procedimiento con un pHmetro previamente calibrado sino también haciendo uso de papel indicador de pH. Cada uno de los recipientes con el caldo de cultivo se refrigeró durante 24 horas a 4 °C, tiempo durante el cual se dio la formación de un precipitado conteniendo el biosurfactante. Se pasó el caldo nuevamente a tubos falcon y se realizó una nueva centrifugación a 10000 rpm por 15 minutos tratando siempre de mantener la temperatura de 4 °C, los pellets formados en esta ocasión contenían al biosurfactante por lo que el caldo sobrenadante fue desechado.

### 2.3.12 Recuperación del biosurfactante

Se sometió a cada uno de los precipitados a una resuspensión con 1 mL de agua destilada, con la ayuda de una micropipeta se extrajeron en su totalidad dichos volúmenes y fueron colocados en cuatro pequeños frascos estériles adecuadamente rotulados con los volúmenes de los suplementos de aceite. En cuatro peras de decantación se añadió el contenido de los viales con los aproximadamente 16 mL del precipitado en solución, a los cuales luego se les agregó 20 mL de una mezcla 1:2 de cloroformo y metanol frío para la separación del biosurfactante mediante una extracción líquido-líquido, para ello se agitó vigorosamente cada una de las peras durante 15 minutos y se dejaron reposar por aproximadamente 5 minutos. Transcurrido dicho tiempo, en cada una de las peras se observó la formación de dos fases, de las cuales la fase orgánica inferior, que contenía el biosurfactante, fue separada abriendo la llave de descarga y se almacenó el contenido temporalmente en sus cuatro correspondientes frascos. El solvente de cada frasco fue evaporado en un rotavapor, para ello el contenido de los mismos fue colocado en el balón rotativo del rotavapor y se lo puso en funcionamiento a 40 °C tomando en cuenta que se realizó el procedimiento en condiciones de vacío. En los cuatro casos, se hizo uso del rotavapor hasta obtener un líquido semiviscoso, el cual fue retirado y colocado en viales previamente rotulados y pesados con sus respectivos tapones. El biosurfactante fue dejado a secar por 48 horas a 37 °C dentro de una estufa vacía, finalmente se pesaron cada uno de los viales con el biosurfactante seco cuya cantidad fue determinada mediante la diferencia existente entre este pesaje y aquel realizado solo a los viales.

### 2.3.13 Determinación del coeficiente de rendimiento $Y_{p/x}$

Como se indicó anteriormente, los pellets de biomasa no fueron desechados y por el contrario, después de realizarles un lavado y resuspendido con agua destilada, fueron depositados en cuatro placas Petri previamente pesadas y rotuladas, las cuales fueron colocadas en una estufa programada a 50 °C para la obtención del peso seco de la

biomasa. El proceso de secado fue monitoreado durante el tiempo que duro el mismo mediante su pesaje hasta obtener un peso constante que permitiera, junto con los resultados de las cantidades de biosurfactante obtenido, el cálculo del coeficiente de rendimiento de producción de biosurfactante en base a la biomasa ( $Y_{p/x}$ ).

### 2.3.14 Caracterización del biosurfactante

Se hizo uso de técnicas y metodologías que permitieron determinar la característica química y las propiedades físicas más importantes del biosurfactante obtenido. Para ello fue necesario realizar la dilución del biosurfactante obtenido en 10 mL de agua destilada dentro de un matraz.

#### 2.3.14.1 Determinación de la naturaleza del biosurfactante

Se hizo uso de tres simples pruebas bioquímicas, cada una de ellas con la capacidad de determinar un solo tipo de biosurfactante basado en su estructura química:

- Prueba del fenol-ácido sulfúrico: Con la ayuda de una micropipeta se añadió 1 mL de la solución de biosurfactante dentro de un tubo de ensayo, al cual posteriormente se agregó 1 mL de una solución de fenol al 5% previamente preparada. Después de mezclar por unos segundos, se añadió gota a gota una solución de ácido sulfúrico concentrado, cuya cantidad empleada dependió del desarrollo de un color característico de las reacciones dentro del tubo, color que a su vez está relacionado con la presencia o no de glicolípidos en la solución. Se realizó en otros tubos de ensayo un control negativo con agua destilada y un control positivo con lactosa con los cuales se comparó el tubo con la solución de biosurfactante.
- Prueba de Biuret: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de la solución de biosurfactante al que posteriormente se le añadió 1 mL del reactivo de Biuret caracterizado por un color azul debido a la presencia del sulfato de cobre en su formulación. Se agitó ligeramente el tubo y se esperó a que se diera algún cambio en el color relacionado a la presencia de lipopéptidos. Se tomó como control negativo el propio reactivo de Biuret con el cual se comparó el tubo con la solución de biosurfactante.
- Prueba del Fosfato: Se llevó a cabo también en un tubo de ensayo donde se colocaron 2 mL de la solución de biosurfactante, al cual se le añadieron 10 gotas de la solución de ácido nítrico 6 M. La mezcla fue sometida a calentamiento dentro de un equipo de baño María programado a 70 °C por 10 minutos. Transcurrido el tiempo indicado, se retiró el tubo e inmediatamente se añadió gota a gota y lentamente una solución de molibdato de amonio al 5% hasta la mezcla adquiriera un color amarillo producto de las reacciones llevadas en el tubo. Finalmente, se observó la formación de un precipitado amarillo en el fondo (fosfomolibdato de amonio) del tubo relacionado a la presencia de un biosurfactante del tipo

fosfolipídico. Se realizó un control negativo con la reacción llevada a cabo solo en agua destilada.

#### ***2.3.14.2 Determinación del índice de emulsificación***

En un recipiente con 250 mL de agua destilada se disolvió el biosurfactante obtenido de uno de los procesos de cultivo, con la ayuda de una micropipeta 2 mL de esta solución de biosurfactante fueron colocados en un tubo de ensayo al que posteriormente se le añadieron 2 mL de aceite de cocina. A continuación, el tubo fue agitado vigorosamente por 3 minutos haciendo uso de un agitador vórtex para mezclar ambas fases y fomentar la formación de una capa de emulsión. La mezcla se dejó reposar por 24 horas y se realizó la medición de la altura de la capa de emulsión formada y la altura total del contenido del tubo, esto se hizo con el apoyo de una hoja de papel milimetrado. El índice de Emulsificación se calculó mediante una fórmula que lo expresa en porcentaje.



## CAPÍTULO III

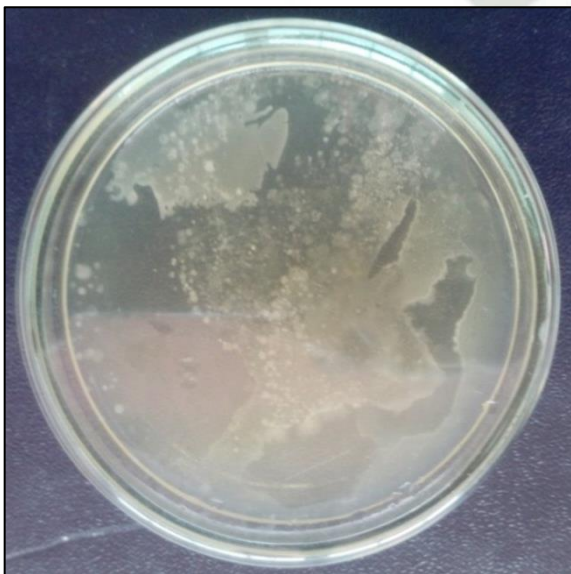
### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 AISLAMIENTO DE LA CEPA NATIVA

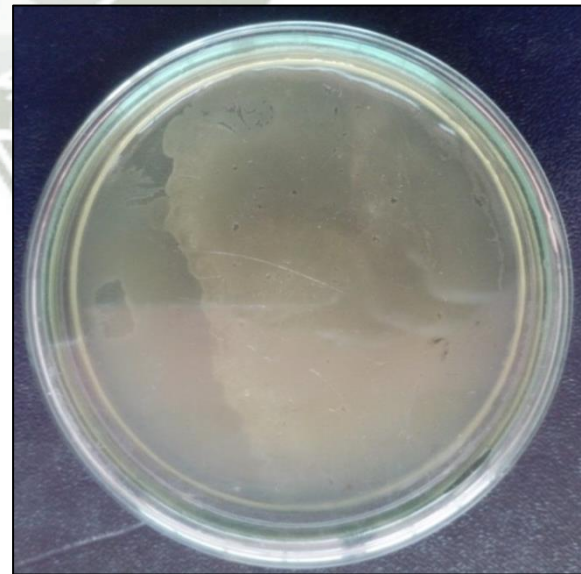
Se decidió optar por recolectar una muestra de tierra para el aislamiento de una cepa bacteriana que pertenezca a alguna de las especies nombradas en la Tabla N°2. Era importante que la tierra recolectada se encontrara contaminada con hidrocarburos donde es probable que los microorganismos desarrollasen estrategias de supervivencia (enzimáticas y fisiológicas) como la capacidad para producir biosurfactantes. Estas condiciones propician variaciones poblacionales de los microorganismos autóctonos del suelo, quienes de manera natural realizan la degradación química del contaminante en los suelos.

Cabe mencionar que, como lo indican Leahy y Colwell<sup>45</sup>, géneros como *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* y *Pseudomonas* poseen la capacidad de biodegradar o biotransformar alguno de los muchos hidrocarburos existentes en la actualidad, por lo que se consideró una buena estrategia realizar la búsqueda de la cepa de interés en tierras contaminadas con hidrocarburos.

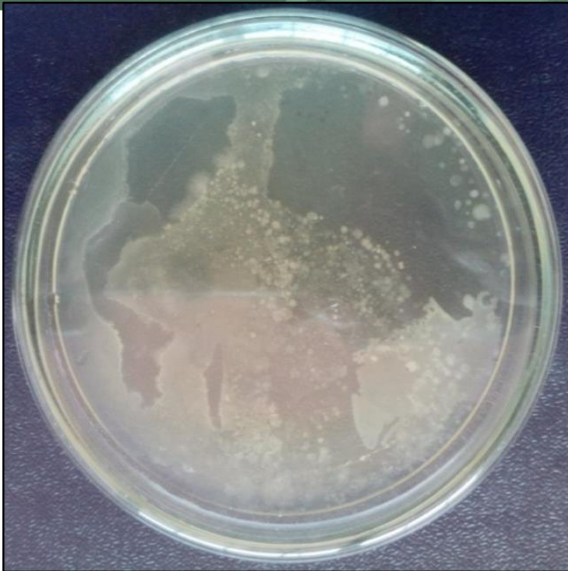
Dicha muestra de tierra se suspendió en agua estéril para separar los microorganismos y después de realizar una serie de diluciones (Anexos N°2.1 y N°2.2), se obtuvieron las siguientes cinco placas Petri con crecimiento microbiano (Figuras N°8, N°9, N°10, N°11 y N°12):



**Figura N° 8:** Placa Petri con crecimiento microbiano obtenido directamente de la suspensión.



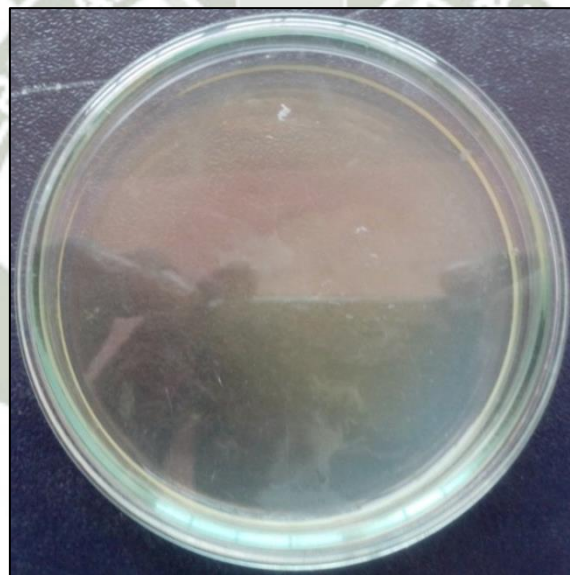
**Figura N° 9:** Placa Petri con crecimiento microbiano obtenido de la dilución  $1 \times 10^{-1}$ .



**Figura N° 10:** Placa Petri con crecimiento microbiano obtenido de la dilución  $1 \times 10^{-2}$ .



**Figura N° 11:** Placa Petri con crecimiento microbiano obtenido de la dilución  $1 \times 10^{-3}$ . En círculo, la colonia correspondiente a la cepa del género *Bacillus*.



**Figura N° 12:** Placa Petri con crecimiento microbiano obtenido de la dilución  $1 \times 10^{-4}$ .

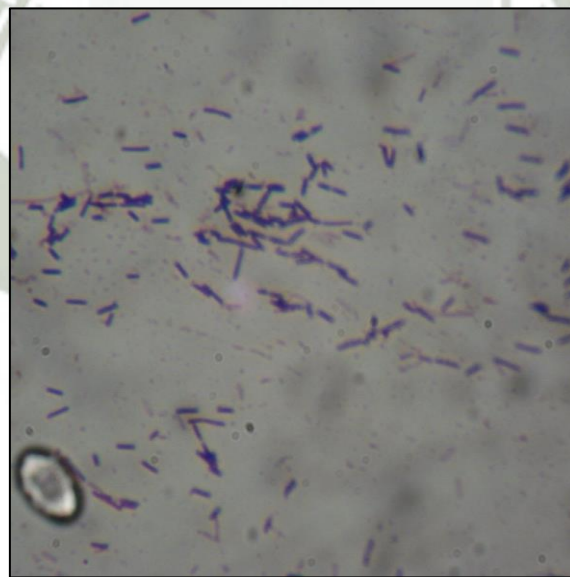
Como se puede apreciar en cada una de las gráficas anteriores, el crecimiento microbiano fue mayor del esperado pues se pensó que al ser una tierra contaminada esta no albergaría gran cantidad de microorganismos y por lo tanto no se obtendría un crecimiento tan mayúsculo en apenas 24 horas.

A excepción de las placas que se muestra en las Figuras N° 9 y N°12, donde solo se encontró el crecimiento de colonias de aspecto similar, las demás placas mostraron el crecimiento de colonias entremezcladas de diferentes aspectos, muchas de ellas

circulares de color blanco rodeadas de aquellas de crecimiento irregular con un rango de color que iba del blanco al crema casi amarillento, todas ellas, con una textura cremosa y superficie variada.

De todas las placas, se decidió por hacer un frotis solo de aquellas colonias que presentaran características macroscópicas diferenciales importantes con el fin de evitar repetir la caracterización de una misma cepa, en total se contabilizaron siete colonias con aparentemente sus propias características distintivas y sus frotis fueron sometidos a una tinción de Gram (Anexo 2.3).

La observación bajo el microscopio de los frotis mostró que muchas de las colonias se encontraban contaminadas representando la gran variedad de microorganismos de diferentes formas presentes en el suelo contaminado, todos ellos correspondientes a bacterias debido a la necesidad del objetivo 100X del microscopio para su correcta apreciación. No se encontraron levaduras, algunas de las cuales, además de formar colonias con aspecto muy similar a las de algunas bacterias, son capaces de prosperar en presencia de hidrocarburos como lo demostraron Leahy y Colwell<sup>45</sup> al aislar algunas cepas de suelos contaminados con hidrocarburos.



**Figura N° 13:** Células observadas bajo el microscopio con formas de bastón Gram positivas.

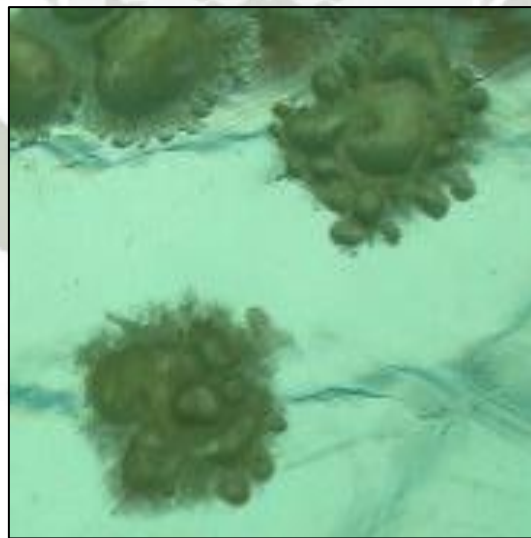
Cabe señalar que, en algunos de los frotis elaborados se pudo apreciar el entremezclado mencionado anteriormente al encontrarse, en un solo frotis, al menos dos variedades de microorganismos de diferentes formas; sin embargo, a pesar de ello, el resto de frotis presentaban cepas bien diferenciadas. Uno de dichos frotis obtenido de la colonia señalada con círculo rojo en la Figura N°11 mostraba células con dos aspectos bien característico pues eran abastionadas y Gram positivas (Figura N°13), lo que hizo pensar

que probablemente dicha cepa pertenecía al género *Bacillus*, el cual, como se mencionó antes, está entre aquellos géneros bacterianos capaces de degradar hidrocarburos contaminantes. Se decidió por emplear esta cepa, por lo que fue seleccionada y aislada completamente pues existían algunas razones más que solo estar considerada dentro de uno de los géneros que poseyeran alguna estrategia metabólica para proliferar en el suelo contaminado, dentro de estas razones se encontraba el hecho que muchas de las especies de *Bacillus* son muy resistentes a condiciones extremas gracias a la capacidad de formar esporas y por ende muy versátiles, además se sabe mucho del género e incluso muchas de sus especies son empleadas a nivel industrial.

