

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL



EVALUACION DE PRODUCCION DE BIOSURFACTANTES UTILIZANDO  
RESIDUOS AGRICOLAS Y AGROINDUSTRIALES

Por

JOSE DE JESUS CARRASCO CERVANTES

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS con Especialidad en  
Ingeniería Ambiental

Diciembre, 2008

.B3

8

TP996.  
C3  
2008  
C.1

MAESTRIA EN CIENCIAS

III

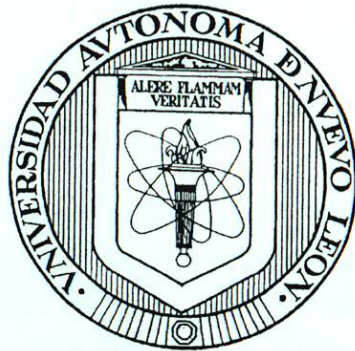
III



1090020071

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL



T  
TP996.B3  
C3  
2008  
c.1

EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES UTILIZANDO  
RESIDUOS AGRÍCOLAS Y AGROINDUSTRIALES

Por

JOSÉ DE JESÚS CARRASCO CERVANTES

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS con Especialidad en  
Ingeniería Ambiental

Diciembre, 2008



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL  
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**ING. LÁZARO VARGAS GUERRA**

Director del Departamento de Escolar y de Archivo  
UANL

PRESENTE.-

Por este conducto me permito comunicarle que el **Q. I. José de Jesús Carrasco Cervantes**, pasante de la **Maestría en Ciencias con Especialidad en Ingeniería Ambiental**, ha solicitado su examen de grado, para lo cual ha cubierto con la totalidad de los requisitos académicos y administrativos que exige el Reglamento de Exámenes Profesionales y el Reglamento General de Estudios de Posgrado de nuestra Institución. De la manera más atenta, le solicito su colaboración para que se de el trámite correspondiente en el Departamento a su digno cargo.

Sin otro particular por el momento, me es grato enviarle un cordial saludo y reiterarme a sus respetables órdenes.

ATENTAMENTE

**"ALERE FLAMMAM VERITATIS"**

Cd. Universitaria a 10 de Noviembre del 2008

**Dr. PEDRO L. VALDEZ TAMEZ**

Subdirector de Estudios de Posgrado e Investigación



SUB DIRECCION DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACION

C.c.p. Archivo.

Cd. Universitaria, CP 66450

San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México

Tels y Fax: (81) 8376 3970, 8332 1902

**Dr. Pedro L. Valdez Tamez**  
**Subdirector de Estudios de Posgrado e Investigación**  
**Facultad de Ingeniería Civil**  
**Universidad Autónoma de Nuevo León**

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE Tuxtla Gutiérrez

SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



Estimado Dr. Valdez:

Por este medio le comunico que el **Q. I. José de Jesús Carrasco Cervantes**, pasante de la Maestría en Ciencias con Especialidad en Ingeniería Ambiental, ha concluido satisfactoriamente su trabajo tesis titulado: **"EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES UTILIZANDO RESIDUOS AGRÍCOLAS Y AGROINDUSTRIALES"**, por lo que no existe inconveniente para atender la solicitud de examen de grado con los requisitos que exige el Reglamento de Exámenes Profesionales de nuestra institución, agradecemos pasar las instrucciones necesarias para el trámite correspondiente.

Estimado Dr. Valdez,

Agradeciendo de antemano la atención brindada a la presente, quedo a sus apreciables órdenes.

Atentamente,

Cd. Universitaria, 11 de noviembre de 2008

Aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE



Dr. Pedro Luis Valdez Tamez  
Profesor Investigador

**M. C. Alfredo Núñez Cantú**  
**Directores de Tesis**





Sistema Nacional de Educación Superior Tecnológica  
Dirección General de Educación Superior Tecnológica



SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, 5 de Noviembre de 2008.

**DR. PEDRO L. VALDEZ TAMEZ**  
**SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INV.**  
**UNIV. AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**PRESENTE**

Estimado Dr. Valdez,

En atención al oficio de invitación con fecha de 13 de Octubre de 2008, en relación a la evaluación de la tesis "Evaluación de producción de biosurfactantes utilizando residuos agrícolas y agroindustriales", la cual está siendo realizada por el Q.I. José de Jesús Carrasco Cervantes; le informo que he revisado dicho documento y no existe ningún inconveniente para que el Q.I. Carrasco continúe con los trámites correspondientes a la obtención del grado.

Aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Dra. Rocío Meza Gordillo  
Profesor Investigador

**Dr. Pedro L. Valdez Tamez**  
**Subdirector de Estudios de Posgrado e Investigación**  
**Facultad de Ingeniería Civil**  
**Universidad Autónoma de Nuevo León**

Estimado Dr. Valdez:

En atención a su oficio, en el que me informa que he sido designado como Evaluador de la tesis **"EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES UTILIZANDO RESIDUOS AGRÍCOLAS Y AGROINDUSTRIALES"**, que presenta el **Q. I. José de Jesús Carrasco Cervantes**, como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Ingeniería Ambiental, comunico a Usted que he leído y evaluado la calidad de dicha tesis, considerándola como **APROBADA**.

Sin otro particular por el momento, quedo a sus órdenes para cualquier aclaración que considere pertinente.

**A T E N T A M E N T E**

Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, a 11 de noviembre de 2008

  
**M. C. Vladimir Sánchez Hernández**  
**Evaluador de Tesis de Maestría**



**EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES UTILIZANDO  
RESIDUOS AGRÍCOLAS Y AGROINDUSTRIALES**

Aprobación de la Tesis

Ing. M.C. José A. Núñez Cantú



Asesor de la Tesis

Dra. Rocío Meza Gordillo



M.C. VLADIMIR SANCHEZ HERNANDEZ



Dr. Pedro L. Valdez Tamez



Subdirector de Estudios de Posgrado

Agradecemos el apoyo en todo momento al Dr. Pedro L. Valdez Tamez y  
De igual forma a los profesores por sus experiencias y  
sugerencias al M.C. José A. Núñez Cantú y al M.C. Vladimir Sánchez  
Hernández.

También, a todos y cada uno de los Profesores que durante estos  
últimos años compartieron sus conocimientos y experiencias. Gracias.

Agradezco el apoyo en todo momento al Dr. Pedro L. Valdez Tamez y al M.I. Justino César González Álvarez.

De igual forma agradezco por compartir sus experiencias y sugerencias al M.C. José A. Nuñez Cantú y al M.C. Vladimir Sánchez Hernández.

También, a todos y cada uno de los Profesores que durante estos últimos años compartieron sus conocimientos y experiencias; Gracias.

A mis hijos, Miroslava y Alan Michel, por todas esas sonrisas que

Un reconocimiento muy especial a la Dra. Rocio Meza Gordillo por todo lo que significa el presente trabajo, mi más sincero AGRADECIMIENTO.

## RESUMEN

José De Jesús Carrasco Carrasco

Fecha de Graduación: Diciembre de 2008

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ingeniería Civil

### Título del Estudio: EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES UTILIZANDO RESIDUOS AGRÍCOLAS Y AGROINDUSTRIALES

Número de páginas: 61

Candidato para el grado de Maestría en  
Ciencias con especialidad en Ingeniería  
Ambiental

Área de Estudio: Ingeniería Ambiental

Los biosurfactantes pueden ser utilizados para promover la biodegradación de hidrocarburos por biorremediación. Los Biosurfactantes tienen diferentes ventajas sobre los surfactantes químicos incluyendo la baja toxicidad y alta biodegradabilidad y efectividad en valores de pH y temperaturas extremas. Sin embargo, a pesar de estas ventajas, los biosurfactantes tienen que competir en costo con los sintetizados químicamente, y la utilización de fuentes de carbono como desechos de la agricultura puede ayudar. En este estudio se propone la utilización de residuos de la agricultura (caña de azúcar y levadura del café) y agroindustriales (harina de soya, girasol y piñón) como fuentes de carbono en la obtención de biosurfactantes, utilizando cepas nativas de suelos contaminados por hidrocarburos (*Aureobacterium* sp). En cada fermentación se evaluaron diferentes variables, biomasa, pH, concentración de surfactante por el método del ácido fosfotúngstico, tensión superficial, prueba de la gota y actividad emulsificante de hidrocarburos.

**Contribuciones y Conclusiones:** En cuanto a la producción de biosurfactante, observamos que el sustrato que mayor cantidad produce es el de bagazo de caña, seguido de la harina de piñón. Esto coincide con los valores de biomasa obtenidos, por lo que podemos concluir que hay una relación directa entre estos dos valores. A partir del aislamiento de microorganismos de muestras provenientes de suelo contaminado con hidrocarburos, se obtuvieron cinco cepas, y todas ellas mostraron la prueba de bioluminiscencia positiva.

**A mis hijos, Miroslava y Alan Michel, por todas esas sonrisas que compartimos.**

**A mi esposa Rocio, por el apoyo en todo momento.**

## RESUMEN

José De Jesús Carrasco Cervantes

Fecha de Graduación: Diciembre de 2008

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ingeniería Civil

### Título del Estudio: EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES UTILIZANDO RESIDUOS AGRÍCOLAS Y AGROINDUSTRIALES

Número de páginas: 61

Candidato para el grado de Maestría en  
Ciencias con especialidad en Ingeniería  
Ambiental

Área de Estudio: Ingeniería Ambiental

Los biosurfactantes pueden ser utilizados para promover la biodegradación de hidrocarburos por biorremediación. Los Biosurfactantes tienen diferentes ventajas sobre los surfactantes químicos incluyendo la baja toxicidad y alta biodegradabilidad y efectividad en valores de pH y temperaturas extremas. Sin embargo, a pesar de estas ventajas, los biosurfactantes tienen que competir en costo con los sintetizados químicamente, y la utilización de fuentes de carbono como desechos de la agricultura puede abatirlo. En este estudio se propone la utilización de residuos de la agricultura (caña de azúcar y beneficio del café) y agroindustriales (harina de soya, girasol y piñón) como fuentes de carbono en la obtención de biosurfactantes, utilizando cepas nativas de suelos contaminados por hidrocarburos (*Acinetobacter sp*). En cada fermentación se evaluaron diferentes variables, biomasa, pH, concentración de surfactante por el método del ácido tioglicólico, tensión superficial, prueba de la gota y actividad emulsificante de hidrocarburos.

**Contribuciones y Conclusiones:** En cuanto a la producción de biosurfactante, observamos que el sustrato que mayor cantidad produce es el de bagazo de caña, seguido de la harina de piñón. Esto coincide con los valores de biomasa obtenidos, por lo que podemos concluir que hay una relación directa entre estos dos valores. A partir del aislamiento de microorganismos de muestras provenientes de suelo contaminado con hidrocarburos, se obtuvieron cinco cepas, y todas dieron positiva la prueba de bromuro de cetil trimetil amonio. Mediante pruebas bioquímicas y tinción de Gram se sugiere que todas pertenecen al género *Acinetobacter*.

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
	1. Biotransformación de petróleo por <i>Pseudomonas aureoglycous</i>	
I.	Contenido de grasas en las harinas utilizadas como Sustrato . . . . .	37
	2. Cinética de fermentación de <i>Pseudomonas fluorescens</i> AT18	
II.	Condiciones de reacción de hidrólisis y porcentaje de azúcares obtenidos empleando HNO <sub>3</sub> . . . . .	39
	3. Cinética de fermentación de <i>Pseudomonas aureoglycous</i> AT18	
III.	Condiciones de reacción de hidrólisis y porcentaje de azúcares obtenidos empleando H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . . . . .	39
	4. Degradación de sulfato de sodio por <i>Pseudomonas</i>	
IV.	Determinación de biomasa utilizando los diferentes Sustratos . . . . .	40
	5. Fermentaciones con harina de a) soja, b) maíz y c) papa	
V.	Concentración de biosurfactantes en fermentados con diferentes sustratos . . . . .	45
	6. Sustrato base de caña y pulpa de café	
VI.	Actividad Emulsificante (E24) para benceno y tolueno . . . . .	46
	7. Cepas de cultivos de fermentación	
VII.	Tensión Superficial de los medios de cultivo fermentados utilizando diferentes sustratos. . . . .	50
	8. Cultivos de la gema	
VIII.	Morfología colonial de los microorganismos aislados . . . . .	51
	9. Prueba del Enzima de Celulasa en cepas aisladas	
IX.	Resultado de las pruebas bioquímicas aplicadas a las cepas aisladas . . . . .	53

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Biodegradación de petróleo por Pseudomonas aureoginosa AT 18 . . . . .	22
2.	Cinética de fermentación de Pseudomonas aureoginosa AT18 Sobre naftaleno como única fuente de carbono . . . . .	22
3.	Cinética de fermentación de Pseudomonas aureoginosa AT18 Sobre naftaleno más glucosa como fuente de carbono . . . . .	23
4.	Degradación de naftaleno más glucosa por Pseudomona Aureoginosa AT 18 . . . . .	24
5.	Fermentaciones con harina de a) soya, b) girsol y c) piñón . . . . .	41
6.	Determinación de biomasa por peso seco utilizando como Sustrato bagazo de caña y pulpa de café . . . . .	42
7.	Determinación de pH . . . . .	43
8.	Curva de calibración de rhamnosa . . . . .	44
9.	Actividad Emulsificante (E24) . . . . .	47
10.	Colapso de la gota . . . . .	48
11.	Prueba del Bromuro de Cetil trimetil amonio a cepas aisladas . . . . .	54

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Magnesio Heptahidratado
mg/ml	miligramo por mililitro
min	minuto
MO	Agar Mordant Indol Oxidase
ml	mililitro
mm	milímetro
$\text{CaCl}_2$	Cloruro de Calcio
cm	centímetro
CTAB	Bromuro de Cetiltrimetilamonio
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Fierro Heptahidratado
g	gramo
$^\circ\text{C}$	grado Celsius
g/L	gramo por litro
h	hora
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
$\text{H}_2\text{S}$	Ácido Sulfhídrico
IR	Infrarojo
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Fosfato Ácido de Potasio
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Fosfato Diácido de Potasio
L	litro
LIA	Agar de Lisina - Hierro
lb/plg <sup>2</sup>	libras por pulgada cuadrada
M	Molaridad