### 3.2 CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA AISLADA

#### 3.2.1 Caracterización macroscópica

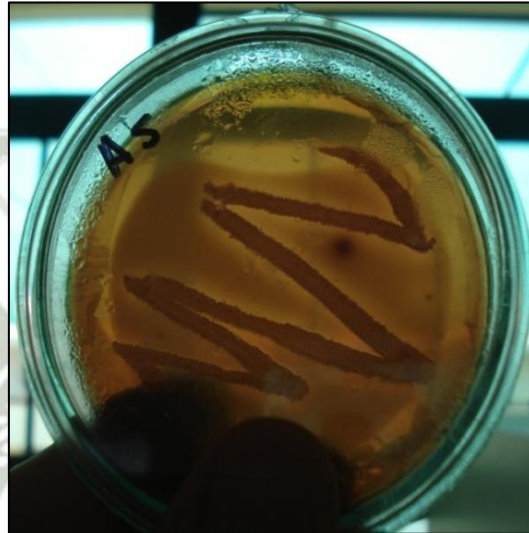
Aislada la cepa en una placa Petri con agar nutritivo y luego de un repique, se observó las características presentadas por las colonias crecidas. Como se puede apreciar en la Figura N°14, las colonias que crecieron a un tamaño considerable presentaron un color crema y una forma irregular cuyos bordes eran lobulados y que comúnmente presentaron extensiones rizoidales, además mostraron una superficie rugosa debido a las elevaciones presentes en ciertas partes de las mismas.



**Figura N° 14:** Colonias de la cepa aislada, donde se puede observar sus principales características macroscópicas.

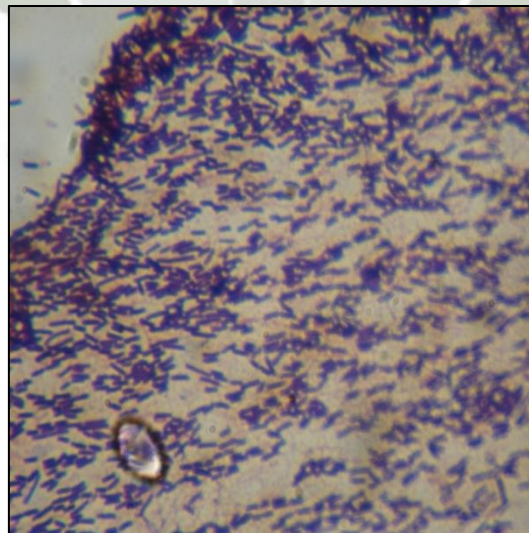
Por otro lado, también se realizó el cultivo de la cepa en agar sangre con un único fin, observar si la cepa es capaz de producir la hemólisis de la sangre presente en el medio. Como se observa en la Figura N°15, la cepa presentó las mismas características morfológicas encontradas en su cultivo en agar nutritivo, además se puede apreciar la presencia de una zona clara alrededor de la colonia, a pesar de ser esta muy delgada, se puede afirmar que la cepa posee capacidad hemolítica. Esta prueba es generalmente usada como prueba preliminar en la búsqueda de microorganismos productores de

biosurfactante pues, como lo afirma Zhang et al.,<sup>46</sup> el diámetro de las zonas claras alrededor de las colonias depende de la concentración de biosurfactante producido, es decir, la hemólisis es un indicador importante de que la cepa es capaz de producir biosurfactantes. Sin embargo, este método tiene ciertas limitaciones siendo la más resaltante el no ser específica debido a que existen enzimas capaces de producir también zonas claras alrededor de la colonia bacteriana.<sup>17</sup> Por lo tanto, a pesar de ser un buen indicativo, no se pudo concluir, hasta esta parte, que la cepa aislada sea capaz de producir biosurfactantes.



**Figura N° 15:** Colonia de la cepa aislada en agar sangre con zona clara formada alrededor.

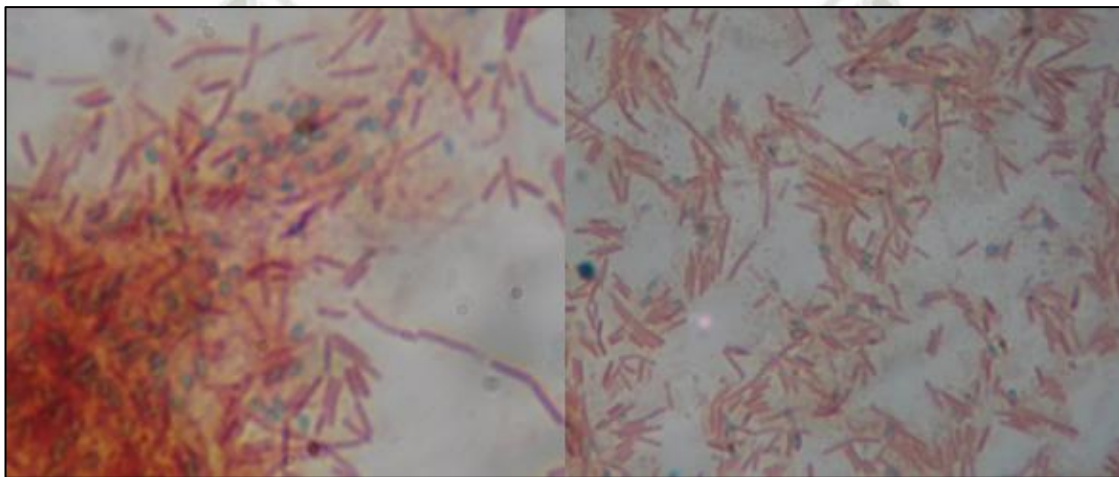
### 3.2.2 Caracterización microscópica



**Figura N° 16:** Tinción de Gram realizada sobre un frotis de la cepa aislada. Se puede apreciar que la cepa es Gram positiva.

Aunque ya sabiendo que la cepa bacteriana aislada era Gram positiva, se decidió realizar una tinción de Gram más sobre un frotis de la misma para corroborar esta característica indispensable para corroborar su correcto aislamiento. En la Figura N°16 se puede apreciar el resultado de esta tinción.

Otra característica microscópica importante a verificar en la cepa aislada fue si esta era capaz de formar esporas, presentes siempre en el género *Bacillus*, para así confirmar su pertenencia a este género. Por ello se realizó la tinción de esporas de Wirtz-Conklin, la cual determinó, como se ve en la Figura N°17, que efectivamente la cepa aislada poseía la capacidad de formar esporas y que lo más probable era que la misma perteneciera al género *Bacillus*. En este caso, casi todas las células observadas poseían esporas con una distribución central en cada una de ellas.



**Figura N° 17:** Tinción de Wirtz-Conklin realizada sobre un frotis de la cepa aislada. Se puede apreciar las esporas, de verde, dentro de las células bacterianas de color rojo.

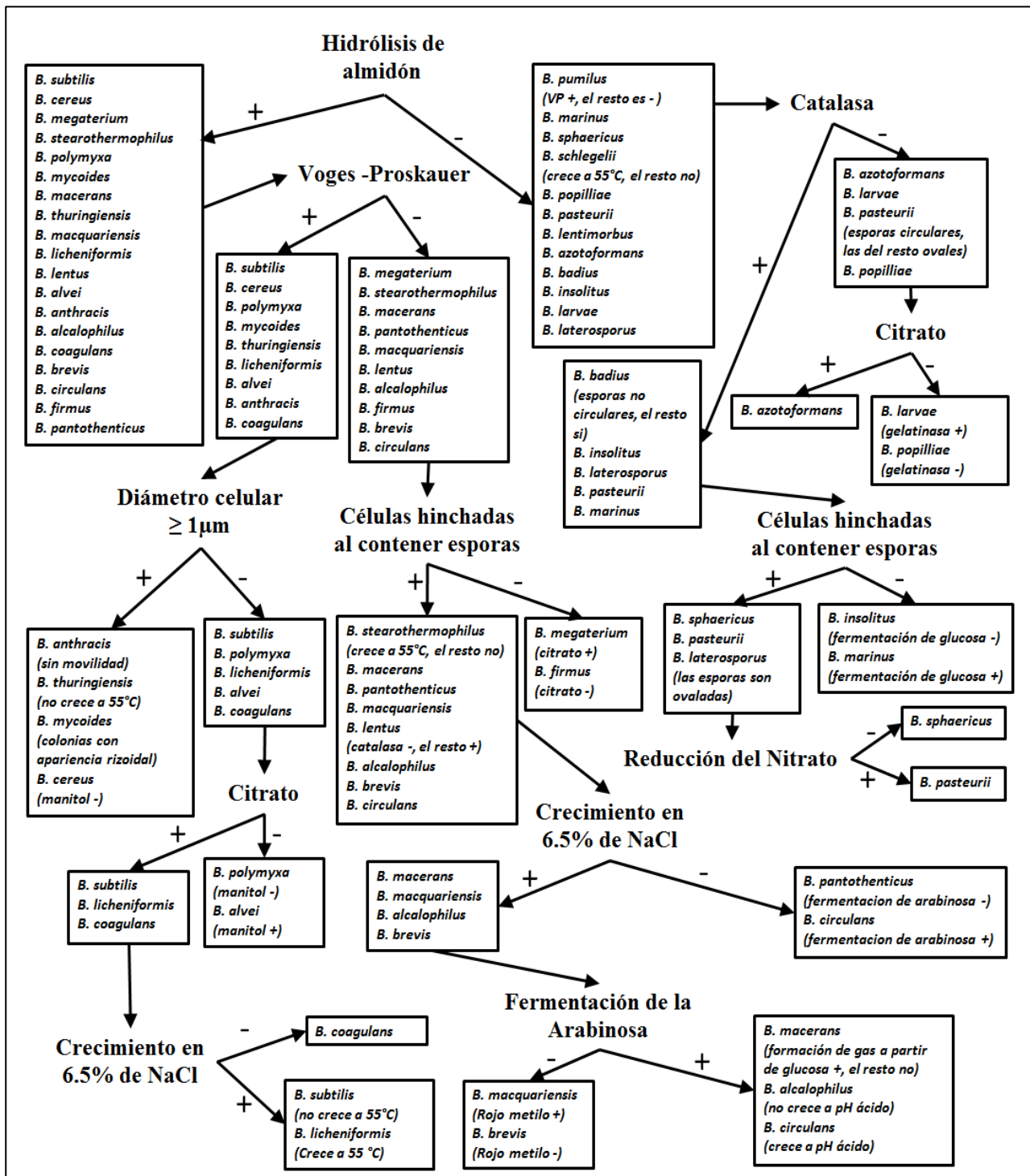
### 3.3 IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA AISLADA

Una vez confirmada la pertenencia de la cepa aislada al género *Bacillus* se procedió a la identificación de la especie, para este propósito se optó por hacer uso de dos métodos, el primero de ellos basado en el metabolismo celular evaluado mediante una serie de pruebas bioquímicas y el segundo correspondiente a la secuenciación del gen del rRNA 16S mediante la extracción del ADN de la cepa, el cual es una metodología ampliamente utilizada en los estudios filogenéticos y taxonómicos de las bacterias debido a que la secuencia se encuentra ampliamente conservada en la mayoría de estos microorganismos.

#### 3.3.1 Pruebas bioquímicas

La mayoría de las pruebas bioquímicas realizadas fueron escogidas en base al esquema (Figura N°18) elaborado a partir del Volumen III del Manual de Bacteriología


Sistemática de Bergey, el resto se optó por realizarlas con el fin de que sustentasen el resultado obtenido en base a este esquema.



**Figura N° 18:** Esquema para la identificación de la mayoría de las especies pertenecientes al género *Bacillus* basado en el Volumen III del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey.<sup>58</sup>

Los resultados obtenidos de la serie de pruebas fueron los que se han anotado en la Tabla N°5 y que a continuación se presenta:

**Tabla N° 5:** Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a la cepa aislada.

PRUEBA	MEDIO	RESULTADOS	IMAGEN
<b>Catalasa</b>	-	Positivo debido a la aparición de burbujas producto de la degradación del peróxido de hidrógeno	
<b>Hidrólisis del almidón</b>	Mueller-Hilton	Positivo dada la aparición de una zona clara alrededor de la colonia, después de agregado el lugol.	
<b>Rojo de metilo</b>	MRVP	Negativo dado la ausencia del color rojo en el medio.	
<b>Voges-Proskauer</b>		Positivo dada la adquisición de un tono rojo por parte del medio debido a la producción de acetoina.	
<b>Movilidad</b>	SIM	Positiva dada la turbidez adquirida por el medio, la cual se extiende más allá de la línea de siembra	
<b>Producción de H<sub>2</sub>S</b>		Negativo dada la ausencia de un precipitado negro correspondiente al sulfuro de hierro	
<b>Indol</b>		Negativo dada la ausencia de un anillo color rojo en la superficie del medio	
<b>Hidrólisis del manitol</b>	Manitol salado	Positiva dado el viraje a un color amarillo del medio debido a su acidificación.	
<b>Crecimiento en altas concentraciones de NaCl</b>		Positivo dado el crecimiento microbiano en el medio caracterizado por altas concentraciones de sal.	
<b>Utilización del citrato</b>	Citrato de Simmons	Positiva dado el crecimiento microbiano y viraje a un color azul del medio debido a la formación de álcali.	
<b>Fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa</b>	TSI	A/A(Pico y fondo amarillo) con formación de CO <sub>2</sub> dada la acidificación del medio producto de la fermentación de los tres azúcares	
<b>Hidrólisis de la úrea</b>	Urea	Negativo dada la ausencia de cambio de color del medio al color rojo correspondiente a la presencia de la enzima ureasa	
<b>Crecimiento a 55°C</b>	Nutritivo	Positivo dado el crecimiento microbiano	

Gracias a algunas de las pruebas bioquímicas y siguiendo el esquema presentado en Figura N°18, se pudo discernir entre un gran número de especies pertenecientes al género *Bacillus* cuál es la correspondiente a la cepa aislada. La hidrólisis del almidón permitió excluir a todas aquellas especies ubicadas en la parte derecha del esquema. Por su parte, la prueba positiva de Voges-Proskauer permitió tomar en consideración las especies *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. alvei*, *B. anthracis* y *B. coagulans*. Debido a que no fue posible determinar el diámetro de las células de la cepa aislada, los resultados de las pruebas bioquímicas de la movilidad, crecimiento a 55°C y la hidrólisis del manitol así como la apariencia mostrada por la cepa en su crecimiento en medio nutritivo, permitieron descartar del grupo anterior las especies *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* y *B. cereus*. Ahora, gracias a la prueba de la utilización del citrato se pudo descartar de las cinco especies restantes a *B. polymyxa* y *B. alvei*. Por último, siguiendo con la secuencia del esquema, se pudo concluir que la cepa aislada correspondía a la especie *B. licheniformis* debido a que se dio el crecimiento de la cepa en altas concentraciones de sal (7.5%) y a 55°C, condiciones en las cuales las dos especies restantes, *B. coagulans* y *B. subtilis*, no prosperan respectivamente.

**Tabla N° 6:** Comparación de las principales características bioquímicas y del cultivo de cepas conocidas de *Bacillus licheniformis* con las de la cepa aislada.<sup>47</sup>

CARACTERÍSTICAS	CEPAS CONOCIDAS DE <i>B. licheniformis</i>	CEPA AISLADA
<b>Tinción de Gram</b>	Positivo	Positivo
<b>Movilidad</b>	Positivo	Positivo
<b>Posición de la espora</b>	Central	Central
<b>Forma de la espora</b>	Elipsoidal	Elipsoidal
<b>Crecimiento a 55°C</b>	Positivo	Positivo
<b>Crecimiento anaeróbico</b>	Positivo	Positivo
<b>Fermentación de la glucosa</b>	Positivo	Positivo
<b>Fermentación de la xilosa</b>	Positivo	-
<b>Fermentación de la manosa</b>	Positivo	-
<b>Utilización del citrato</b>	Positivo	Positivo
<b>Producción de ureasa</b>	Negativo	Negativo
<b>Producción de indol</b>	Negativo	Negativo
<b>Voges-Proskauer</b>	Positivo	Positivo
<b>Reducción del nitrato</b>	Positivo	-
<b>Hidrólisis del almidón</b>	Positivo	Positivo
<b>Producción de oxidasa</b>	Negativa	-
<b>Producción de catalasa</b>	Positiva	Positiva
<b>Hidrólisis de tirosina</b>	Negativa	-
<b>Hemólisis</b>	Variable	Positivo

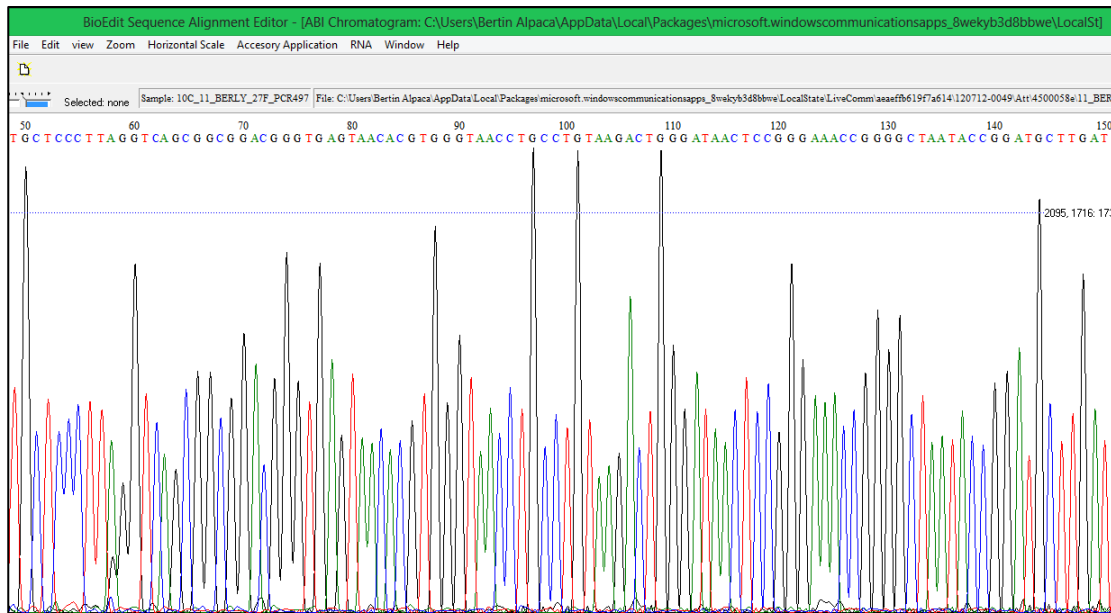
Por otro lado, los resultados de todas las pruebas bioquímicas realizadas, incluyendo aquellas que no fueron mencionadas en el párrafo anterior, fueron comparadas con los resultados de pruebas bioquímicas mostrados por otros autores en diversas publicaciones para distintas especies de *Bacillus* (Anexo N°4) e incluso para cepas conocidas de *Bacillus licheniformis* como los mostrados en la Tabla N°6 corroborando la afirmación realizada de que la cepa aislada pertenece a esta especie. A su vez, esta afirmación concuerda con la descripción realizada de las colonias obtenidas en el medio nutritivo, pues la combinación de todas esas características descritas dan a las colonias un aspecto parecido a algunos líquenes que crecen en los bosques, organismos que precisamente le da el epíteto al nombre científico de *Bacillus licheniformis*, que en esencia significa “con forma de líquen”.