## NOMENCLATURA



MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Sulfato de Magnesio Heptahidratado
mg/mL	miligramo por mililitro
min.	Minuto
MIO	Agar Movilidad Indol Ornitina
mL	mililitro
mm	milimetro
mM	milimol
MN	medio mas naftaleno
MNG	medio mas naftaleno mas glucosa
mN/m	miliNewtón por metro
N	Normalidad
NaOH	Hidróxido de sodio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato Ácido de Sodio
NH <sub>4</sub> Cl	Cloruro de Amonio
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Nitrato de Amonio
nm	nanómetro
pH	potencial de Hidrógeno
rpm	revoluciones por minuto
SIM	Agar Movilidad Indol Sulfuro de Hidrógeno
TSI	Agar Triple Azúcar Hierro
UFC/mL	unidades formadoras de colonias por mililitro
vs	versus
v/v	relación volumen/ volumen

2	MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1	Diseño de Los Reactivos	27
2.2	Materiales	27
2.3	Estrategia de Trabajo Desarrollada	28

## TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	Página
1. INTRODUCCIÓN . . . . .	1
1.1 Concepto E Importancia De Los Biosurfactantes . . . . .	2
1.1.1 Adsorción . . . . .	5
1.1.2 Asociación . . . . .	6
1.2 Clasificación De Los Surfactantes . . . . .	7
1.2.1 Naturaleza Química . . . . .	8
1.2.2 Peso Molecular . . . . .	10
1.2.3 Carga Iónica . . . . .	10
1.3 Usos de Los Biosurfactantes . . . . .	11
1.4 Microorganismos Que Degradan Los Hidrocarburos . . . . .	15
1.5 Biodisponibilidad del Agente Contaminante: Surfactantes Naturales y Sintéticos . . . . .	17
1.6 El metabolismo de los hidrocarburos . . . . .	19
1.7 Parámetros Indicadores de la Metabolización de los Hidrocarburos . . . . .	20
1.8 Justificación . . . . .	24
1.9 Objetivo General . . . . .	26
1.9.1 Objetivos Específicos . . . . .	26

2.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1	Origen de Los Reactivos	27
2.2	Material Biológico	27
2.3	Estrategia de Trabajo Desarrollada	28
2.4	Métodos	29
2.4.1	Obtención de Las Harinas	29
2.4.2	Obtención de Los Hidrolizados de Bagazo de Caña y Beneficio de Café	29
2.4.3	Preparación del Medio	31
2.4.4	Fermentaciones	31
2.4.5	Estimación de Biomasa	32
2.4.6	Determinación de pH	33
2.4.7	Estimación de Biosurfactante	33
2.4.8	Determinación de Actividad Emulsificante (E24)	34
2.4.9	Colapso De La Gota De Aceite	34
2.4.10	Determinación de la Tensión Superficial	34
2.4.11	Aislamiento de Cepas Productoras de Biosurfactantes	35
2.4.12	Tinción de Gram	35
3.	RESULTADOS	36
3.1	Contenido de Grasas En Harinas	36
3.2	Obtención de Hidrolizados De Caña y Café	37
3.3	Determinación de Biomasa Por Densidad Óptica	40

3.4	Determinación de Biomasa Por Peso Seco . . . . .	41
3.5	Determinación de pH . . . . .	42
3.6	Cuantificación de Biosurfactante Utilizando Ác. Tioglicólico . . . . .	43
3.7	Determinación de la Actividad Emulsificante (E24) . . . . .	45
3.8	Colapso de la Gota . . . . .	47
3.9	Determinación de Tensión Superficial . . . . .	49
3.10	Aislamiento de Microorganismos Productores de Biosurfactantes . . . . .	51
3.11	Realización de Pruebas Bioquímicas . . . . .	52
3.12	Producción de Biosurfactantes. Prueba del Bromuro de Cetil Trimetil Amonio . . . . .	54
4.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS . . . . .	55
5.	CONCLUSIONES . . . . .	58
6.	LITERATURA CONSULTADA . . . . .	60

## CAPITULO 1

### INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental se define como la condición del medio ambiente, en la cual determinadas sustancias están presentes en concentraciones tales que afectan su calidad y composición; provocando efectos perjudiciales en los diferentes ecosistemas. Todo proceso que expulse o libere un contaminante al medio, constituye una fuente de contaminación ambiental (López y Bonilla, 2002). Entre los principales contaminantes liberados al medio, los cuales alteran y deterioran los nichos ecológicos, se encuentran las aguas residuales, los metales pesados, los compuestos xenobióticos y los hidrocarburos.

Los hidrocarburos aromáticos se consideran los contaminantes naturales de origen antropogénico de mayor interés; ya que por su estructura molecular estable son muy difíciles de degradar, permaneciendo durante largos periodos de tiempo sin sufrir modificaciones estructurales, causa directa de su recalcitrancia y resistencia a la degradación microbiana. (Albert y Guillen 1994; Harayama, et al, 1999).

La presencia de hidrocarburos en suelos, aguas y zonas costeras constituye una fuente muy frecuente de contaminación ambiental; y su degradación por poblaciones microbianas naturales es uno de los principales mecanismos para eliminarlos. (Atlas, 1991).

### **1.1 Concepto e importancia de los biosurfactantes.**

Los biosurfactantes son moléculas producidas por microorganismos y presentan una alta actividad de superficie y propiedades emulsificantes, generalmente son metabolitos secundarios excretados por los microorganismos, su principal papel fisiológico es el de permitir crecer a los microorganismos en sustratos inmiscibles en agua mediante la reducción de la tensión superficial de la interfase. (Abalos, 2001).

Pueden ser clasificados principalmente por su composición química, por consiguiente la mayor clase de biosurfactantes comprenden a los glicolípidos, lipopéptidos y lipoproteínas, fosfolípidos y ácidos grasos, surfactantes poliméricos y partículas de surfactantes.

La enorme demanda del mercado de los surfactantes ha provocado un incremento en la preparación por síntesis de numerosos surfactantes químicos, principalmente con aplicación de la industria petrolera. Ahora bien, los rápidos avances en la biotecnología e incremento de la necesidad del consumidor de proteger el medio ambiente, provee un buen futuro para considerar seriamente a

los surfactantes biológicos como posibles alternativas para la producción de éstos. Los biosurfactantes tienen variadas aplicaciones en el mercado, tanto en la producción de petróleo, como en la incorporación en las formulaciones de aceites. Entre otras aplicaciones relacionadas con la industria del petróleo están los procesos de biorremediación y dispersión de derrames petroleros, tanto a nivel del suelo como de las aguas, la remoción y movilización de petróleo pegado en el interior de los tanques y también en la recuperación mejorada de petróleo.

Un segundo e importante mercado de los biosurfactantes se encuentra en la polimerización y emulsión de pinturas. También se describen otro uso de los surfactantes en la formulación de asfaltos, cementos, textiles y manufacturación de fibras, adicionalmente en tratamientos de metales, minería, tratamientos de agua y como preservativos de madera. Pueden ser usados en la industria de los alimentos, los cosméticos y como productos de limpieza. En la agricultura como diluyentes y dispersantes de fertilizantes y pesticidas, así como en el mejoramiento de la penetración de compuestos activos dentro de las plantas, todas estas aplicaciones dependen del tipo de función que presente el compuesto.

Los surfactantes son moléculas anfifáticas constituidas de una porción hidrofóbica y una porción hidrofílica. La porción polar puede ser iónica (aniónica o catiónica), no iónica o anfotérica. La presencia de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos en la misma molécula tienden a distribuirse en las interfases entre fases fluidas con diferentes grados de polaridad. La formación de una película,

ordenada en las interfases, reduce la tensión superficial siendo responsable por las únicas propiedades de los surfactantes.