### 3.3.2 Identificación molecular

Fue la identificación molecular la que permitió confirmar la especie a la que pertenecía la cepa aislada haciendo uso de la secuencia que se me fue entregada (Figura N°19), la misma que fue alineada mediante el algoritmo BLAST con otras secuencias parecidas dentro del GenBank encontrándose que la secuencia de nucleótidos del fragmento aislado presenta un alineamiento casi perfecto con aquellas secuencias codificadas de cepas de la especie *Bacillus licheniformis* (Figura N°21), alcanzándose a observar un porcentaje de identidad del 99% y un Score total de idéntico valor al del Score Máximo:

```
GCAGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGG
GAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATCAT
AAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGC
TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTG
AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAG
CAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTA
GGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAA
CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTT
TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGG
AAACTGGGGAACCTGAGTGCAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAaggCGACT
CTCTGGTCTGTAAGTACGCTGaggCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTaaaCGATGAGTGCTAAGTGTTA
GAGGGTTTTcgcCCTTTagtGCTGCAgcaaacGCATTAAGCACTCcGccTGGG
GAGTACGgTCGCAaGaCtgaactcaaaggaattga
```

**Figura N° 19:** Secuencia de nucleótidos correspondientes al gen del rRNA 16S de la bacteria aislada.

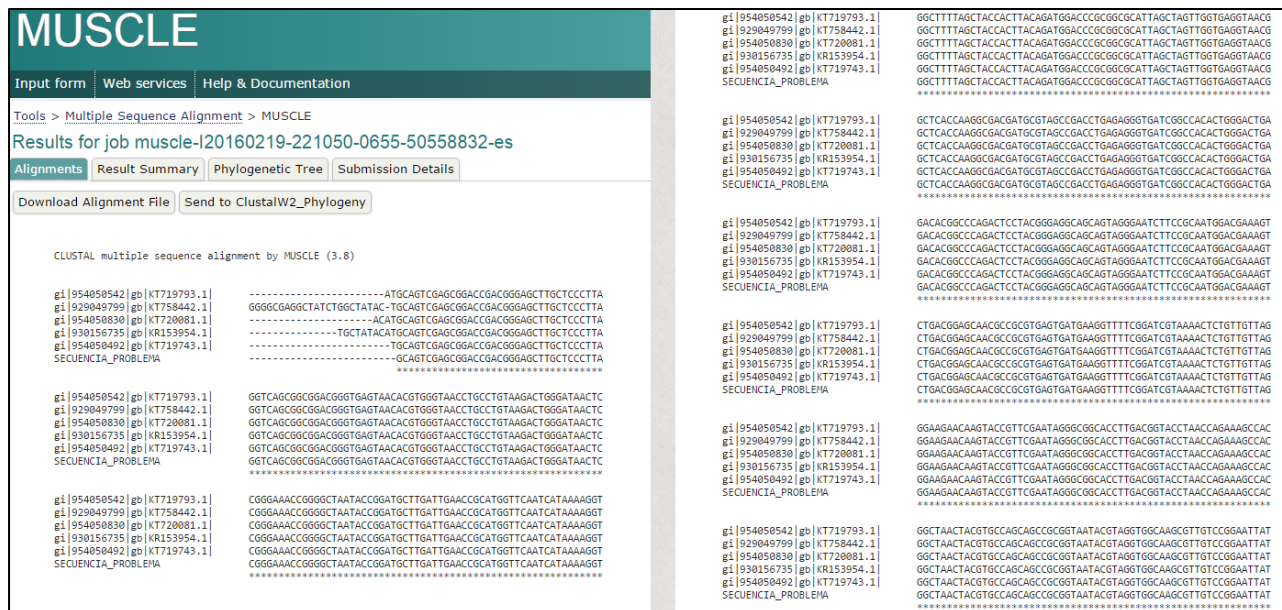


**Figura N° 20:** Parte del cromatograma de la secuencia de nucleótidos correspondientes al gen del rRNA 16S de la bacteria aislada generada por el programa BioEdit.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain PF4H_1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KT720081.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain MPF_32-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KT719793.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain MER_160 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KT719743.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus sp. M3(2015b) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KR153954.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus sp. FJAT-25742 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KR077831.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus sp. FJAT-25682 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KR077787.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain HOB243 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KT758442.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain CY-012 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KR349358.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus sp. M17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KP698308.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain KP040r 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KT200447.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain 58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KJ742529.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain Nam1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KP216563.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain TS_10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KJ842635.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain HT-254-B1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KJ528869.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain HT-249 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KJ528865.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain ZQ1108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KJ538552.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain UTM108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KF952569.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain UTM107 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KF952568.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain OKFD2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KC969075.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain 16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KF611993.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus sp. PH-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KF113576.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain WA8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KF428999.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain YLB-P25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1578	1578	100%	0.0	99%	<a href="#">KF376344.1</a>

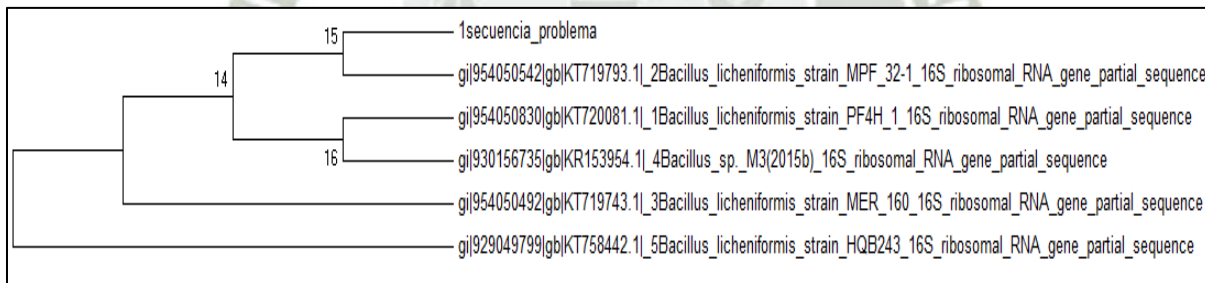
**Figura N° 21:** Resultados del alineamiento del fragmento secuenciado del gen correspondiente al rRNA 16S de la cepa aislada con las secuencias almacenadas en el GenBank arrojados por BLAST.

Al realizar el alineamiento múltiple de la secuencia de nucleótidos del fragmento secuenciado junto a aquellas cinco secuencias arrojadas como similares por el BLAST dentro del MUSCLE, corroboraron que la secuencia del gen de rRNA 16S de la cepa aislada se alinea correctamente con todas las demás, como se puede apreciar en la Figura N°22; sin embargo, se puede indicar que el fragmento amplificado solo es una parte bien conservada del gen correspondiente al rRNA 16S, pues las otras secuencias mostraban una mayor cantidad de nucleótidos en sus cadenas.



**Figura N° 22:** Alineamiento múltiple del fragmento secuenciado del gen correspondiente al rRNA 16S de la cepa aislada con cinco secuencias de especies de *Bacillus*.

El árbol filogenético (Figura N°23) elaborado gracias al programa MEGA 7.0.14 a partir de las secuencias escogidas para el alineamiento en BLAST, mostró que la cepa aislada del suelo se encuentra más relacionada a la cepa MPF de la especie *Bacillus licheniformis*.

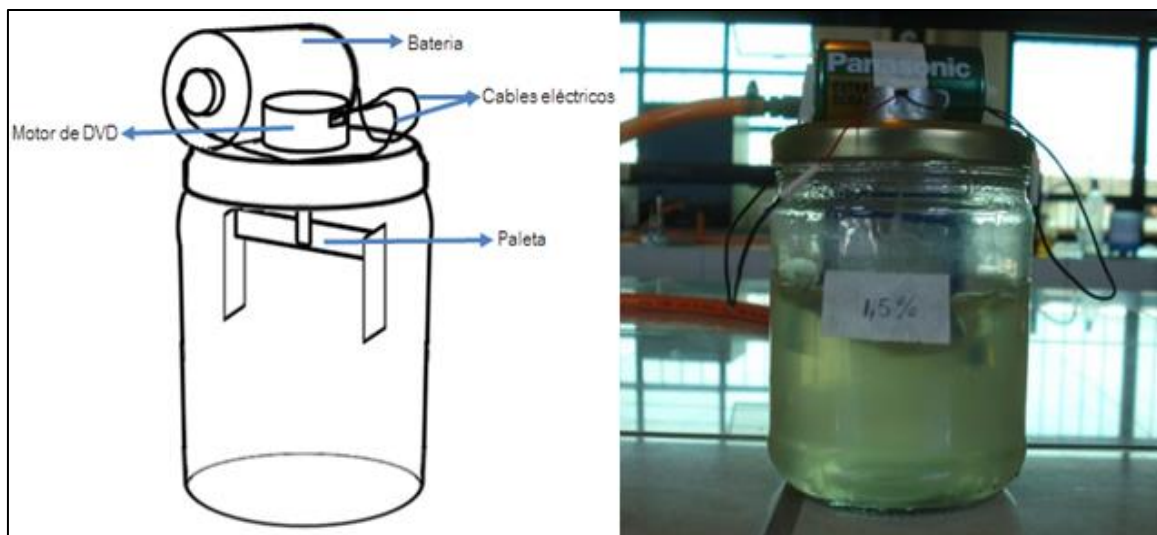


**Figura N° 23:** Árbol filogenético elaborado por MEGA 7.0.14 con la secuencia del gen del rRNA 16S de la cepa aislada.

### 3.4 PRUEBAS DE LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES

Para comprobar que esta cepa aislada de *Bacillus licheniformis* posee la capacidad metabólica para producir biosurfactantes se la cultivó directamente en un medio salino suplementado con aceite de cocina residual dentro de un recipiente con un sistema de agitación acoplado a él (Figura N°24) y diseñado para varios propósitos: evitar el crecimiento exclusivo de la cepa en la superficie del medio observado en la preparación del inóculo, siendo esto indicativo de la preferencia de la misma de utilizar oxígeno en su metabolismo, y por lo tanto, garantizar el crecimiento de la cepa en todo el medio de cultivo sabiendo que *Bacillus licheniformis* es una bacteria anaerobia facultativa. Además, fomentar la formación de una emulsión del aceite en el resto del medio donde

la forma y tipo del agitador empleado jugó un papel importante, en este trabajo se decidió por emplear un agitador que produjera un flujo axial pero que evitara la formación de remolinos por lo que el que se diseñó no estuvo sumergido en el medio y solo tuvo contacto con él con las paletas dispuestas a los extremos. Finalmente, disolver el oxígeno presente en la fase gaseosa del recipiente al medio, debido no solo a la disposición de las paletas sino también a la velocidad con la que el motor las hace girar produciendo una gran turbulencia en la superficie del medio que permita la disolución del gas.



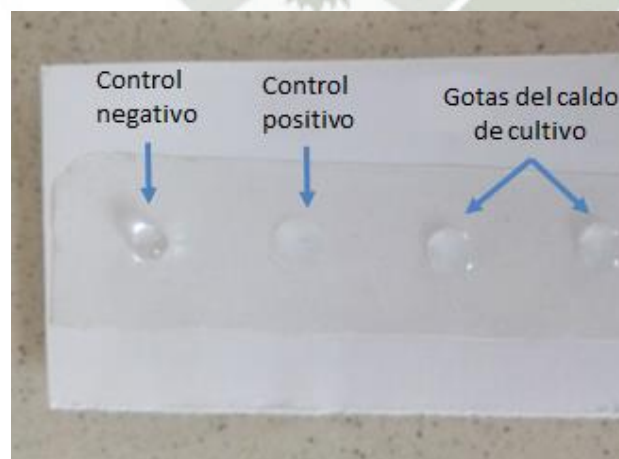
**Figura N° 24:** Recipiente de fermentación con el sistema de agitación acoplado a él. A la izquierda, esquema del sistema de agitación y sus partes. A la derecha, el sistema de agitación en funcionamiento.



**Figura N° 25:** Características del medio finalizado el tiempo de fermentación. A la izquierda, evidencia del crecimiento microbiano adherido a la pared del recipiente. A la derecha, aspecto del medio de cultivo.

Luego de 72 horas de cultivo lo que se pudo apreciar, según se ve en la Figura N°25, fue que la cepa se adaptó rápida y correctamente al medio llegándose a observar biomasa pegada a la pared del recipiente cerca de la superficie producto de la agitación, además, el aceite de cocina remanente, el cual se mostraba como pequeñas burbujas tenía un aspecto muy distinto al normal tornándose opaco en la superficie del medio y confundándose con este último, finalmente, el medio adquirió una tonalidad distinta pasando del crema traslucido a un crema intenso opaco, además, poseía un olor particular que se pudo considerar como algo dulzón al exponerlo al sentido del olfato.

Todo lo anteriormente mencionado hacía pensar que la cepa sí era capaz de producir biosurfactantes pues la única manera de prosperar en el medio empleado era mediante el uso de algún proceso metabólico en el que se incluyera la intervención de alguna molécula capaz de hacer accesible el aceite al medio acuoso, además, cabe indicar que el medio poseía los elementos químicos necesarios para propiciar la biosíntesis de biosurfactantes. Muchos autores consideraron por muchos años que las especies del género *Bacillus* con la capacidad para producir biosurfactantes eran incapaces de emplear los aceites de origen vegetal, como la única fuente de carbono, Sifour et al.<sup>48</sup> no lograron hacer crecer dos especies de *Bacillus* en aceite de girasol; sin embargo, esto no es del todo cierto, Chen et al.<sup>49</sup> informaron que existen trabajos donde cepas del género *Bacillus* han sido capaces de utilizar no solo aceite vegetal de cualquier origen como fuente de carbono, sino también otro tipo de compuestos inmiscibles con el agua, tal es el caso de Pornsunthorntawee et al.<sup>50</sup> quienes haciendo uso de *Bacillus subtilis* fueron capaces de producir biosurfactantes a partir de aceite de palma. Por lo que a pesar de los remanentes de aceite de cocina, el crecimiento de la cepa esté relacionada al consumo de este, como evidencia importante de esta afirmación se puede considerar la total desaparición del aceite residual de cocina en el cultivo suplementado con 0.75% de aceite en la etapa de producción.



**Figura N° 26:** Resultados de la prueba preliminar del colapso de la gota.

Las pruebas definitivas que demostraron de manera contundente la producción de biosurfactantes fueron la de la dispersión del aceite y del colapso de la gota, ambas seleccionadas debido a su simplicidad y bajo coste para ser llevados a cabo, para ello fue necesario separar el caldo de cultivo de la biomasa pues es en el caldo donde las bacterias depositan el biosurfactante sintetizado. Los resultados se pueden apreciar en la Figura N°26 y en la Figura N°27, encontrándose en la prueba de la dispersión del aceite una zona clara o halo causado por el accionar del biosurfactante presente en el medio y que creció desde el centro de la gota de aceite; por su parte, la prueba del colapso de la gota muestra a las dos gotas provenientes del caldo de cultivo algo más planas en comparación al control negativo correspondiente a la gota de agua producto de disminución de la tensión interfacial entre el medio líquido y la superficie hidrofóbica ocasionada por la presencia de biosurfactantes; por otro lado, el colapso de estas gotas no fue tan notorio al de la gota del control positivo, quizás debido a la baja concentración del biosurfactante en el medio o a la interferencia de los demás componentes del caldo.



**Figura N° 27:** Resultado de la prueba preliminar de la dispersión del aceite.

### **3.5 EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE**

#### **3.5.1 Elaboración de una curva de calibración**

Para este fin se preparó una serie de diluciones de la biomasa celular en tubos eppendorf a partir de 2 mL de un nuevo inóculo, al cual previamente se le separó el caldo de cultivo mediante centrifugación y luego se la resuspendió en una solución de NaCl al 0.9% el cual ofrecía las condiciones osmóticas adecuadas para mantener vivas y completas las células bacterianas para su conteo en Cámara de Neubauer (Figura N°28).

Este procedimiento proporcionó datos importantes para la determinación de la concentración de células bacterianas por mililitro de caldo de cultivo en cada una de las diluciones mediante el uso de la fórmula (1):

$$\text{Concentración celular} \left( \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Total de Células Contadas}}{\text{Número de cuadrantes} \times \text{Volumen de cada cuadrante}} \quad (1)$$

Dónde:

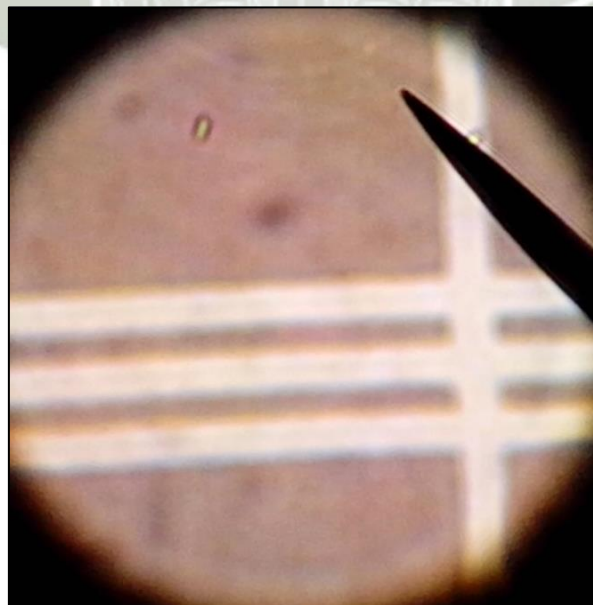
$$\text{Área} = 0,04 \text{ mm}^2$$

$$\text{Profundidad} = 0,1 \text{ mm}$$

$$\text{Volumen de cada cuadrante} = \text{Área} \times \text{Profundidad}$$

$$\text{Volumen de cada cuadrante} = 0,04 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 4 \times 10^{-3} \text{ mm}^3 = 4 \times 10^{-6} \text{ mL}$$

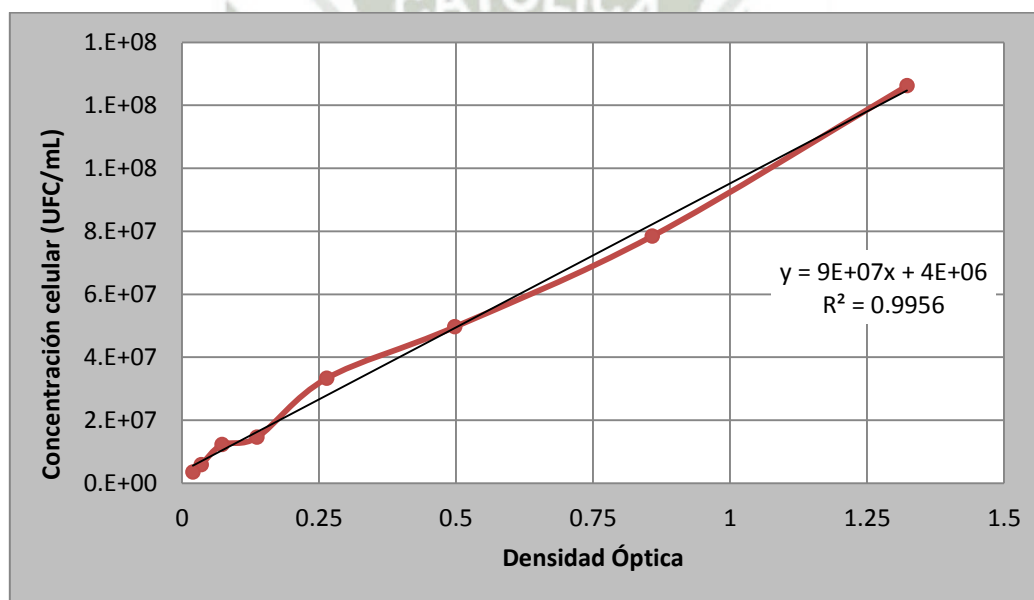
La concentración celular final de cada dilución halladas a partir de la fórmula anteriormente mostrada así como la Densidad Óptica (OD) de cada una de las diluciones encontradas con la ayuda de un espectrofotómetro a la longitud de onda de 600nm, fueron anotados en la Tabla N°7 y permitieron elaborar la curva de calibración representada en la Figura N°29. Se hizo uso de este procedimiento pues es sabido que cuando se dirige un haz de luz hacia un cultivo con microorganismos, la presencia de estos últimos desvían el haz parcialmente, siendo la cantidad de luz que logra atravesar y llegar hasta el detector del espectrofotómetro la que se puede relacionar con el número de microorganismos presentes. Cabe indicar que se escogió la longitud de onda de 600nm pues es a esta longitud donde la absorción de la luz es mínima por parte de las células bacterianas en suspensión y de algunos de sus componentes, por lo que en este caso no estamos tratando con la absorbancia de luz sino por el contrario, con la dispersión de la luz, la cual es proporcional a la concentración celular.



**Figura N° 28:** Vista de una célula de la cepa aislada bajo el microscopio durante el conteo celular en Cámara de Neubauer.

**Tabla N° 7:** Resultados del conteo celular con la Cámara de Neubauer.

DILUCIÓN	CANTIDAD DE MICROORGANISMOS CONTADOS POR CUADRANTES DE 0.04 mm <sup>2</sup>							CONCENTRACIÓN CELULAR (UFC/mL)	DENSIDAD ÓPTICA
<b>1</b>	420	416	544	464	608	576		126166667	1.323
<b>5x10<sup>-1</sup></b>	284	306	352	316	311			78450000	0.858
<b>2.5 x10<sup>-1</sup></b>	202	184	212	203	192			49650000	0.498
<b>1.25 x10<sup>-1</sup></b>	112	129	121	148	156			33300000	0.264
<b>6.25 x10<sup>-2</sup></b>	65	64	55	33	57	65	69	14571428.6	0.137
<b>3.13 x10<sup>-2</sup></b>	52	31	41	58	59	49	53	12250000	0.073
<b>1.56 x10<sup>-2</sup></b>	19	21	32	22	17	28	25	5857142.86	0.035
<b>7.81 x10<sup>-3</sup></b>	16	12	14	8	17	17	13	3464285.71	0.02



**Figura N° 29:** Curva de calibración y fórmula que relaciona la concentración celular con la densidad óptica.

Esta curva ilustró la naturaleza lineal de la relación existente entre la concentración celular y la Densidad Óptica como lo demuestra tanto la línea de tendencia trazada como el valor cercano a 1 del coeficiente de determinación  $R^2$ , por lo que dicha relación puede ser representada en forma de la ecuación presentada en la Figura N°29, la misma que se pudo considerar exclusiva de la cepa evaluada y que sirviera posteriormente para la determinación de la velocidad específica de crecimiento de la cepa y la influencia que las distintas cantidades de aceite de cocina residual presentes en el medio ejerce sobre ella.

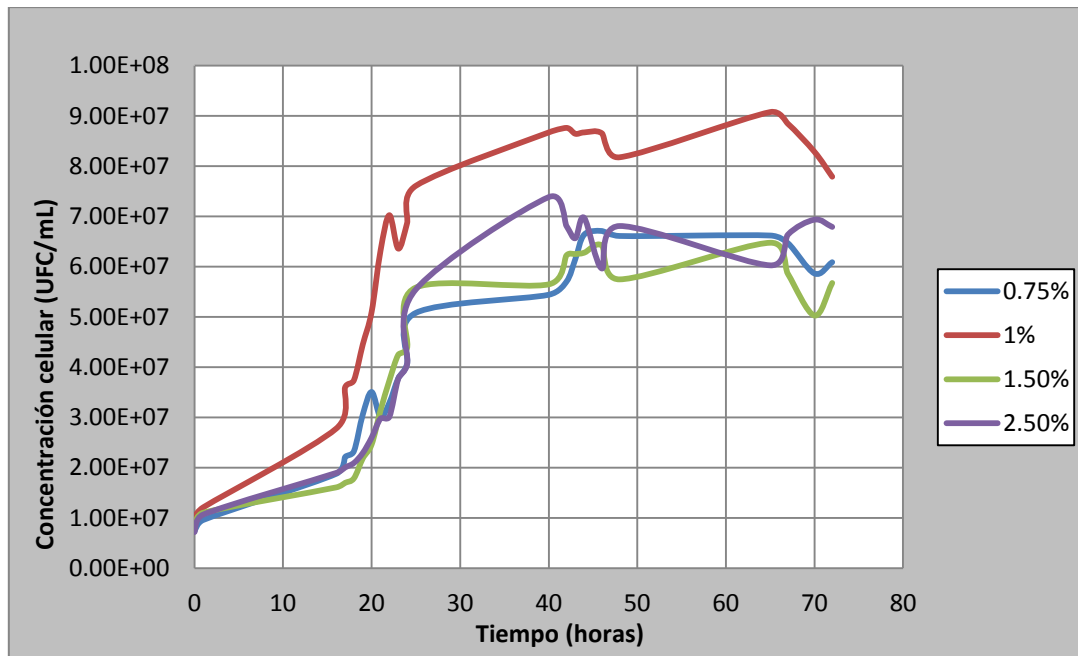
### 3.5.2 Determinación de las curvas de crecimiento y las velocidades específicas de crecimiento

La evaluación de la influencia que ejerce la cantidad de aceite residual sobre la tasa de crecimiento de la cepa fue realizada mediante el cultivo de 5 mL de una suspensión de células microbianas en cuatro volúmenes de 245 mL del medio de cultivo suplementado cada uno con volúmenes distintos de aceite de cocina residual equivalentes al 0.75%, 1%, 1.5% y 2.5% v/v del volumen final del medio como se explicó en el capítulo anterior. Para este procedimiento fue necesario tener un inóculo homogéneo, por lo que se evitó en todo momento la agregación de las células bacterianas mediante el uso del agitador shaker.

**Tabla N° 8:** Concentración celular determinada a partir de los resultados de la lectura de la Densidad Óptica de las muestras tomadas para la creación de las curvas de crecimiento.

TIEMPO (Horas)	DENSIDAD ÓPTICA PROMEDIO				CONCENTRACIÓN CELULAR (UFC/mL)			
	0,75%	1%	1,5%	2,5%	0,75%	1%	1,5%	2,5%
0	0.037	0.07	0.054	0.035	7330000	10300000	8860000	7150000
1	0.062	0.09	0.058	0.074	9580000	12100000	9220000	10660000
16	0.164	0.264	0.135	0.166	18760000	27760000	16060000	18940000
17	0.201	0.355	0.144	0.178	22090000	35950000	16960000	20020000
18	0.214	0.371	0.154	0.188	23260000	37390000	17860000	20920000
19	0.295	0.45	0.198	0.21	30550000	44500000	21820000	22900000
20	0.345	0.522	0.229	0.244	35050000	50980000	24610000	25960000
21	0.29	0.657	0.304	0.286	30100000	63130000	31360000	29740000
22	0.321	0.736	0.37	0.29	32890000	70240000	37300000	30100000
23	0.375	0.662	0.427	0.374	37750000	63580000	42430000	37660000
24	0.407	0.718	0.442	0.406	40630000	68620000	43780000	40540000
25	0.52	0.801	0.576	0.572	50800000	76090000	55840000	55480000
40	0.56	0.919	0.583	0.776	54400000	86710000	56470000	73840000
42	0.589	0.929	0.647	0.712	57010000	87610000	62230000	68080000
43	0.639	0.916	0.65	0.685	61510000	86440000	62500000	65650000
44	0.693	0.919	0.653	0.73	66370000	86710000	62770000	69700000
46	0.701	0.917	0.669	0.618	67090000	86530000	64210000	59620000
48	0.69	0.864	0.594	0.712	66100000	81760000	57460000	68080000
65	0.691	0.964	0.675	0.625	66190000	90760000	64750000	60250000
67	0.674	0.938	0.606	0.693	64660000	88420000	58540000	66370000
70	0.607	0.876	0.514	0.726	58630000	82840000	50260000	69340000
72	0.632	0.821	0.586	0.71	60880000	77890000	56740000	67900000

Los resultados de la lectura de la Densidad Óptica, luego de realizar la toma de muestras a diferentes intervalos de tiempo, y su equivalencia en unidades que expresaran la concentración celular fueron anotados en la Tabla N°8 , los mismo que dieron como resultados las curvas de crecimiento microbiano presentados en las Figuras N°30.



**Figura N° 30:** Curvas de calibración correspondientes a cada uno de los cuatro cultivos evaluados.

De la gráfica anterior se pudo deducir que con los cuatro volúmenes de aceite suplementados al medio de cultivo, la cepa se multiplicó de forma exponencial solo durante las primeras 24 horas como muestran los patrones similares de las cuatro curvas de crecimiento, a partir de ese momento, en general, la cepa entró en una fase estacionaria, la cual mantendría hasta el final del cultivo quizás porque la misma encontró limitación en alguno de los nutrientes relacionado a la producción de biosurfactante como se verá más adelante, o el efecto tóxico de algún sub-producto formado en el medio. Las oscilaciones hacia arriba y hacia abajo mostradas en esta fase quizás se hayan debido al procedimiento utilizado y al que fueron sometidas las muestras.

Cabe resaltar además que la curva proveniente del cultivo con 1% de aceite residual se muestra algo más separada a las curvas obtenidas con 0.75%, 1,5% y 2,5% de suplemento de aceite, esto no es indicativo de que con 1% de aceite residual en el medio promueve una mayor tasa de crecimiento de la cepa, al contrario, el ritmo de crecimiento de la cepa en este medio es el mismo al de los demás como se puede apreciar más abajo en el análisis estadístico realizado a la velocidad específica de crecimiento de cada una de las curvas.

La velocidad específica de crecimiento de cada una de las curvas fue determinada haciendo uso de la siguiente fórmula (2), correspondiente al crecimiento exponencial:

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

Esta fórmula puede ser expresada de la manera (3) de modo que se permita el cálculo directo de la velocidad específica:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu(t - t_0) \quad (3)$$

Dónde:

$x_0$ : número de células en un inicio.

$t_0$ : tiempo inicial.

$x$  : número de células en un determinado tiempo.

$t$ : tiempo final.

$\mu$ : velocidad específica de crecimiento.

En la Tabla N°9 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las curvas haciendo uso de los datos a diferentes intervalos de tiempo:

**Tabla N° 9:** Datos para determinar la velocidad específica de crecimiento promedio de los cuatro cultivos evaluados.

INTERVALOS DE TIEMPO (Horas)	MEDIO SUPLEMENTADO CON:			
	0.75% (h <sup>-1</sup> )	1% (h <sup>-1</sup> )	1.5% (h <sup>-1</sup> )	2.5% (h <sup>-1</sup> )
16-25	0.110685	0.112036	0.138462	0.119416
17-24	0.087055	0.092351	0.135474	0.100794
16-19	0.162546	0.157298	0.102165	0.063287
19-24	0.057028	0.086619	0.139270	0.114230
16-24	0.096597	0.113123	0.125356	0.095127
17-23	0.089310	0.095028	0.152833	0.105311
18-20	0.205020	0.155015	0.160295	0.107926
20-24	0.036933	0.074288	0.144006	0.111433
17-20	0.153884	0.116435	0.124098	0.086608
21-24	0.099994	0.027796	0.111215	0.103265
18-25	0.111594	0.101502	0.162847	0.139331
<b>PROMEDIO (h<sup>-1</sup>)</b>				
	<b>0.1101±0.048</b>	<b>0.1029±0.036</b>	<b>0.1360±0.019</b>	<b>0.10425±0.019</b>

El análisis estadístico de los datos al 95% de confianza mediante un ANOVA mostrado más abajo indicó que no existe diferencia significativa entre las velocidades específicas encontradas bajo las cuatro condiciones como para afirmar que alguna de ellas es diferente debido a la variación en la cantidad de aceite empleada en el medio, esto gracias a que el valor p es mayor al nivel de significancia. Por lo tanto, cualquiera haya sido el volumen de aceite residual que se haya empleado en este trabajo, este

componente no tiene un efecto significativo en la velocidad específica de crecimiento de la bacteria *Bacillus licheniformis*, entonces es posible que la diferencia observada en la curva de crecimiento obtenida en el medio suplementado con 1% de aceite residual radique en emplear una mayor concentración celular en el inóculo para este medio.