El grupo polar es un extremo un grupo funcional que confiere actividad. El descenso de la tensión facilita la eliminación de las partículas de suciedad de las superficies sólidas. Son moléculas que contienen un segmento liposoluble (soluble en aceite) y otro hidrosoluble (soluble en agua o disolventes polares). La solubilidad parcial tanto en agua como en aceite permite al surfactante ocupar la interfase. Así pues, reducen la tensión superficial y las tensiones interfaciales entre moléculas individuales en la superficie y la interfase, respectivamente. Tienen propiedades emulsionantes. lo que el grupo polar está en el agua, mientras que el grupo apolar se ubica "fuera" del agua, en el aire o en el aceite.

Atendiendo a estos criterios un biosurfactante es una molécula biológica (orgánica) con propiedades tensoactivas originadas sobre superficies vivas, mayormente superficies de células microbianas, o excretados al medio extracelular. La interfase llamada adsorción se por lo tanto espontánea.

Con excepción del poder bactericida de ciertos surfactantes, fenómeno del cual no hay una explicación absolutamente segura, se puede decir que todas las propiedades y usos de los surfactantes provienen de dos propiedades fundamentales de estas sustancias: de una parte, su capacidad de adsorberse a las interfases y de otra parte su tendencia a asociarse para formar estructuras organizadas. Las fuerzas capilares involucradas pueden ser consideradas y se

podrán encontrar aplicaciones en la fabricación de adhesivos, la recuperación mejorada de petróleo, la coagulación de una suspensión acuosa, la extracción



### 1.1.1 Adsorción

El grupo polar es en general un grupo funcional que contiene heteroátomos (O,S,N,P), mientras que el grupo apolar es en la mayoría de los casos un hidrocarburo parafínico o alquil-aromático. En vista de su dualidad polar-apolar, una molécula de surfactante no puede satisfacer su doble afinidad ni en un solvente polar, ni en un solvente orgánico.

Cuando una molécula de surfactante se coloca en una interfase agua-aire ó agua-aceite, esta puede orientarse de manera de que el grupo polar esté en el agua, mientras que el grupo apolar se ubica "fuera" del agua, en el aire o en el aceite. Desde un punto de vista energético, se puede decir que la energía libre de una molécula de surfactante a la interfase es inferior a la de una molécula solubilizada en el seno de una fase acuosa. La transferencia desde el seno de una fase acuosa a la interfase, llamada adsorción es por lo tanto espontánea.

La adsorción de un surfactante en una superficie gas-líquido o en una interfase líquido-líquido, produce en general una reducción de la tensión superficial o interfacial, de donde proviene el nombre "tensoactivo". La tensión es responsable de la curvatura de las interfases, de la formación de gotas, de un gran número de inestabilidades capilares y de numerosos fenómenos de estabilización de interfases. Las fuerzas capilares involucradas pueden ser considerables y se pueden encontrar aplicaciones en la fabricación de adhesivos, la recuperación mejorada de petróleo, la colocación de una monocapa protectora, la contracción

de capas de petróleo flotando. El descenso de la tensión favorece la deformación y la ruptura de una interfase, la formación de sistemas dispersos como las emulsiones o las espumas, la movilización del petróleo residual, la limpieza industrial, etc.

Los efectos que favorecen la micelización producen un fenómeno de la

### Concentración Micelar Crítica y 1.1.2 Asociación

Cuando a una solución (acuosa por ejemplo) se le añade cada vez más surfactante, este comienza por adsorberse a las interfases disponibles, luego su concentración en forma monomolecular aumenta hasta que se forman las primeras micelas. La micela es un polímero de asociación en el cual el surfactante alcanza una posición favorable. En solución acuosa la fuerza motriz principal que favorece la formación de micelas es el efecto hidrófobo, es decir, la sustracción de la parte apolar del surfactante del contacto con las moléculas del agua y la formación de un contacto más favorable desde el punto de vista energético con las partes apolares de otras moléculas de surfactante.

El fenómeno de la micelización se produce como un compromiso entre dos tipos de efectos: los efectos que tienden a favorecer la formación de una micela, particularmente el efecto hidrófobo, que aumenta con el tamaño de la cadena hidrocarbonada del surfactante. Por otra parte, los efectos que tienden a oponerse a la formación de una micela, tal como la repulsión entre los grupos hidrofílicos, particularmente importante en el caso de surfactantes iónicos. La presencia de un alcohol que se intercala entre las moléculas de surfactante en la

interfase, o la adición de electrólitos que produce un efecto de pantalla que reduce el campo eléctrico intermolecular, reduce las fuerzas repulsivas y por este efecto favorece la micelización.

Los efectos que favorecen la micelización producen un descenso de la Concentración Micelar Crítica y viceversa.

De acuerdo a su estructura química se definen diferentes clases de surfactante. Se ha hablado sólo de micelas en medio acuoso, pero se puede considerar que los mismos fenómenos se producen en medios apolares, bien que en forma diferente. Las micelas son responsables de una propiedad fundamental de las soluciones de surfactantes: su poder solubilizante.

## 1.2 Clasificación de los surfactantes.

Los biosurfactantes son moléculas complejas que cubren un amplio rango de estructuras químicas incluyendo péptidos, ácidos grasos, fosfolípidos, glicolípidos, antibióticos, lipopéptidos, entre otros. Los microorganismos también producen, en algunos casos, surfactantes que son combinaciones de muchas estructuras químicas como los biosurfactantes poliméricos. Muchos biosurfactantes han sido purificados y sus estructuras químicas son conocidas. Mientras que los de alto peso molecular son generalmente heteropolisacáridos polianiónicos que contienen tanto polisacáridos como proteínas, los de bajo peso molecular suelen ser glicolípidos.

c) Se puede clasificar a los biosurfactantes atendiendo a tres criterios: naturaleza química, peso molecular y carga iónica de la parte superficialmente activa de la molécula.

### 1.2.1. Naturaleza química

d) De acuerdo a su estructura química se definen diferentes clases de surfactantes:

#### a) Lípidos

Pueden ser simples o complejos. Los lípidos simples son lípidos saponificables en cuya composición química sólo intervienen carbono, hidrógeno y oxígeno. Por otra parte, los lípidos complejos son lípidos saponificables en cuya estructura molecular además de carbono, hidrógeno y oxígeno, hay también, nitrógeno, fósforo, azufre o un glúcido.

#### b) Hidratos de carbono

Los surfactantes derivados de azúcares se pueden clasificar según la posición y el tipo de enlace entre la cabeza (carbohidrato) y la cola del surfactante. En los alquil glicósidos el enlace se hace sobre el hidroxilo anomérico (C-1), mientras que en los derivados R-O-D-piranosas los enlaces son sobre los hidroxilos no anoméricos (C2-6). Algunos de los más conocidos son los derivados del sorbitol y el manitol, provenientes de la reducción de la D-glucosa y de la D-manosa, respectivamente.

### c) Aminoácidos

#### 1.2.2. Paso molecular

Los aminoácidos constituyen una alternativa como grupo polar en la preparación de surfactantes naturales, la mayoría de las investigaciones están dirigidas a la obtención de derivados con aminoácidos básicos como la arginina y la lisina a partir de los cuales se obtienen con facilidad surfactantes catiónicos.

### d) Glucolípidos

Son lípidos complejos que se caracterizan por poseer un glúcido. Se encuentran formando parte de las bicapas de las membranas de todas las células, especialmente de las neuronas. Se sitúan en la cara externa de la membrana celular, en donde realizan una función de relación celular, siendo receptores de moléculas externas que darán lugar a respuestas celulares.

### e) Lipopéptidos

Son sustancias cuya estructura está formada por un núcleo peptídico unido a un grupo hidrofóbico por medio de un átomo de nitrógeno en el extremo aminoterminal. El grupo lipídico es un ácido graso lineal o ramificado, insaturado o no. La parte apolar está constituida por un hexapéptido cíclico de aminoácidos con uno o más grupos alcohólicos, y el radical ácido graso es variable.

## b) Agentes catiónicos 1.2.2. Peso molecular

Estos compuestos por una molécula lipídica y una función catiónica.

### a) Bajo peso molecular

Suelen ser glicolípidos. El más estudiado es el rhamnolípidos, producido por diversas especies bacterianas como *Pseudomonas*. La función principal de estos biosurfactantes es reducir la tensión superficial entre fases (agua-roca por ejemplo).

### b) Alto peso molecular

Suelen ser polisacáridos, proteínas, lipoproteínas, lipopolisacáridos o mezclas de estos polímeros. Estos biosurfactantes no son tan eficaces en cuanto a la reducción de la tensión superficial entre fases, pero si son buenos emulsionantes. Además se ha demostrado que son muy eficaces a bajas concentraciones y poseen una considerable afinidad por el sustrato. Un ejemplo es el Alasin producido por *Acinetobacter radioresistens*.

Este tipo de surfactante se usa solo en 1.2.3. Carga iónica

### a) Agentes aniónicos

Contiene generalmente uno de cuatro grupos polares solubles como el carboxilato, sulfonato, sulfato o fosfato, combinado con una cadena hidrocarbonada hidrófoba. Si esa cadena es corta son muy hidrosolubles y en el caso contrario tendrán baja hidrosolubilidad y actuarán en sistemas no acuosos como aceites lubricantes. Se usan principalmente en la industria de jabones y detergentes.

## **b) Agentes catiónicos**

Están compuestos por una molécula lipofílica y otra hidrofílica, consistente de uno o varios grupos amonio terciarios o cuaternarios. Son utilizados comúnmente en detergentes, agentes limpiadores líquidos de lavaplatos, tratamiento de textiles, como sustancias activas antimicrobianas y en cosmética.

## **c) Agentes no iónicos**

No se disocian en iones hidratados en medio acuoso. Las propiedades hidrofílicas son provistas por hidratación de grupos amido, amino, eter o hidroxilo.

## **d) Otros tipos de surfactantes**

La combinación en la misma molécula de un grupo con tendencia aniónica y de un grupo con tendencia catiónica produce un surfactante anfotérico, como por ejemplo los aminoácidos, las betainas o los fosfolípidos. Según el pH del medio una de las dos disociaciones prevalece. Este tipo de surfactante se usa sólo en casos particulares debido a su alto costo.

### **1.3 Usos de los Biosurfactantes.**

Los contaminantes hidrofóbicos presentes en los hidrocarburos del petróleo, suelos y aguas del medio ambiente requieren su solubilización antes de ser degradados por la célula microbiana. La mineralización está gobernada por la desorción de los hidrocarburos del suelo. Los biosurfactantes pueden aumentar el área de los materiales hidrofóbicos, como pesticidas en suelos y agua del medio,

aumentándose así su solubilidad en agua. Por tanto, la presencia de biosurfactantes puede aumentar la degradación microbiana de los contaminantes.

Se le ha dado una atención considerable a la producción de moléculas tensoactivas de origen biológico por sus aplicaciones en el procesado de alimentos, aromatización de bebidas alcohólicas, reciclaje de papel, fabricación de pulpa de papel, en farmacología, y la industria del aceite. En relación a esa última aplicación, los accidentes que llevan a vertidos de aceite han llegado a ser numerosos y han causado catástrofes tanto sociales como ecológicas. La habilidad de los biosurfactantes para emulsionar hidrocarburos mezclados con agua ha sido ampliamente divulgada. Estas propiedades emulsionantes también se ha demostrado que favorecen la degradación de los hidrocarburos en el medio ambiente, por tanto los hacen muy útiles para el control de la contaminación por vertidos de aceites.

Desde el punto de vista de las cantidades producidas, la utilización principal de los surfactantes es la formulación de jabones, detergentes y otros productos para el lavado y la limpieza.

En la biorremediación en vertidos de petróleo, estudios recientes han mostrado que se puede utilizar el poder solubilizante de las micelas para extraer ciertas sustancias contaminantes aún cuando su concentración sea extremadamente baja.



Las funciones que harían estos biosurfactantes a la hora de aumentar la biodisponibilidad serían:

### b) surfactantes

- Dispersar el petróleo aumentando la superficie de contacto
- Aumenta la biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos. Principalmente los biosurfactantes de bajo peso molecular.
- Poseen también funciones evolutivas para los propios microorganismos.

### c) difusores hidrofóbicos

Pueden ayudar a los microorganismos productores a desprenderse de las gotas de petróleo una vez se ha agotado la fuente de hidrocarburo que utilizaba. Hay que tener en cuenta que un microorganismos suele utilizar un solo tipo de hidrocarburo entre la mezcla que existe. Por eso les sería útil poderse desprender de estas interacciones hidrofóbicas que mantiene la membrana con la gota de petróleo, para así ir en busca de nuevas fuentes de carbono. Además deja una microcápsula alrededor de la gota para marcarla como usada, favoreciendo así a toda la población.

### 2) Agentes orgánicos no desinfectantes

Una propiedad de los biosurfactantes curiosa es su actividad bactericida.

Dicha actividad se debe a su capacidad detergente. Así pues, existen diferentes tipos de desinfectantes (Se suelen clasificar de acuerdo con su mecanismo de acción):

#### a) mercuriales

#### b) compuestos de plata

#### c) compuestos de cobre

A) Agentes que dañan la membrana

## 1) Detergentes

- a) catiónicos
- b) aniónicos
- c) no iónicos

## 2) Compuestos fenólicos

- a) fenol
- b) cresoles
- c) difenilos halogenados
- d) alquilésteres del para-hidroxibenzoico
- e) aceites esenciales de plantas

## 3) Alcoholes

- a) etanol
- b) isopropanol

## 1.4 Microorganismos que degradan los hidrocarburos

### B) Agentes desnaturalizantes de proteínas

- 1) Ácidos y bases fuertes
- 2) Ácidos orgánicos no dissociables

### C) Agentes modificadores de grupos funcionales

- 1) Metales pesados
  - a) mercuriales
  - b) compuestos de plata
  - c) compuestos de cobre

- 2) Agentes oxidantes

- a) halógenos
- b) agua oxigenada
- c) permanganato potásico
- d) ácido peracético

### 3) Colorantes

- a) derivados de la anilina
- b) derivados de la acridina (flavinas)

### 4) Agentes alquilantes

- a) formaldehido
- b) glutaraldehido
- c) óxido de etileno
- d)  $\beta$ -propionil-lactona

## 1.4 Microorganismos que degradan los hidrocarburos.

Los microorganismos se adaptan o desarrollan su metabolismo en función de los parámetros físico-químicos (pH, temperatura, humedad) así como de los compuestos químicos que se encuentran en su ambiente inmediato. El petróleo y los muchos hidrocarburos se encuentran naturalmente presentes en el suelo, lo que ha permitido a muchos microorganismos acostumbrarse a su presencia y utilizarlos para sobrevivir.