**ANOVA unidireccional: 0.75%, 1%, 1.5%, 2.5%**

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

**Hipótesis nula:** Todas las medias son iguales

**Hipótesis alterna:** Por lo menos una media es diferente

**Nivel de significancia**  $\alpha = 0.05$

**Información del factor**

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	0.75%, 1%, 1.5%, 2.5%

**Análisis de Varianza**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	0.007884	0.002628	2.42	<b>0.080</b>
Error	40	0.043445	0.001086		
Total	43	0.051329			

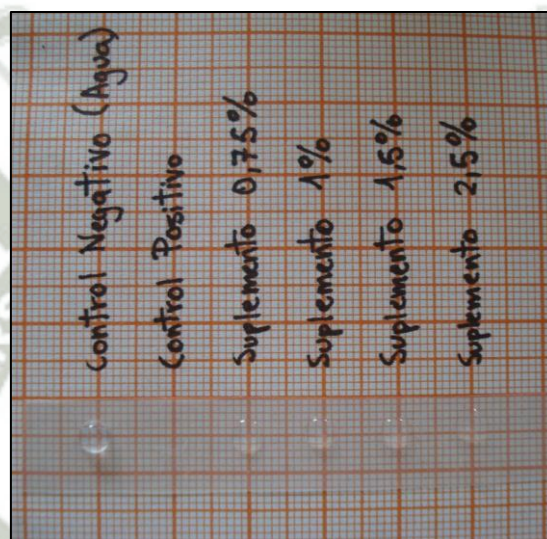
**Resumen del modelo**

S	R-cuad.	R-cuad.(ajustado)	R-cuad.(pred)
0.0329564	15.36%	9.01%	0.00%

Por otro lado, la curva de crecimiento también arrojó otro dato importante relacionado a la producción de biosurfactante, como se dijo en el Capítulo II, las especies de *Bacillus* productoras de biosurfactantes generalmente sintetizan estos compuestos en la fase estacionaria como metabolitos secundarios a consecuencia de la limitación de algún elemento importante en el medio de cultivo generalmente nitrógeno o hierro<sup>36</sup>, afirmación que fue confirmada gracias a la pruebas de detección de biosurfactantes (Prueba de la dispersión del aceite) realizadas a las muestras de caldo de cultivo obtenidas de las 16, 24 y 48 horas, de las cuales, solo para el último de los casos fue positivo para biosurfactantes (Anexo N°2.14), es decir, el caldo de cultivo correspondiente a la fase estacionaria de crecimiento que se da a partir de aproximadamente las 24 horas poseen dentro de sus componentes a moléculas de biosurfactante. El-Sheshtawy et al.<sup>51</sup> reportaron el mismo fenómeno en un trabajo realizado con *B. licheniformis* haciendo uso de petróleo crudo.

Como se mencionó en el capítulo anterior, las muestras del caldo de cultivo correspondientes a las 72 horas tampoco fueron desechadas, por el contrario, fueron sometidas a las pruebas preliminares de detección de biosurfactantes. En la prueba del colapso de la gota, como se observa en las Figuras N°31 y N°32, las gotas provenientes

de los cuatro cultivos mostraron, como era de esperarse, no solo una forma más aplanada en comparación con el control negativo sino también poseían un diámetro y una altura con dimensiones similares, según Tugrul et al.<sup>52</sup> y algunos otros autores, hay una relación directa entre el diámetro de cada gota y la concentración de biosurfactante, por lo que puedo suponer que en todos los cultivos la concentración de este metabolito era semejante. Ahora, al compararlas con el control positivo, la cual casi es imperceptible en la Figura N°32, las muestras de los cuatro cultivos no eran tan planas y a simple vista poseían un diámetro menor al del control positivo; por lo tanto, la concentración de biosurfactante en los cuatro medios de cultivo es baja, es decir, bajo las condiciones planteadas, la cepa llega a producir bajas concentraciones de biosurfactante.



**Figura N° 31:** Resultados de la prueba del colapso de la gota sobre los cuatro cultivos ensayados.



**Figura N° 32:** Vista lateral de la prueba del colapso de la gota de muestras provenientes de los cuatro cultivos evaluados.

En cuanto a la prueba de la dispersión del aceite, como se había indicado en el capítulo II, el diámetro de la zona clara o halo formado gracias a la presencia de biosurfactante está indirectamente relacionado a la actividad superficial del mismo. Las dimensiones de los diámetros de los halos formados por las muestras de cada uno de los cultivos fueron registradas y comparadas con agua como control negativo (Anexo N° 2.13). Los datos encontrados sugirieron que el biosurfactante tiene una fuerte actividad superficial desplazando el compuesto hidrofóbico alrededor de un diámetro promedio de  $3.975 \pm 0.338$  cm en tan solo 30 segundos, es decir, unas 8 veces de lo que se observó en el control negativo (Anexo N°2.12 y N°3.1).

### 3.6 PRODUCCIÓN DEL BIOSURFACTANTE

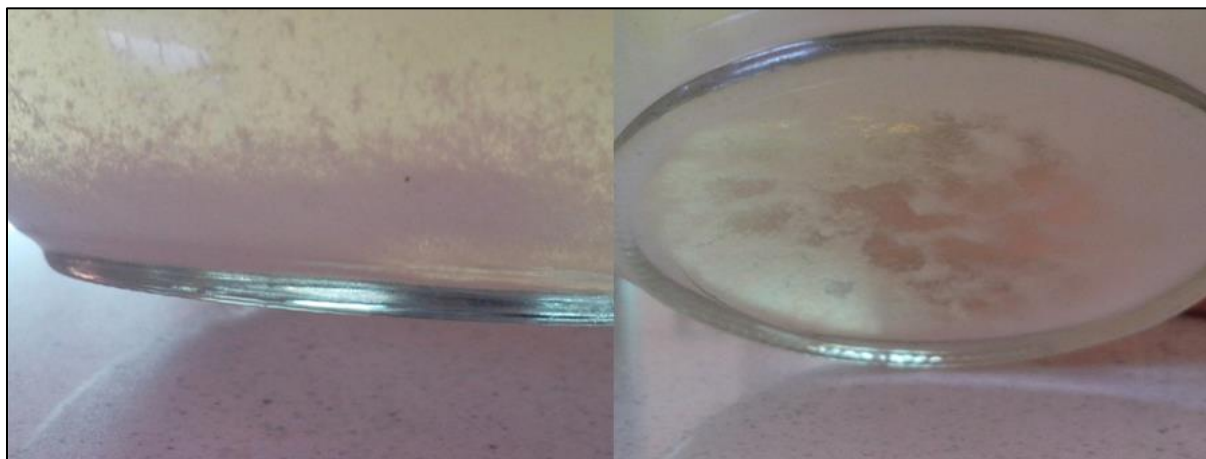
En esta etapa se procuró tener todas las condiciones y componentes del medio de producción totalmente controlados e invariables y que lo único que pueda variar sea la cantidad de aceite empleado en cada uno de los cuatro recipientes (Tabla N°10), por lo que fue necesario tener un inóculo que sea repartido equitativamente entre los cuatro volúmenes de medio mineral suplementado con 4 diferentes volúmenes de aceite, la concentración celular del mismo fue de 16780000UFC/mL hallada gracias a la curva de calibración realizada en un procedimiento anterior.

**Tabla N° 10:** Condiciones volumétricas y físicas que permanecieron invariables durante la etapa de producción de biosurfactante.

CONDICIONES	MEDIO SUPLEMENTADO CON:			
	0.75%	1%	1.5%	2.5%
<b>Volumétricas</b>				
Medio Salino (mL)	445	445	445	445
Inóculo (mL)	5	5	5	5
Suplemento de Aceite (mL)	1.875	2.5	3.75	6.25
Total (mL)	251.875	252.5	253.75	256.25
<b>Físicas</b>				
pH	7.15	7.15	7.15	7.15
Temperatura (°C)	37	37	37	37
Tiempo (horas)	72	72	72	72
Agitación (rpm)	2000	2000	2000	2000

### 3.7 SEPARACIÓN DEL BIOSURFACTANTE

Una vez separada la biomasa del caldo de cultivo mediante centrifugación, este último se acidificó con una solución de HCl 1N hasta bajar el pH a un valor aproximado de 2 (Anexo N°3.2), este procedimiento ha sido ampliamente usado en la etapa de separación de biosurfactantes producidos por miembros del género *Bacillus*, la mayoría de los cuales pertenecen al grupo de los lipopéptidos, naturaleza que probablemente corresponda al biosurfactante producido.



**Figura N° 33:** Biosurfactante precipitado mediante la disminución de pH con ácido clorhídrico.

La disminución del pH acompañada de las bajas temperaturas (4 °C) causó que el biosurfactante presente en el caldo de cultivo adquiriera una carga positiva, suponiendo que este corresponda a uno del tipo lipopéptido, reduciéndose así la efectividad de su región hidrofílica que mantiene soluble al biosurfactante produciéndose de este modo su agregación y por ende su precipitación como un sólido. En la Figura N°33 se puede observar el biosurfactante precipitado de color blanco crema luego de 48 horas y bajo las condiciones anteriormente mencionadas; sin embargo, puede que en el mismo precipitado haya la presencia de otras moléculas de menor tamaño que también se hayan asentado, un evento probable en la producción de biosurfactantes como lo indican Baker et al.<sup>39</sup>, es por este motivo que la precipitación ácida solo fue usada como una etapa de preconcentración del biosurfactante.

### 3.8 RECUPERACIÓN DEL BIOSURFACTANTE

Luego de separar cada uno de los precipitados de los caldos correspondientes a las cuatro diferentes cultivos mediante centrifugación y suspendido en agua destilada, se los sometió a una extracción líquido-líquido con una mezcla de solventes orgánicos en peras de decantación (Anexo 2.18), es este procedimiento el que realmente permitió concentrar el biosurfactante separándolo de aquellos otros componentes que por ciertas circunstancias podrían haber precipitado de la misma manera en el procedimiento anterior. El uso de solventes orgánicos se fundamenta en el hecho de que los biosurfactantes poseen una fracción lipídica, y es bien sabido que cualquier compuesto lipídico es soluble en una infinidad de este tipo de solventes, los cuales permiten su completa extracción. En el caso particular de este trabajo se hizo uso de una mezcla de cloroformo-metanol, solventes que han demostrado ser eficientes en diversos trabajos relacionados. El proceso completo de extracción líquido-líquido que comprendía el uso de un rotavapor dio como resultado la siguiente cantidad de biosurfactante anotados en

la Tabla N°11, la misma en la que los dos ensayos realizados han sido unidos para determinar una cantidad promedio de biosurfactante separado:

**Tabla N° 11:** Resultados de la recuperación de la cantidad de biosurfactante producida en los cuatro cultivos evaluados.

MEDIO	BIOSURFACTANTE (g)	RENDIMIENTO (g/L)
<b>Suplementado con 0.75%</b>	0.105±0.021	0.42±0.085
<b>Suplementado con 1%</b>	0.09±0.014	0.36±0.057
<b>Suplementado con 1.5%</b>	0.08±0.014	0.32±0.057
<b>Suplementado con 2.5%</b>	0.075±0.007	0.3±0.0283

El análisis estadístico de los resultados al 95% de confianza que a continuación se mostrará, indica que no existe diferencia significativa entre las cantidades de biosurfactante producidas en los cuatro medios evaluados, esto es lo que demuestra el valor p el cual es mucho mayor al nivel de significancia. Por lo tanto, se puede decir que la presencia o el uso de diferentes cantidades de aceite residual de cocina en los medios de cultivo no afecta significativamente la cantidad final de biosurfactante que se la cepa pueda producir en las condiciones ofrecidas en este trabajo. Esto concuerda con los datos obtenidos en cuanto a la cinética crecimiento de la cepa, la cual es pareja en los cuatro medios de cultivo.

**ANOVA unidireccional: 0.75%, 1%, 1.5%, 2.5%**

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

**Hipótesis nula:** Todas las medias son iguales

**Hipótesis alterna:** Por lo menos una media es diferente

**Nivel de significancia**  $\alpha = 0.05$

**Información del factor**

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	0.75%, 1%, 1.5%, 2.5%

**Análisis de Varianza**

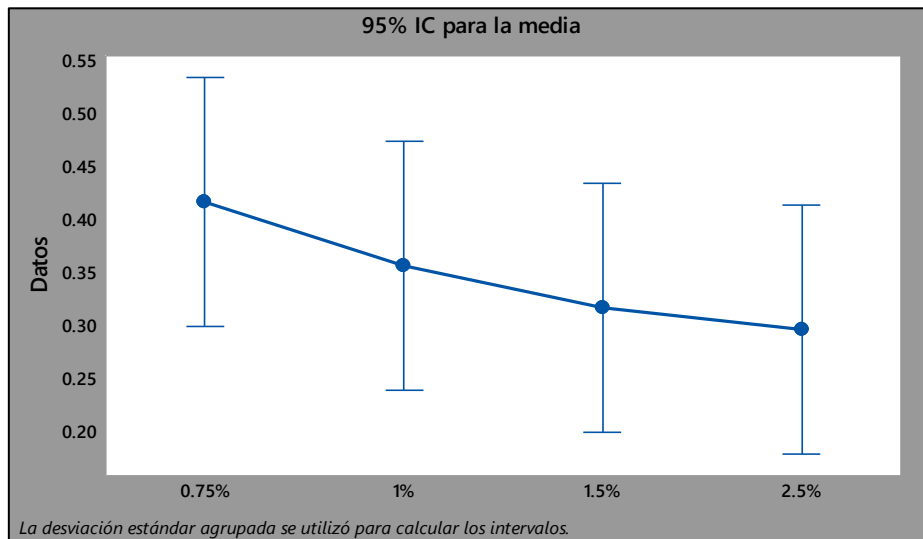
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	0.01680	0.005600	1.56	<b>0.331</b>
Error	4	0.01440	0.003600		
Total	7	0.03120			

**Resumen del modelo**

S	R-cuad.	R-cuad.(ajustado)	R-cuad.(pred)
0.06	53.85%	19.23%	0.00%

Era de esperarse que no hubiera diferencias estadísticas en cuanto a la cantidad de biosurfactantes obtenidos de estos cuatro ensayos pues ya los datos obtenidos de la prueba del colapso de la gota predijeron la escasa cantidad de biosurfactante en los

cuatro medios de cultivo. Por otra parte, la gráfica de intervalos (Figura N°34) que arrojó el programa de análisis estadístico permitió apreciar una cierta tendencia en cuanto a la cantidad de biosurfactante producido con respecto al volumen de aceite empleado en el medio; parece ser que a medida que se aumenta el volumen de aceite la cantidad de biosurfactante que se puede llegar a producir disminuye.



**Figura N° 34:** Gráfica de intervalos de los valores de biosurfactante producido en los cuatro cultivos evaluados y la curva de tendencia que forman dichos intervalos.

Estas cantidades de biosurfactante resultan ser algo inferiores en comparación a aquellos obtenidos por otros autores, quienes haciendo uso de medios con composición distinta y con la misma especie bacteriana obtuvieron casi tres veces lo que en el presente trabajo se logró. Dewaliya y Jasodani<sup>53</sup>, por ejemplo, en su trabajo obtuvieron 1,2 g/L de biosurfactante, por otra parte, El-Sheshtawy et al.<sup>51</sup> lograron obtener una cantidad similar, 1 g/L de biosurfactante, finalmente Coronel et al.<sup>54</sup> lograron producir 0.86 g/L de biosurfactante. La poca cantidad de biosurfactante obtenido quizás se haya debido a la misma naturaleza del aceite residual, el cual, según algunos autores, no es una fuente de carbono útil para las especies de *Bacillus*, sin embargo, con lo conseguido en esta parte del trabajo, esta idea puede no ser cierta, siendo el aceite residual de cocina un compuesto que de todas maneras promueve la síntesis de biosurfactantes con una alta actividad superficial a pesar de que este sea producido en cantidades ínfimas; por tal motivo, el uso de aceite residual de cocina para la producción de biosurfactantes empleando la especie *B. licheniformis* solo es una buena alternativa si se busca producir un biosurfactante con una alta actividad superficial; sin embargo, no es del todo buena si el objetivo es producir este metabolito a gran escala.

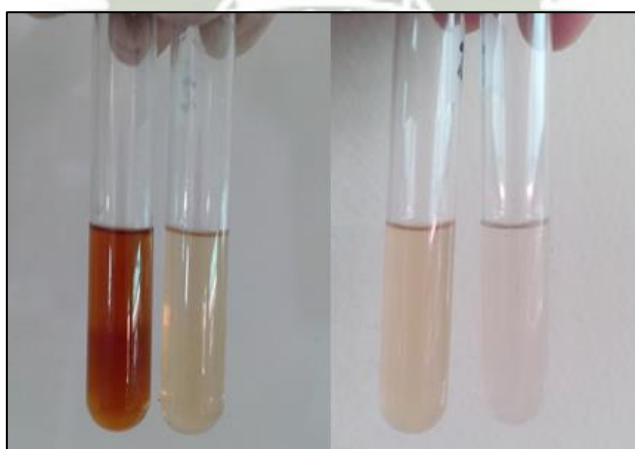
### 3.9 DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO $Y_{p/x}$

Como se había indicado, los pellets de biomasa separados del caldo de cultivo no fueron desechados y por el contrario, fueron depositados en cuatro placas Petri previamente pesadas y rotuladas con cada uno de los ensayos realizados (Anexo 2.21). Luego de dejar que la biomasa se seque a 50°C se realizó un nuevo proceso de pesado para la obtención del peso seco de la biomasa, el cual junto con los resultados de las cantidades de biosurfactante obtenido permitió calcular el coeficiente de rendimiento de producción de biosurfactante en base a la biomasa seca  $Y_{p/x}$  (Anexo N°3.4). El rendimiento obtenido en gramos de biosurfactante por peso seco de biomasa fue de  $0.8045 \pm 0.1348$ , este resultado al ser comparado con aquellos reportados por otros investigadores en sus respectivos trabajos relacionados a la producción de biosurfactantes, resultó ser algo mucho mayor, eso sí, tomando en cuenta que dichos autores emplearon cepas relacionadas con la evaluada en el presente trabajo y bajo otro tipo de condiciones, por ejemplo Suwansukho et al.<sup>55</sup>, Vaz et al.<sup>56</sup> y Souza et al.<sup>57</sup> emplearon cepas de *Bacillus subtilis* para producir biosurfactantes obteniendo rendimientos  $Y_{p/x}$  de 0.1, 0.2 y 0.23 respectivamente. Esto hace pensar que, quizás, bajo las condiciones de cultivo planteadas en el presente trabajo el rendimiento de producción de biosurfactante con respecto a la biomasa ha sido aumentada, es decir, que se ha logrado que una menor cantidad de biomasa sea capaz de producir una mayor cantidad de biosurfactante.