En el caso de los hidrocarburos, las bacterias gram negativas parecen encontrarse más adaptadas a estas fuentes de carbono (Venosa, 1999).

Diversos estudios permiten hoy en día establecer una lista de 160 géneros de microorganismos que degradan los hidrocarburos (Prince y Drake, 1999), los consorcios más empleados contienen las especies de *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* y en menos ocasiones *Mycobacterium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula* y *Candida*. Las bacterias son más empleadas que los hongos y las levaduras (Balba et al., 1998; Vasudevan y Rajaram, 2001 ; Rahman et al., 2001).

Es importante estudiar qué poblaciones existen en el suelo contaminado ya que estas probablemente se habrán adaptado al ambiente contaminado (Hanson, 1997). Las poblaciones nativas pueden ser sensibles a la presencia y la actividad de poblaciones extranjeras especializadas. Estas poblaciones, visto las diferencias metabólicas, producen en algunos casos metabolitos e intermediarios tóxicos para la microflora nativa. Muchas veces también, estas poblaciones agregadas no se adaptan a las condiciones del sitio contaminado y debido a ello, no realizan la descontaminación con la misma eficiencia con la que lo hacen las poblaciones nativas (Thomassin-Lacroix et al., 2002).

El suelo es un medio complejo orgánico y/o mineral en el que muchas condiciones determinan la variabilidad de la microflora (Madigan et al., 1998). La biodegradación de los hidrocarburos se realiza de preferencia a una temperatura entre 15 y 30 °C. Visto la complejidad del suelo, deben controlarse también el pH, los nutrientes, la disponibilidad de oxígeno y del contaminante (Thomassin-Lacroix

*et al.*, 2002). La biodisponibilidad de los hidrocarburos es esencial para su descomposición. La adición de agentes de superficie (surfactantes o emulsificantes) permite mejorar esta disponibilidad (Harris y Thompson, 1997). Cuando los microorganismos producen sus propios surfactantes (biosurfactantes o bioemulsificantes), en general, al principio de la fase estacionaria de crecimiento (Ron y Rosenberg, 2002), se recomienda no agregar emulsificantes sintéticos debido a que sus efectos sobre la actividad microbiana aún no son claros (Stelmack et al, 1999).

### **1.5 Biodisponibilidad del agente contaminante: Surfactantes naturales y sintéticos**

La bioacumulación de un agente contaminante en el suelo se ve directamente relacionada con el carácter hidrófilo o hidrófobo (es decir, lipofóbico o lipofílico) de su estructura química. Entre más soluble es en el agua más tóxico es, mientras que un carácter lipofílico permite su acumulación y consecuentemente, su longevidad.

Los detergentes naturales o sintéticos emulsifican los hidrocarburos para incrementar su dispersión; las cadenas carbonadas hidrófobas exponen hacia el exterior funciones hidrófilas que facilitan el contacto entre la contaminación y los microorganismos degradan esta última (Pennel et al., 1998). Los bioemulsificantes son en general glicolípidos (con grupos hidrófobos e hidrófilos) de importante masa molecular que envuelven las moléculas de hidrocarburos y modifican su

orientación molecular de manera que sean menos adsorbables por las partículas del suelo, y por lo tanto más accesibles para los microorganismos. De esta manera, estos logran incorporarse a la interfase donde el oxígeno y las demás condiciones son favorables para la actividad de degradación realizada por las poblaciones microbianas (Abdel-El-Haleem, 2003).

Observaciones al microscopio han mostrado que *Acinetobacter* construye capas membranosas amorfas sobre los sustratos hidrófobos para poder establecer un contacto con estos últimos. Después del contacto, sucede un reconocimiento seguido por una oxidación y transformación del hidrocarburo para prepararlo para las rutas metabólicas de la célula (Marín et al., 1996). Los microorganismos productores de emulsificantes lo utilizan para controlar las propiedades de su superficie con el fin de anclarse o liberarse de un sustrato determinado. La carencia de nutrientes estimula muchas veces a las bacterias para que liberen emulsificantes y aumenten las probabilidades de encontrar un sustrato adecuado para las necesidades de crecimiento (Ron y Rosenberg, 2002).

La mayoría de las cepas que consumen hidrocarburos secretan un bioemulsificante, cuando esta secreción es inexistente, emulsificantes artificiales pueden ser añadidas al sitio. Algunos ejemplos de estos emulsificantes son los detergentes aniónicos como el Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), catiónicos como el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), no-iónicos como el Tritón X-100 y los ramnolípidos.

Por razones aún desconocidas, algunos de estos emulsificantes sintéticos inhiben el crecimiento e impiden la biodegradación (Hanson, 1996). Se recomienda utilizar bioemulsificantes en lugar de surfactantes químicos debido a que los primeros son más selectivos, menos estables y por lo tanto más compatibles desde un punto de vista ambiental (Ron y Rosenberg, 2002).

### **1.6 El metabolismo de los hidrocarburos.**

Dado que *Acinetobacter* y otras cepas a aislar utilizadas a lo largo de este trabajo son bacterias aeróbicas, únicamente serán consideradas las rutas aeróbicas de metabolización de los hidrocarburos. Para que un hidrocarburo sea reconocido por un microorganismo como sustrato utilizable por este mismo, los receptores localizados sobre la membrana celular deben reconocer algunos grupos químicos con el fin de adsorber las moléculas. Cuando un hidrocarburo es demasiado soluble, penetra la membrana, la vuelve inestable y provoca una lisis celular. Por esta razón es que muchos compuestos solubles son considerados tóxicos para las bacterias (Pieper y Reineke, 2000).

Por otro lado, los compuestos no tóxicos son transportados selectivamente (reconocimiento bioquímico) hacia el citoplasma de la bacteria y toman diferentes rutas de metabolización. Pasando por varias etapas, el compuesto puede ser parcial o completamente degradado o mineralizado. La mineralización implica la transformación total del reactivo en agua y dióxido de carbono (Harris y Thompson, 1997).

La metabolización de compuestos tóxicos puede dividirse en dos fases donde la polaridad del compuesto, y por lo tanto su solubilidad y su toxicidad, serán modificadas:

### **1. Funcionalización:**

La polaridad del compuesto va aumentar por una oxidación, reducción o hidroxilación de manera que pueda sufrir otras transformaciones.

### **2. Conjugación:**

Por asociación con un molécula polar, la polaridad del contaminante se ve acentuada de manera que el compuesto se desintoxique y que disminuyan las posibilidades de bioacumulación (De Brouwer, 2002).

## **1.7 Parámetros indicadores de la metabolización de los hidrocarburos**

La oxidación de los hidrocarburos produce ácidos grasos que son utilizados por las bacterias o liberadas en el medio. Si este es el caso, el pH del medio disminuye. Esta acidificación se emplea como parámetro para evaluar la degradación, junto con :

1. El incremento de la población microbiana a lo largo del tiempo es el resultado del consumo de los hidrocarburos como fuente de carbono y energía. Este aumento de población puede visualizarse al medir la turbidez del medio (la densidad óptica), la evolución de la materia seca y la viabilidad (UFC/ml) en el tiempo.