### 3.10 CARACTERIZACIÓN DEL BIOSURFACTANTE

#### 3.10.1 Determinación de la naturaleza del biosurfactante

Tres simples pruebas fueron usadas para determinar la naturaleza química del biosurfactante separado en el procedimiento anterior, para ello se procedió a realizar la dilución de una muestra en agua destilada.



**Figura N° 35:** Resultado de la prueba de fenol-ácido sulfúrico. A la izquierda, solución de biosurfactante comparada con el control

positivo. A la derecha solución de biosurfactante comparada con el control negativo.

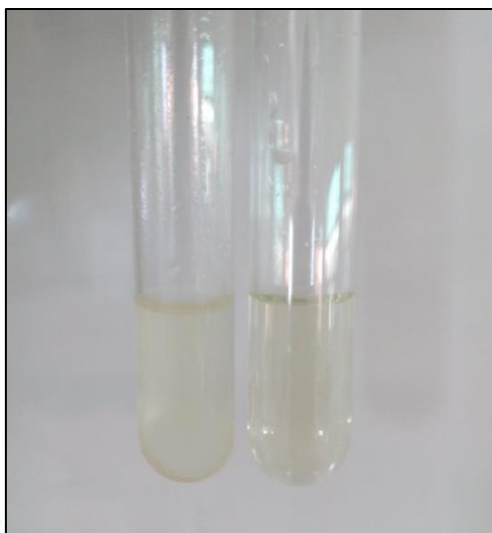
La primera de ellas correspondió a la prueba cualitativa del fenol-ácido sulfúrico para determinar si el biosurfactante pertenecía al grupo de los glicolípidos. El resultado de esta prueba fue negativo debido a que, como se puede apreciar en la Figura N°35, tanto la muestra evaluada como el control negativo mostraban un color similar, un naranja muy ligero que, a comparación del control positivo que mostró un color ladrillo, era de una intensidad muy ligera.

El segundo ensayo realizado corresponde el de Biuret, también una prueba cualitativa que permitía determinar si el biosurfactante purificado correspondía al grupo de los lipopéptidos. Como se observa en la Figura N°36, el resultado de esta prueba fue positivo pues al mezclar la muestra ensayada con el reactivo de Biuret, la mixtura tomó un color violeta correspondiente a la presencia de algún tipo de aminoácido en su composición, en este ensayo solo se usó un control negativo correspondiente precisamente al mismo reactivo de Biuret con el cual se contrastó la muestra ensayada. Este resultado concuerda con lo que se expresa en la bibliografía, los biosurfactantes producidos por especies del género *Bacillus* son de naturaleza lipopeptídica (Tabla N°2).



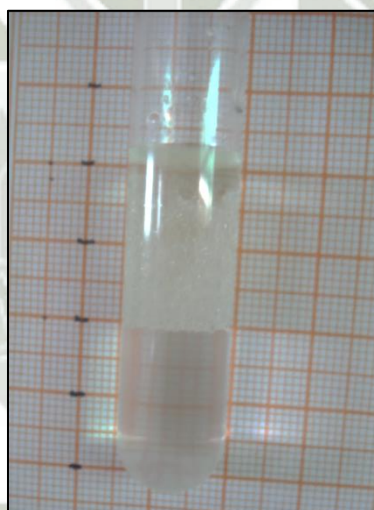
**Figura N° 36:** Resultado de la prueba de Biuret. Nótese la solución de biosurfactante positiva para esta prueba comparada con el control negativo.

Finalmente se realizó un ensayo cualitativo más correspondiente a la prueba de determinación de fosfatos, el cual permitió descartar que el biosurfactante producido era un fosfolípido. El resultado obtenido, como era de esperarse, fue negativo pues ningún tipo de precipitado amarillo fue observado en la muestra ensayada, observándose en ella las mismas características presentes en un control negativo (Figura N°37).



**Figura N° 37:** Resultado de la prueba de determinación de fosfatos. Nótese la solución de biosurfactante negativa para esta prueba comparada con el control negativo.

### 3.10.1 Determinación del índice de emulsificación



**Figura N° 38:** Resultado de la determinación del índice de emulsión luego de 24 horas.

Por otro lado se procedió a determinar el índice de emulsificación del biosurfactante aislado; este método es usado generalmente para medir la capacidad emulsionante de un biosurfactante. Teniendo en cuenta que dilución que se hizo del biosurfactante aislado fue en agua, correspondía emplear un compuesto hidrofóbico para la creación de una emulsión, se optó por usar aceite vegetal ya que este es de acceso rápido. El índice de Emulsificación se calculó luego de 24 horas mediante la ecuación (4) después de una mezcla vigorosa de ambas fases inmiscibles:

$$EI_{24} = \frac{H_{emulsión}}{H_{total}} \times 100\% \quad (4)$$

Donde:

$H_{\text{emulsión}}$ : Altura alcanzada por la Emulsión.

$H_{\text{total}}$ : Altura total alcanzada por la mezcla de fases.

El resultado obtenido para la dilución de biosurfactante mostró un índice de emulsificación de 41% tomando en cuenta que la altura de la emulsión fue de 16 mm y la altura total de 40 mm como se observa en la Figura N°38, esto quiere decir que el biosurfactante producido por la cepa aislada en este trabajo es capaz de formar emulsiones estables luego de 24 horas, las mismas que muestran un tamaño medio observable a simple vista, por lo que el biosurfactante aislado también puede ser considerado como un emulsionante. Según Walter et al.<sup>16</sup> el índice de emulsificación se correlaciona con la concentración de biosurfactante presente en la mezcla de fases; por lo que, a mayor concentración de biosurfactante mayor será la emulsión formada. En el presente trabajo se diluyó en 250 mL el biosurfactante aislado de uno de los ensayos, por lo que la concentración empleada en esta prueba fue de 0.32 g/L, esto quiere decir que, solo bastan pequeñas concentraciones de este biosurfactante para poder producir emulsiones estables pero se necesita una mayor cantidad del mismo para obtener una emulsión completa.



## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES

PRIMERA: Se evaluó la producción de biosurfactantes por parte de una cepa nativa a partir de aceite residual de cocina haciendo uso de cuatro volúmenes distintos de este equivalentes al 0.75%, 1%, 1.5% y 2.5% del volumen total del medio, encontrándose que el aceite residual de cocina si promueve la síntesis de biosurfactantes, aunque este aceite no podría ser una buena alternativa como fuente de carbono para la producción de biosurfactantes, al menos con la cepa nativa empleada en el presente trabajo.

SEGUNDA: Se logró aislar y caracterizar una cepa perteneciente a la especie *Bacillus licheniformis* entre una gran variedad de otros microorganismos en un suelo contaminado con hidrocarburos, conociéndose de esta forma que los hidrocarburos que llegan a contaminar los suelos no inhiben el desarrollo y proliferación de una variedad de microorganismos.

TERCERA: Se determinó que la cepa aislada si era capaz de producir biosurfactantes mediante las pruebas del colapso de la gota y de dispersión del aceite, a las cuales dio positiva bajo condiciones consideradas como adecuadas para la producción de biosurfactantes, las cuales incluyeron un medio salino de pH neutro con los todos los iones implicados en la producción de este metabolito, una temperatura de incubación de 37°C durante 72 horas y una agitación del medio a 2000rpm de manera tal que se lograra aumentar el área de contacto del aceite con las células y la dispersión homogénea de estas últimas en el medio.

CUARTA: Se determinó estadísticamente que las diferentes cantidades de aceite residual de cocina suplementados al medio de producción no afecta de manera significativa la velocidad específica de crecimiento de la cepa evaluada, la cual mostró un promedio general de  $0.1133 \text{ h}^{-1}$ , por lo que la cepa creció al mismo ritmo durante las 72 horas de cultivo como se observó en las curvas de crecimiento halladas. Se observó además que el biosurfactante era un metabolito secundario que se produjo en la fase estacionaria del crecimiento, esto supone que en el medio existe algún otro componente más que es que se agota antes del inicio de la producción.

QUINTA: Se conoció que la cepa aislada fue capaz de producir cantidades promedio de 0.42 g/L, 0.36g/L, 0.32g/L y 0.3 g/L de biosurfactante en los cuatro cultivos evaluados, estas cantidades son estadísticamente iguales para dichos cultivos, aunque resultaron ser muy pequeñas en comparación a otros trabajos realizados con la misma especie. Se apreció además que el rendimiento promedio  $Y_{p/x}$  fue de 0.8045, indicando que, bajo las condiciones establecidas, poca cantidad de biomasa es capaz de producir una mayor cantidad de biosurfactantes en comparación a lo encontrado en otros trabajos.

SEXTA: Se determinó que el biosurfactante producido era un lipopéptido de acuerdo a los ensayos químicos realizados a soluciones de la molécula, esto corresponde con lo encontrado en la bibliografía donde especies de *Bacillus* se caracterizan por producir este tipo de biosurfactantes. Además, se ha encontrado que el biosurfactante producido tiene una alta actividad superficial y es capaz de formar una emulsión estable de agua y aceite vegetal por al menos 24 horas a una concentración de 0.32g/L.



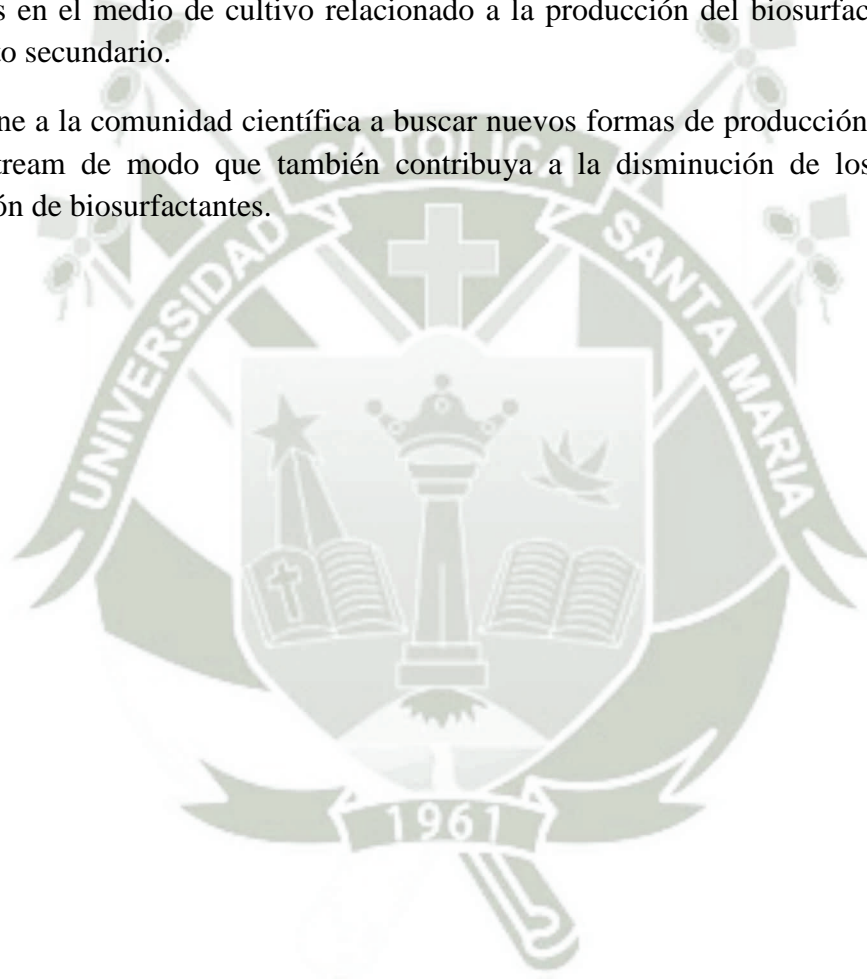
## RECOMENDACIONES

Se incentiva a las personas interesadas en el tema a poner más atención a los suelos contaminados donde cabe la posibilidad de encontrar otros microorganismos, los cuales tengan un potencial mayor en la producción de biosurfactantes y otro tipo de metabolitos.

Se sugiere seguir buscando otras fuentes de carbono que sea más compatible con cepas de *Bacillus licheniformis* de modo que se puede elevar la cantidad de biosurfactante que puede producir.

Se recomienda realizar más investigación sobre aquel o aquellos componentes limitantes en el medio de cultivo relacionado a la producción del biosurfactante como metabolito secundario.

Se propone a la comunidad científica a buscar nuevas formas de producción y procesos de downstream de modo que también contribuya a la disminución de los costos de producción de biosurfactantes.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Souza E.C., Vessoni T.C. y Pinheiro R. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2014;89: 88-94.
2. Yañez G. y Wong A. Biosurfactantes microbianos, producción potencial con residuos agroindustriales de Chiapas. *Biotecnología*. 2013; 17(3): 12-28.
3. Bezza F.A. y Nkhalambayausi E.M. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis*. *Biochemical Engineering Journal*. 2015; 101: 168–178.
4. Ward O.P. Microbial biosurfactant and biodegradation. En: Sen R., editor. *Advances in Experimental Medicine and Biology Volumen 672: Biosurfactants*. 2010; pp.65-74.
5. Nitschke M. y Costa S. Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science and Technology*. 2007; 18: 252-259.
6. Fiechter A. Biosurfactants: Moving towards industrial application. *Trends in Food Science and Technology*. 1992; 3: 286-293.
7. Jiménez D., Medina S.A. y Gracida J.M. Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2010; 26(1): 65-84.
8. Siñeriz F., Hommel R.K. y Kleber H.P. Production of biosurfactants. *Biotechnology*. 2004; 5: 97-122.
9. Soberón G. y Maier R.M. Biosurfactants: A General overview En: Soberón G. *Biosurfactants: From Genes to Applications*. 2010; pp.1-13.
10. Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H. y Whitman W. *Bergey's Manual of systematic bacteriology, Second Edition. Volume 3: The Firmicutes*. 2011; pp. 21-128.
11. Slepecky R.A. y Hemphill H.E. The Genus *Bacillus*-Nonmedical En: Balows A., Trüper H.G., Drowkin M., Tno W.H. y Schleifer K.H. *The Prokaryotes*. 2006; 4: 530-562.
12. Joshi S.J., Suthar H., Yadav A.K., Hingurao K. y Nerurkar A. Occurrence of biosurfactant producing *Bacillus spp.* in diverse habitats. *ISRN Biotechnology*. 2012; Vol 2013, pp.1-6.

13. Satpute S.K., Bhuyan S.S., Pardesi K.R., Mujumdar S.S., Dhakephalkar P.K., Shete A.M. y Chopade B.A. Molecular Genetics of Biosurfactant Synthesis in Microorganisms. En: Sen R., editor. *Advances in Experimental Medicine and Biology* Volumen 672: Biosurfactants. 2010; pp.14-41.
14. Syltatk C. y Wagner F. Production of biosurfactants. En: Kosaric N., Cairns W.L., Gray N.C.C., editores. *Biosurfactants and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker, Inc. 1987; pp.89-120.
15. Leman J. Applied microbiology: Industrial/Lipids, Production En: Schaechter M., editor. *Encyclopedia of Microbiology Third Edition*. 2009; 1: 393-406.
16. Cortés A., Troconis I.G. y Jaramillo M.A. Surfactantes biológicos con aplicación potencial en tecnología de alimentos: una revisión. *Biológicas*. 2013; 15(1): 16-23.
17. Walter V., Syltatk C. y Hausmann R. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. En: Sen R., editor. *Advances in Experimental Medicine and Biology* Volumen 672: Biosurfactants. 2010; pp.1-13.
18. Cooper D. Biosurfactants. *Microbiological Science*. 1986; 3(5):145-149.
19. Jain D, Collins-Thompson D, Lee H y Trevors J.T. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. 1991; 13(4):271-279.
20. Morikawa M, Hirata Y, Imanaka T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular and cell Biology of Lipids*. 2000; 1488(3):211-218.
21. Vaux D y Cottingham M. Method and apparatus for measuring surface configuration. Patent number WO 2007/039729 A1, 2001.
22. Rosenberg M., Gutnick D. y Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons-a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*. 1980; 9(1):29-33.
23. Siegmund I. y Wagner F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Techniques*. 1991; 5(4):265-268.
24. Khire J. M. Bacterial Biosurfactants, and their role in microbial enhanced oil recovery (MEOR). En: Sen R., editor. *Advances in Experimental Medicine and Biology* Volumen 672: Biosurfactants. 2010; pp.146-157.