2. La disminución de la concentración de hidrocarburo en el medio puede ser un segundo indicador de la degradación. Si la población logra utilizar el contaminante como fuente de carbono, la concentración del mismo debe disminuir con el tiempo y ser reemplazado en el medio por nuevos metabolitos. La determinación de la concentración puede hacerse por métodos analíticos (cromatografía, absorción IR) o de Immunoassay (kit enzimáticos).
  
3. La evolución de la Demanda Bioquímica de Oxígeno puede también constituir un indicador de la actividad de degradación que realizan los microorganismos sobre las fuentes de carbono empleando al oxígeno como aceptor de electrones. Una prueba respirométrica puede llevarse a cabo sobre un suelo contaminado en presencia de microorganismos (Balba *et al.*, 1998).

En base a lo anterior debemos considerar que la biodegradación de compuestos aromáticos por cultivos puros es muy difícil ya que la estructura química de estos compuestos condiciona tanto su toxicidad como su baja solubilidad en agua (Cerniglia,1992). Por ejemplo, se han realizado estudios de biodegradabilidad del petróleo a diferentes tiempos de incubación con *Pseudomonas aeruginosa*. En la Figura 1, se observa que después de 120 horas de incubación se obtiene un 66% de biodegradación del petróleo, para finalmente alcanzar una actividad biodegradativa del 71 % a las 360 horas de incubación.

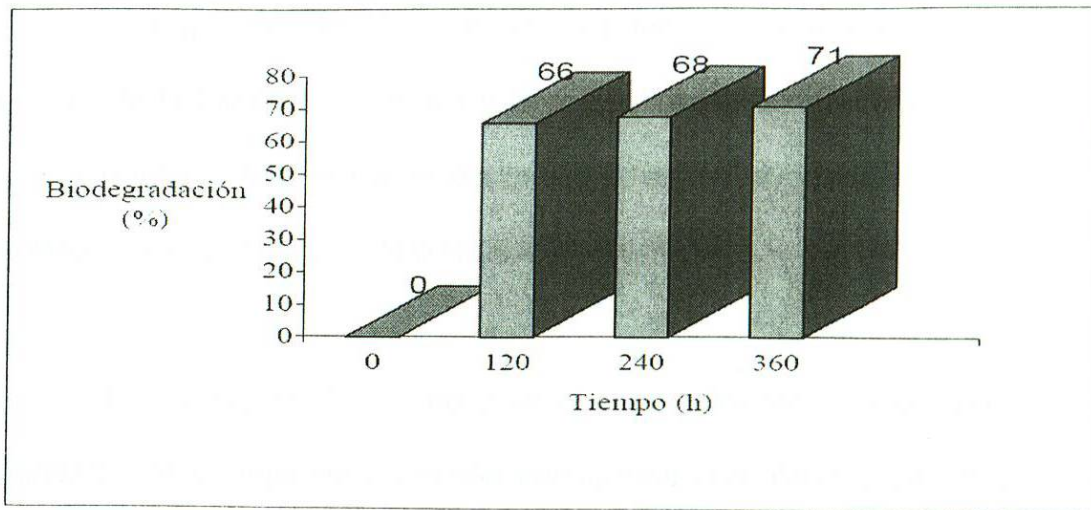


Fig. 1 Biodegradación de petróleo por *Pseudomonas aeruginosa* AT18

La biodegradación del naftaleno por la cepa *Pseudomonas aeruginosa* AT 18 fue muy baja, alcanzándose únicamente un 10% de actividad biodegradativa como se observa en la Figura 2.

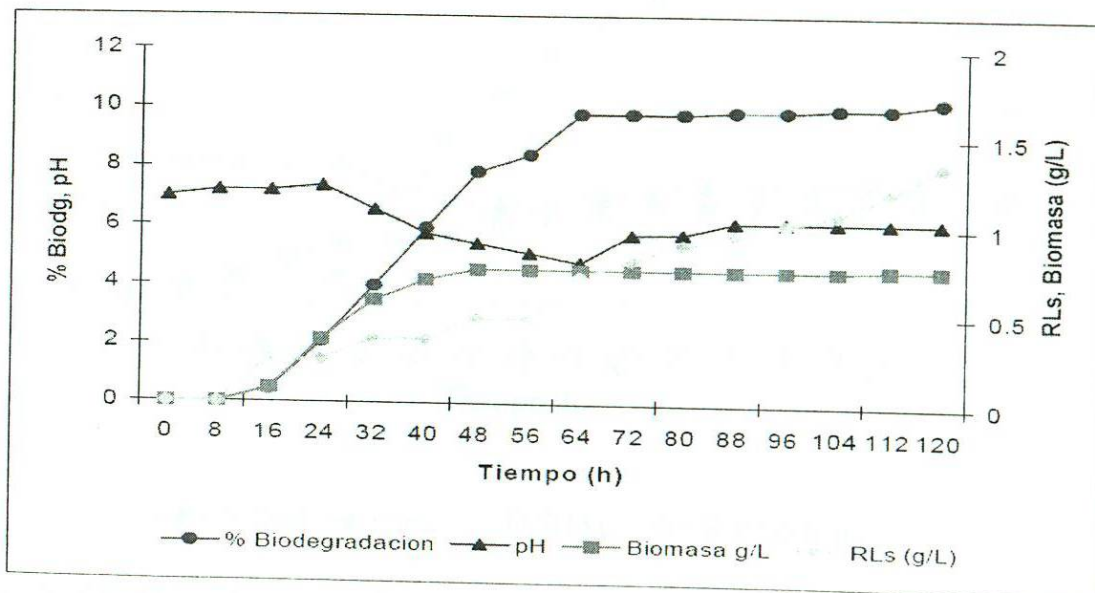


Fig.2 Cinética de fermentación de *Pseudomonas aeruginosa* AT18 sobre naftaleno como única fuente de carbono.

El bajo crecimiento de biomasa puede deberse a una inhibición por toxicidad de la fuente de carbono y la poca disponibilidad de la misma por la bacteria. Por tal motivo el diseño del medio de cultivo favorece el aumento de los rendimientos de producción de biomasa (Abalos, 2001).

En la Figura 3, se observa que la actividad biodegradativa y el crecimiento de la cepa en un medio enriquecido con glucosa fueron dos veces mayor que lo obtenido en el medio exclusivamente (Figura 2).