25. Burgos C. Biotensoactivos producidos por *Sphingobacterium detergens* sp. nov.: Producción, caracterización y propiedades. Tesis (Doctor en Biotecnología). Barcelona, España. Universitat de Barcelona, Facultat de Farmacia, 2012.
26. Cameotra S.S., Makkar R.S., Kaur J. y Mehta S.K. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. En: Sen R., editor. Advances in Experimental Medicine and Biology Volumen 672: Biosurfactants. 2010; pp.261-280.
27. Desai J.D. y Desai A.J. Production of biosurfactants En: Kosaric N. ,editor. Biosurfactants: Production, Properties, Applications. 1993; pp.66-97.
28. Mukherjee A.K. y Das K. Microbial surfactants and their potential applications: An overview. En: Sen R., editor. Advances in Experimental Medicine and Biology Volumen 672: Biosurfactants. 2010; pp.54-64.
29. Geys R., Soetaert W. y Van Bogaert I. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. Current Opinion in Biotechnology. 2014; 30: 66–72.
30. Mehta S.K., Sharma S., Mehta N. y Cameotra S.S. Biomimetic amphiphiles: Properties and potential use. En: Sen R., editor. Advances in Experimental Medicine and Biology Volumen 672: Biosurfactants. 2010; pp.102-120.
31. Nerurkar A.S. Structural and molecular characteristics of lichenysin and its relationship with surface activity. En: Sen R., editor. Advances in Experimental Medicine and Biology Volumen 672: Biosurfactants pp. 2010; pp.304-315.
32. Banat I.M., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M.G., Fracchia L., Smyth T.J. y Marchant R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Applied Microbiology and Biotechnology. 2010; 87(2): 427–444.
33. Shoeb E., Akhlaq F., Badar U., Akhter J. y Imtiaz S. Classification and industrial applications of biosurfactants. Academic Research International. 2013; 4(3).
34. Rodrigues L.R. y Teixeira J.A. Biomedical and Therapeutic Applications of Biosurfactants. En: Sen R., editor. Advances in Experimental Medicine and Biology Volumen 672: Biosurfactants. 2010; pp.75-87.
35. Sachdev D.P. y Cameotra S.S. Biosurfactants in agriculture. Applied Microbiology and Biotechnology. 2013; 97:1005–1016.
36. Joshi S.J. y Desai A.J. Biosurfactant's role in bioremediation of NAPL and fermentative production. En: Sen R., editor. Advances in Experimental Medicine and Biology Volumen 672: Biosurfactants pp. 2010; pp. 222-235.

37. Sekhon K.K. Biosurfactants produced by genetically manipulated microorganisms: Challenges and opportunities. En: Kosaric N., Sukan F.V., editores. Biosurfactants: Production and Utilization-Processes, Technologies and Economics. 2014; pp. 49-67.
38. Beuker J., Sylatk C. y Hausmann R. Bioreactors for the production of biosurfactants En: Kosaric N., Sukan F.V., editores. Biosurfactants: Production and Utilization-Processes, Technologies and Economics. 2014; pp.117-127.
39. Baker S.C. y Chen C.Y. Enrichment and purification of lipopeptide biosurfactants. En: Sen R., editor. Advances in Experimental Medicine and Biology Volumen 672: Biosurfactants. 2010; pp.281-288.
40. Lan G., Fan Q., Liu Y., Chen C., Li G., Liu Yu y Yin X. Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4. Biochemical Engineering Journal. 2015; 101: 44-54.
41. Shah V., Jurjevic M. y Badia D. Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production. Biotechnology Progress. 2007; 23: 512-515.
42. Gómez M., Velázquez L., Barragán R.G. y Malagón D. Obtención y caracterización de un biosurfactante sintetizado por *Pseudomonas sp.* usando aceite de cocina como sustrato. Intekhnia. 2012; 7(2): 133-141.
43. Sadouk Z, Hacene H y Tazerouti A. Biosurfactants production from low cost substrate and degradation of diesel oil by a *Rhodococcus* strain. Oil and Gas Science and Technology-Revue d'IFP Energies nouvelles. 2008; Vol. 63(6): 747-753.
44. De Lima C., Ribeiro E., Sérvulo E., Resende M. y Cardoso V. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* grown in residual soybean oil. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2009; 152: 156-168.
45. Leahy J.G. y Colwell R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews. 1990; 54(3): 305-315.
46. Zhang X., Xu D., Zhu C., Lundaa T. y Scherr K.E. Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains. Chemical Engineering Journal. 2012; 209: 138-146.
47. Vaseekaran S., Balakumar S. y Arasaratnam V. Isolation and identification of a bacterial strain producing thermostable  $\alpha$ - Amylase. Tropical Agricultural Research. 2010; 22 (1): 1-11.

48. Sifour M., Ouled-Haddar H. y Aziz G.M. Production of biosurfactants from two *Bacillus* species. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 2005; 31: 142-148.
49. Chen W.C., Juang R.S. y Wei Y.H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*. 2015; 103: 158–169.
50. Pornsunthorntawe O., Arttaweeporn N., Paisanjit S., Somboonthanate P., Abe M., Rujiravanit R. y Chavadej S. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. *Biochemical Engineering Journal*. 2008; 42: 172–179.
51. El-Sheshtawy H.S., Aiad I., Osman M.E., Abo-Elnasr A.A. y Kobisy A.S. Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. *Egyptian Journal of Petroleum*. 2015; 24: 155-162.
52. Tugrul T. y Cansunar E. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2005; 21: 851-853.
53. Dewaliya V. y Jasodani R. Isolation and identification of *Bacillus licheniformis* for biosurfactant production. *CIBTech Journal of Microbiology*. 2013; 2(4): 14-19.
54. Coronel J., De Grau G., Grau A., Farfán M., Rabanal F., Manresa A. y Marqués A.M. Biosurfactant production by AL 1.1,a *Bacillus licheniformis* strain isolated from Antarctica: production, chemical characterization and properties. *Annals of Microbiology*. 2015; 65: 2065-2078.
55. Suwansukho P., Rukachisirikul V., Kawai F. y Kittikun A.H. Production and applications of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*. 2008; 30: 87-93.
56. Vaz D.A., Gudiña E.J., Jurado E., Teixeira J.A. y Rodrigues L.R. Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012; 89: 167-174.
57. Sousa M., Dantas I.T, Feitosa F.X., Alencar A.E., Soares S.A., Melo V.M., Gonçalves L.R. y Santana H.B. Performance of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LAMI005 on the formation of oil / biosurfactant /water emulsion: study of the phase behaviour of emulsified systems. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2014; Vol. 31,3: 613-623.

58. Acharya S. y Chaudhary A. Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus sp.* MVS3 isolated from Indian hot spring .Brazilian Archives of Biology and Technology. 2012; 55(4): 497-503.
59. Turnbull P.C.B. Chapter 15 Bacillus En: Baron S, editor. Medical Microbiology, Fourth Edition. Texas, University of Texas Medical Branch at Galveston.1996.
60. MacFaddin J.F. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica Tercera Edición. 2003; p.472.

**Webgrafía:**

61. [https://www.uiweb.uidaho.edu/micro\\_biology/250/IDFlowcharts.pdf](https://www.uiweb.uidaho.edu/micro_biology/250/IDFlowcharts.pdf)

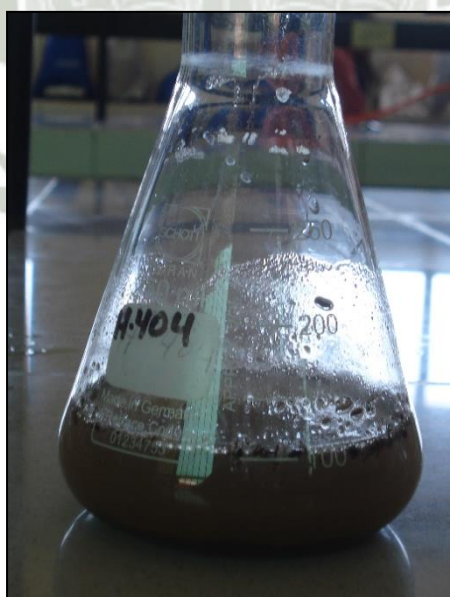


## ANEXOS

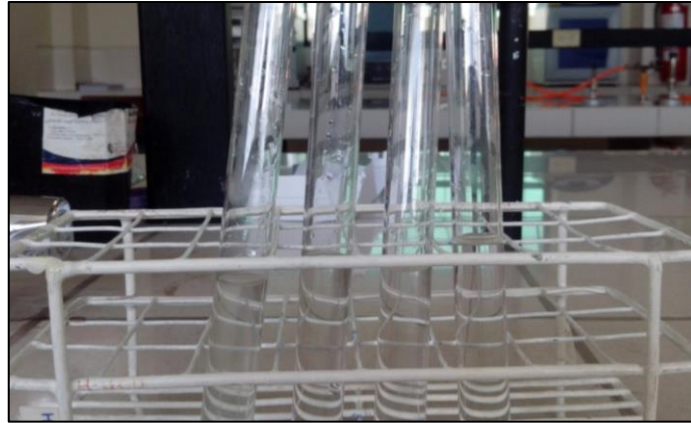
### ANEXO N°1: UBICACIÓN DE LA ESTACIÓN DE SERVICIOS SAN PEDRO EN EL DISTRITO DE YANAHUARA, DONDE SE RECOLECTÓ LA MUESTRA DE TIERRA DEL SECTOR TERROSO DEL MISMO.



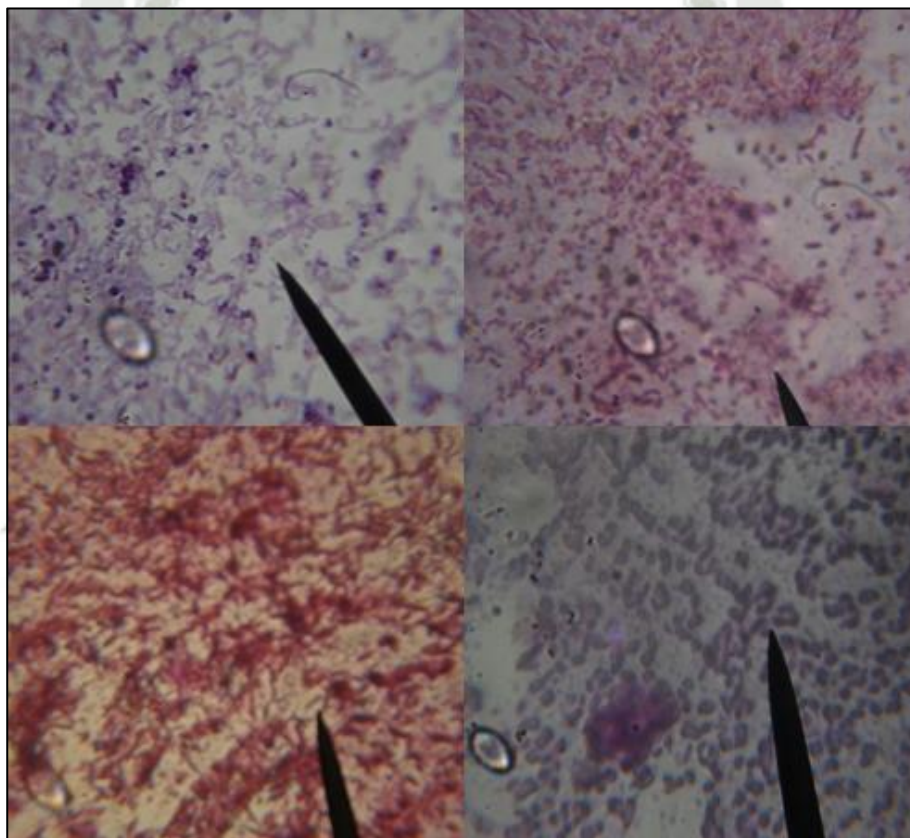
### ANEXO N°2: REGISTRO FOTOGRÁFICO DE LOS PROCEDIMIENTOS EMPLEADOS Y LOS RESULTADOS OBTENIDOS



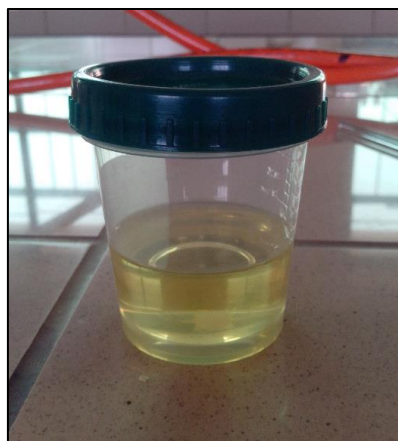
2. 1: Dilución de 10 g de tierra en agua destilada estéril.



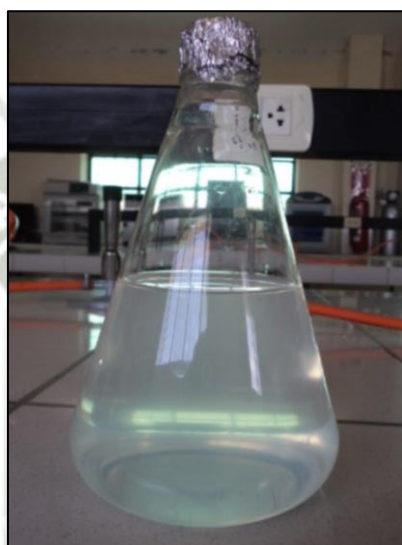
**2. 2** Diluciones seriadas realizada a la muestra de tierra contaminada con hidrocarburos.



**2. 3** Algunos resultados de la tinción de Gram realizada sobre frotis de las colonias seleccionas. Se puede apreciar bacterias gram positivas y negativas de distintas formas y tamaños.



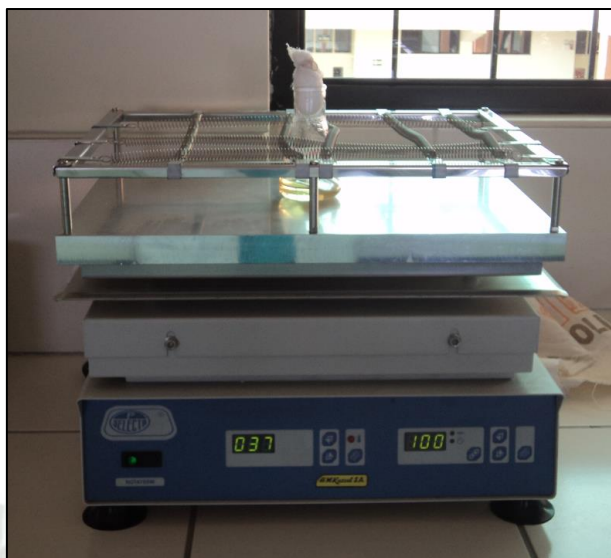
2. 4 Aceite residual de cocina libre de impurezas, luego de ser filtrado.



2. 5 Medio salino para la producción de biosurfactantes.



2. 6 Medios de cultivo colocados en recipientes y suplementados con su respectivo volumen de aceite residual de cocina.



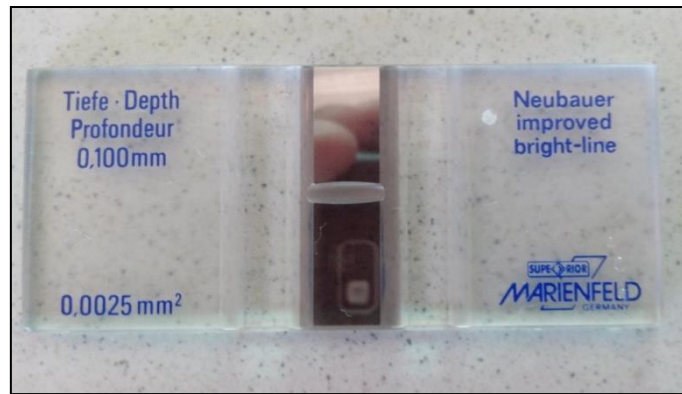
2. 7 Cultivo del inóculo en shaker.



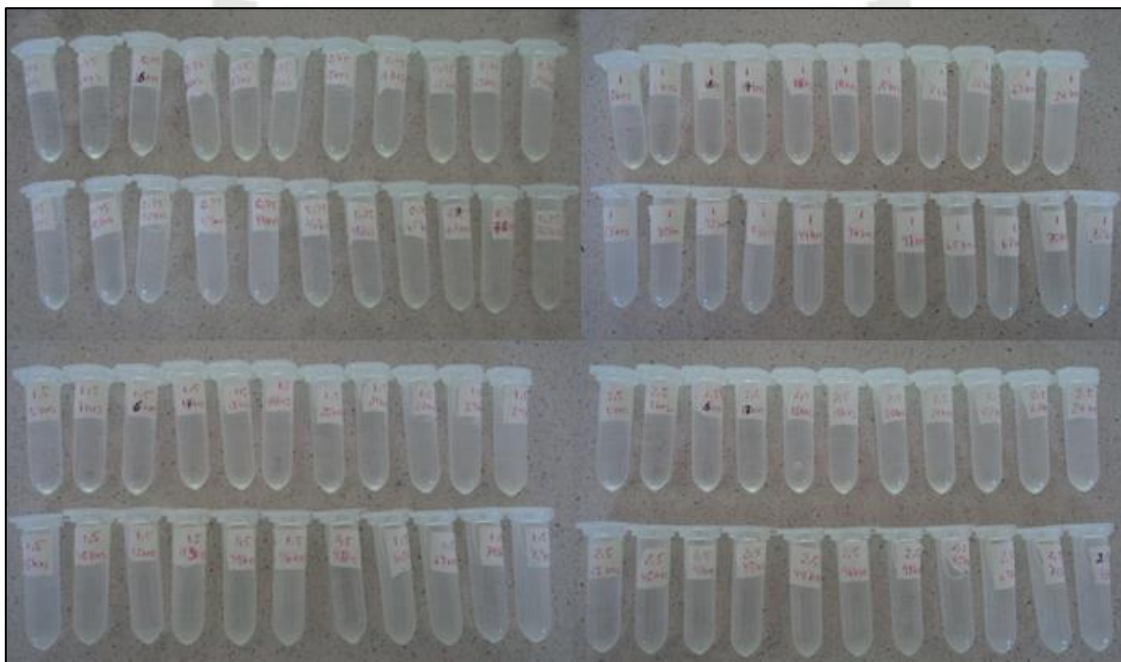
2. 8 Inóculo



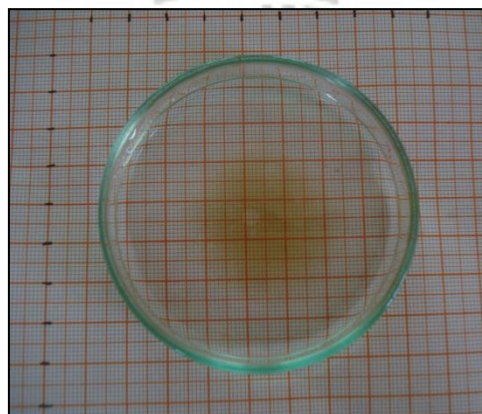
2. 9 Recipientes de cultivo con su sistema de agitación acoplado a ellos en pleno funcionamiento.



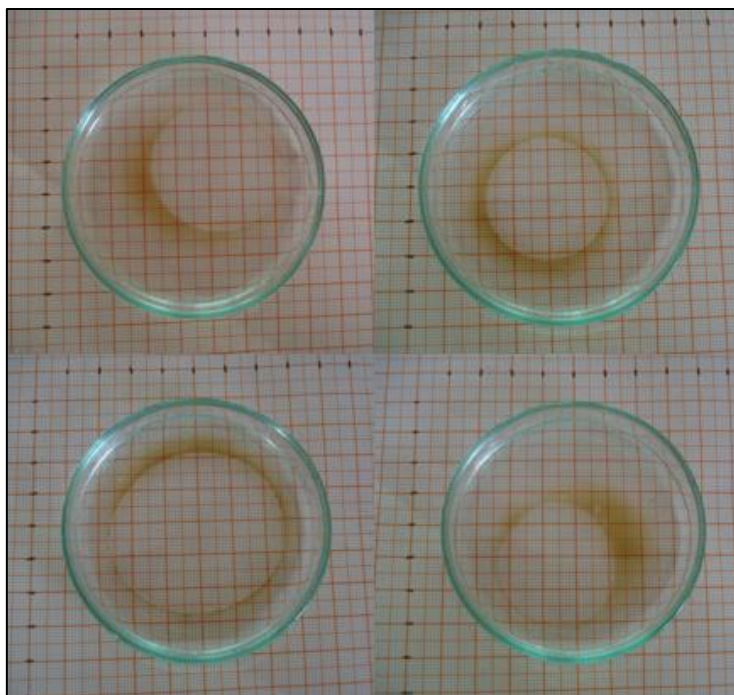
2. 10 Cámara de Neubauer utilizada para el conteo celular.



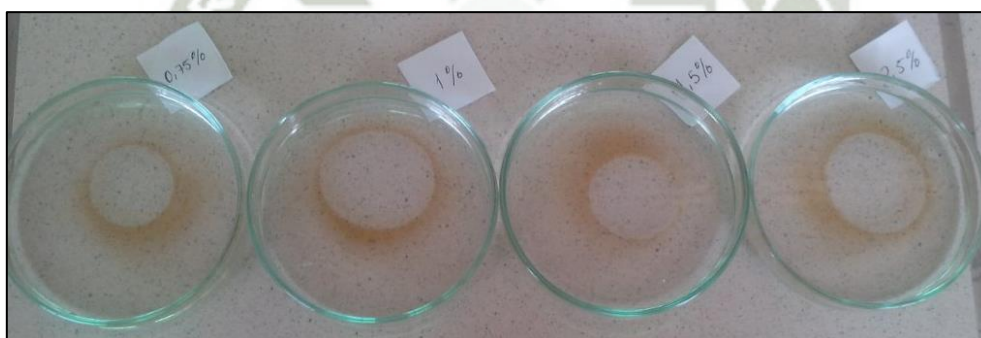
2. 11 Muestras de la biomasa tomadas de los cuatro cultivos para la determinación de la curva de crecimiento y la posterior determinación de la velocidad específica de crecimiento.



2. 12 Control negativo en la prueba de la dispersión del aceite usando una gota de agua.



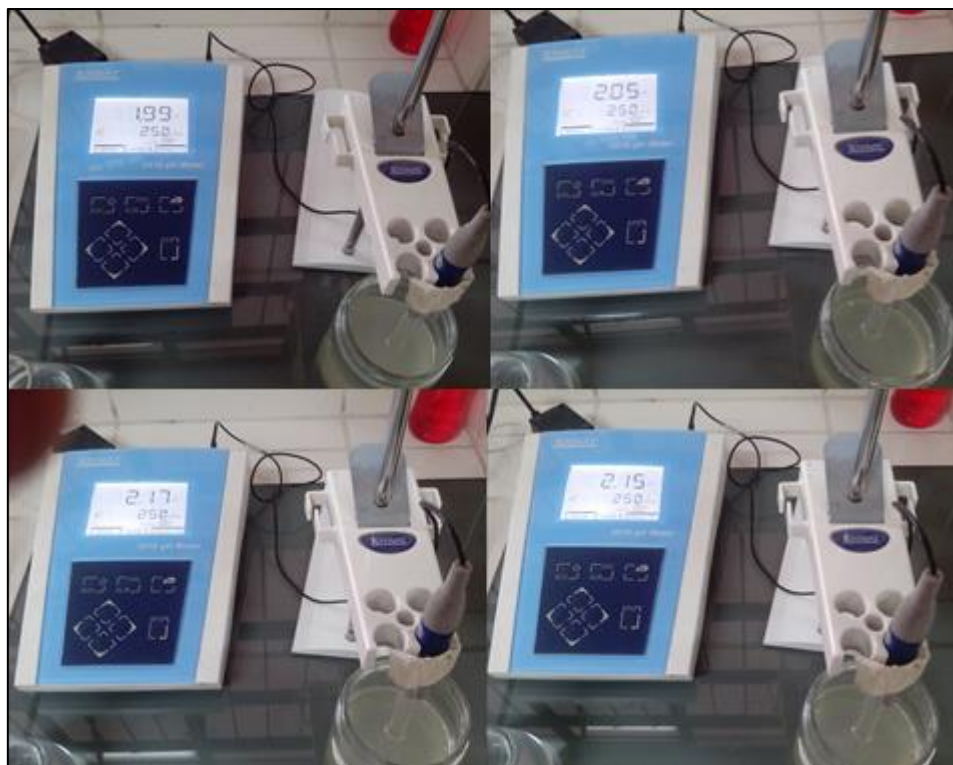
**2. 13** Resultados de la prueba de la dispersión del aceite realizada a muestras provenientes de las 72 horas de cultivo y de las cuales se midió su diámetro.



**2. 14** Prueba de la dispersión del aceite realizada a muestras obtenidas a las 48 horas de cultivo mostrando la presencia de biosurfactante en el caldo de cultivo.



**2. 15** Biomasa en forma de pellets separada del caldo de cultivo posteriormente usada para la determinación del coeficiente  $Y_{p/x}$ .



**2. 16** Proceso de acidificación de los caldos de cultivo en el segundo ensayo con la ayuda de un potenciómetro.



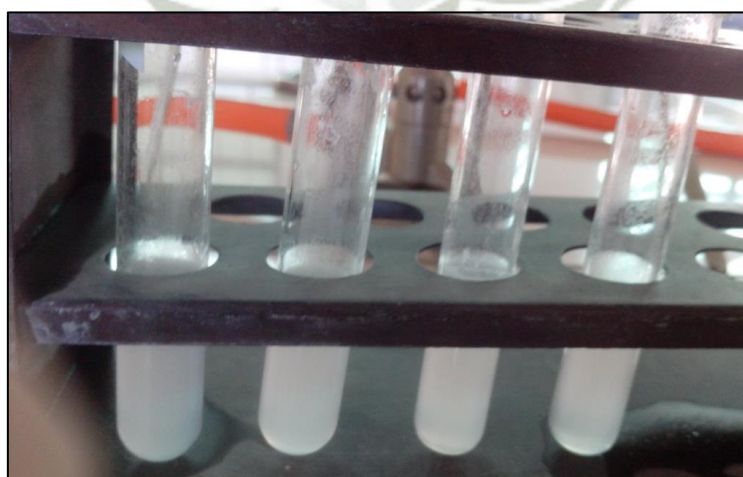
**2. 17** Pellet de biosurfactante precipitado mediante centrifugación luego de la acidificación del caldo.



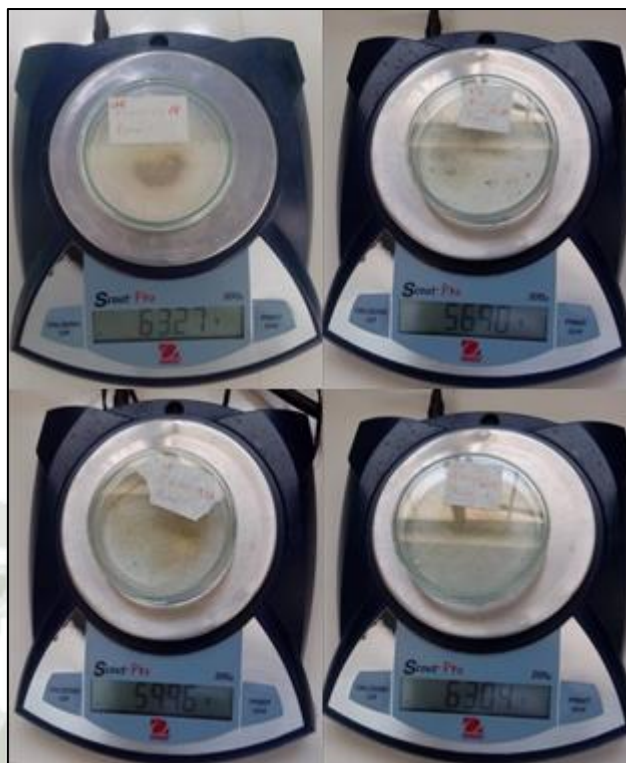
**2. 18** Extracción líquido-líquido del biosurfactante mediante una mezcla de cloroformo-metanol.



**2. 19** Viales con biosurfactante seco correspondientes a los cuatro medios evaluados en el primer ensayo.



**2. 20** Biosurfactante diluido en agua y distribuido en cuatro tubos de ensayo.



2. 21 Resultado del peso seco la biomasa celular de uno de los ensayos para la determinación del rendimiento  $Y_{p/x}$ .

**ANEXO N°3: TABLAS DE DATOS IMPORTANTES:**

3. 1 Máximos diámetros producidos por el caldo de cultivo con presencia de biosurfactantes en la prueba de la dispersión del aceite luego de 30 segundos. Todos estos datos son provenientes de los cuatro cultivos evaluados.

DIÁMETROS (cm)			
3.9	4.15	4.6	3.8
4.05	3.65	4.4	3.6
3.75	3.8	4.5	3.65
4	3.9	4.45	3.6
3.65	4.2	4.3	3.55
Promedio: $3.975 \pm 0.338$ cm			
Blanco: 0.5 cm			

3. 2 Valores de pH alcanzados por los caldos de cultivo en cada uno de los ensayos mediante la acidificación de los mismos:

	MEDIO SUPLEMENTADO CON ACEITE			
	0.75%	1%	1.5%	2.5%
Ensayo 1	1.99	2.05	1.93	2.15
Ensayo 2	2.11	1.98	2	2.17

**3.3** Cantidad de biosurfactante seco recuperado en cada uno de los ensayos luego de terminado el tiempo en una estufa a 37°C. Valores calculados mediante la diferencia del peso de los viales sin y con biosurfactantes.

MEDIO DE CULTIVO CON SUPLEMENTO DE ACEITE DE :	Ensayo 1 (g)	Ensayo 2 (g)	PROMEDIO (g)
0.75 %	0.09	0.12	0.105±0.021
1 %	0.08	0.1	0.09±0.014
1.5 %	0.07	0.09	0.08±0.014
2.5 %	0.07	0.08	0.075±0.007

**3.4** Rendimiento promedio  $Y_{p/x}$ , calculado a partir del peso de la biomasa de cada uno de los cultivos evaluados en los dos ensayos realizados.

	Peso seco de la placa Petri con biomasa (g)	Peso de la placa Petri (g)	Peso seco de la biomasa (g)	Cantidad de biosurfacta nte (g)	$Y_{p/x}$
<b>Ensayo 1</b>	63.27	63.14	0.13	0.09	0.6923
	56.9	56.81	0.09	0.08	0.8889
	59.96	59.87	0.09	0.07	0.7778
	63.04	62.92	0.12	0.07	0.5833
<b>Ensayo 2</b>	66.03	65.89	0.14	0.14	0.8571
	58.66	58.55	0.11	0.11	0.9091
	57.35	57.26	0.09	0.09	1
	56.91	56.8	0.11	0.11	0.7273
			Promedio:		0.8045±0.1348

**ANEXO N°4: TABLAS EMPLEADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *B. licheniformis* MEDIANTE PRUEBAS BIOQUÍMICAS:**

**4.1** Características bioquímicas de una cepa de *B. licheniformis* aislada por Acharya y Chaudhary<sup>58</sup>

Biochemical Tests	<i>Bacillus licheniformis</i> MVS1	<i>Bacillus</i> sp. MVS3
Gram's staining	+	+
Indole test	-	-
Methyl red test	+	+
Voges Proskauer test	+	+
Citrate utilization test	+	+
Starch hydrolysis test	+	+
Urea hydrolysis test	-	-
Gelatin hydrolysis test	+	+
Nitrate reduction test	-	+
H <sub>2</sub> S production test	+	-
Catalase test	+	+
Oxidase test	+	+
Glucose fermentation test	+	+
Adonitol fermentation test	+	-
Lactose fermentation test	+	+

4.2 Características bioquímicas de varias especies de *Bacillus* que incluye a *B. licheniformis*<sup>59</sup>.

Species <sup>a</sup>	Motility	Catalase Production	Parasporal Bodies	Lipid Globules in Protoplasm	Lectinlike Reaction	Citrate Utilization	Anaerobic Growth	V-P Reaction	pH in V-P Medium $\times 6.0$	Growth at 50° C	Growth at 60° C	Growth in 7% NaCl	Acid from AS Glucose	Acid + Gas from AS Glucose	Nitrate Reduction	Cassia Hydrolysis	Starch Hydrolysis	Procionato Utilization
Morphologic group 1																		
<i>B. megaterium</i>	v	+	-	+	-	+	-	-	v	-	-	+	+	-	v	+	+	n
<i>B. cereus</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	n
<i>B. cereus</i> subsp. <i>mycoides</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	n
<i>B. anthracis</i>	-	+	-	+	+	v	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	n
<i>B. thuringiensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	n
<i>B. licheniformis</i>	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	v	v	-	+	+	-	+	+	+	-
<i>B. pumilus</i>	+	+	-	-	-	+	+	+	v	-	-	+	+	-	+	+	+	-
<i>B. firmus</i>	v	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
<i>B. coagulans</i>	+	+	-	-	-	v	+	+	+	v	-	-	+	-	v	v	+	-
Morphologic group 2																		
<i>B. polymyxa</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	v	-	-	-	+	+	+	+	+	n
<i>B. macerans</i>	+	+	-	-	-	v	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	n
<i>B. circulans</i>	v	+	-	-	-	v	v	-	+	v	-	v	+	-	v	v	+	n
<i>B. stearothermophilus</i>	+	v	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	v	v	+	n
<i>B. alvei</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	n
<i>B. laterosporus</i> <sup>d</sup>	+	+	-	-	(+)	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	n
<i>B. brevis</i>	+	+	-	-	-	v	-	-	-	v	v	-	+	-	v	+	-	n
Morphologic group 3																		
<i>B. sphaericus</i>	+	+	-	-	-	v	-	-	-	-	-	v	-	-	-	v	-	n

4.3 Características diferenciales de las especies de *Bacillus* aisladas con frecuencia, dentro de las cuales se encuentra *B. licheniformis*.<sup>60</sup>

Prueba	<i>B. anthracis</i> <sup>b</sup>	<i>B. cereus</i> <sup>c</sup>	<i>B. circulans</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. firmus</i> <sup>d</sup>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. sphaericus</i> <sup>d</sup>	<i>B. stearothermophilus</i> <sup>e</sup>	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lecitinasa	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Fenilalanina desaminasa	-	-	-	-	+	-	v	-	+	-	-
Citrato de Simmons	v	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
Hidrólisis del almidón	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Ureasa	-	v	-	-	-	v	v	-	v	v	v
Voges-Proskauer <sup>g</sup>	+	+	-	v	-	+	-	+	-	-	+