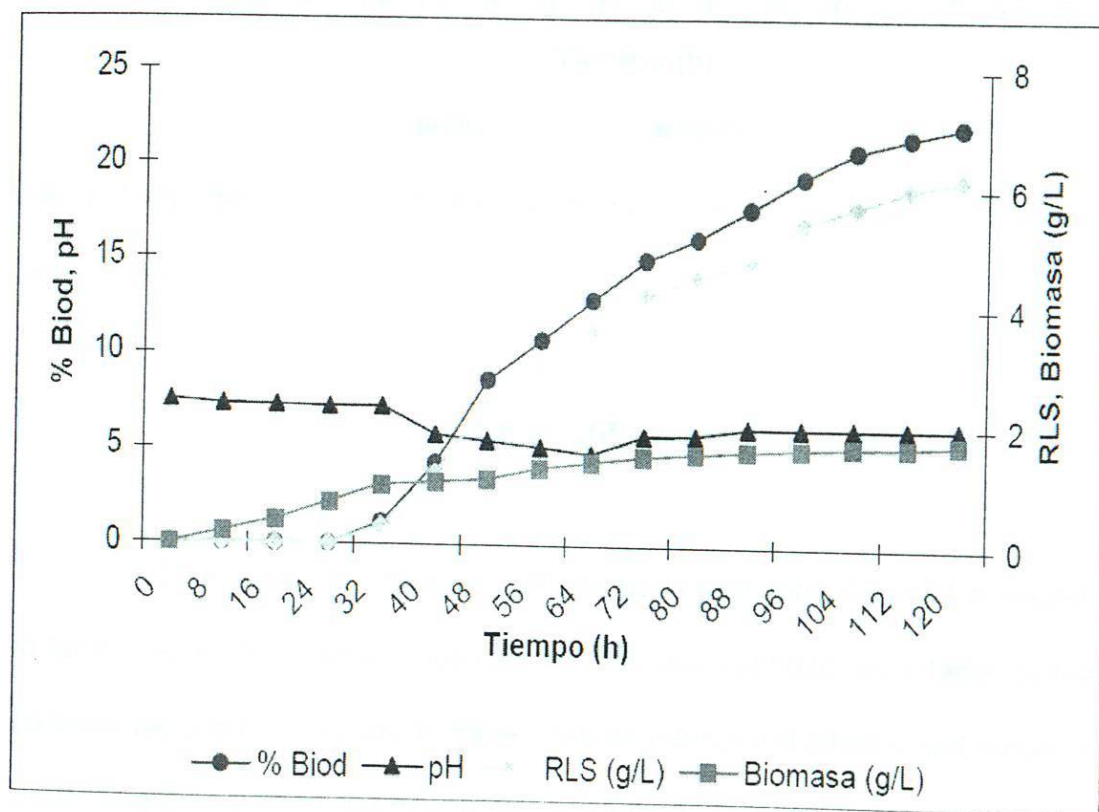


Fig. 3 Cinética de fermentación de *Pseudomonas aeuroginosa* AT18 sobre naftaleno más glucosa como fuentes de carbono.

En la figura 4 se representan los porcentajes de biodegradación del naftaleno en medio MN (medio mas naftaleno) y medio MNG (medio mas naftaleno mas glucosa) por *Pseudomonas aeuroginosa* AT18.

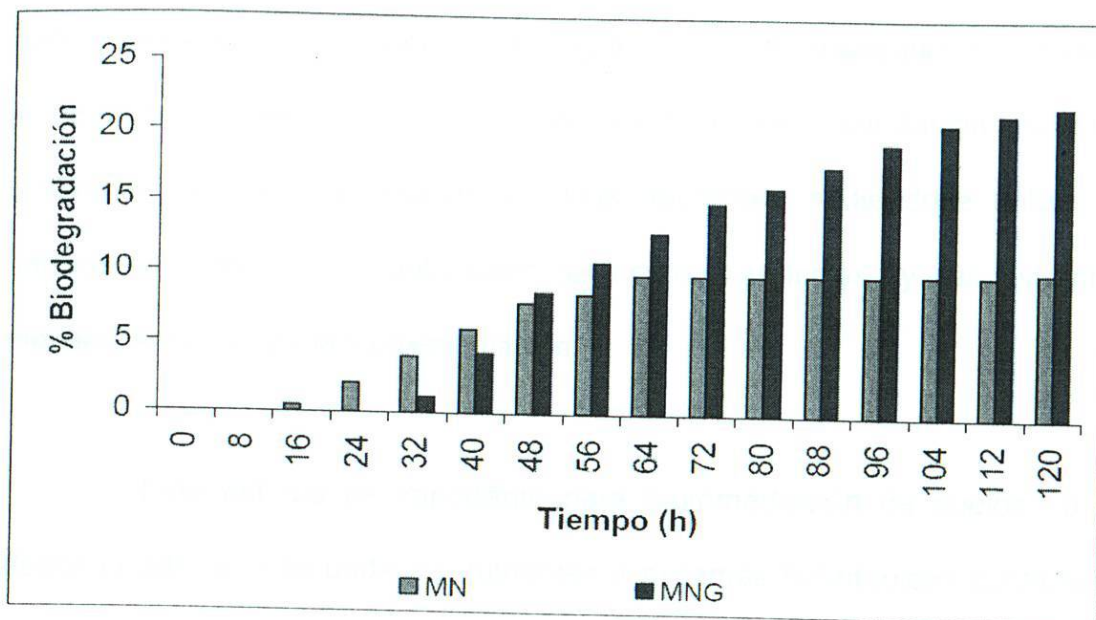


Fig 4 Degradación de naftaleno y naftaleno más glucosa por *Pseudomonas aeuroginosa* AT18.

### 1.8 Justificación.

En el país, la actividad agrícola es la principal actividad económica, por lo tanto, los residuos generados representan una cantidad importante de fuente de carbono para la producción de moléculas de interés industrial y ambiental. Por otra parte, la práctica de la quema de los residuos de la agricultura prevalecen en gran medida por la nula inversión que esto representa, sin embargo, se generan

problemáticas ambientales importantes que debido a nuestras condiciones geográficas, afectan ya a la salud en las temporadas de cosecha.

El aprovechamiento biotecnológico de estos “subproductos” de bajo costo, daría valor agregado a la agricultura, disminuyendo los problemas ambientales y generando moléculas orgánicas de importancia industrial y ambiental como es el caso de los biosurfactantes, pudiéndose utilizar como aditivos en alimentos, formulaciones de insumos agrícolas y secuestrantes de metales, si su uso es la biorremediación.

Este estudio es importante para bioremediación de suelos o agua, desde la adición adecuada de nutrientes a sistemas hidrofóbicos contaminados, puede mejorar la biodisponibilidad y por consiguiente su remoción.

Además, otra fuente de contaminación son los lípidos, los cuales causan muchos problemas en sistemas de conducción de aguas residuales y por consiguiente contaminan fuentes de agua así como también el medio ambiente. Especialmente, los lípidos acumulados en las trampas de grasas generan problemas sanitarios para su disposición. No obstante, el desarrollo de un microorganismo con alta actividad de degradación de lípidos es esencial para la solución de este problema.

## 1.9 Objetivo general

- La evaluación de hidrolizados hemicelulósicos provenientes de varios residuos de la agricultura (caña de azúcar y beneficio del café) y agroindustriales (harina de soya, girasol y piñón) como fuente de carbono en la obtención de biosurfactantes, utilizando cepas nativas de suelos contaminados por hidrocarburos (*Acinetobacter sp*).

### 1.9.1 Objetivos específicos

- Obtener los hidrolizados de las fuentes lignocelulósicas, variando el tiempo de reacción y catalizador utilizado.
- Aislar cepas de suelos contaminados por hidrocarburos generadoras de biosurfactantes.
- Obtener las condiciones de fermentación (composición del medio de cultivo) y generación de biosurfactantes utilizando las diferentes fuentes de carbono.

## 2.3 Estrategia de Trabajo Desarrollada

### CAPÍTULO 2

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Origen de los Reactivos

Las sales utilizadas en la elaboración de los medios de cultivo y el estándar de surfactante fueron adquiridos a Sigma-Aldrich. Los medios de cultivo son marca Dibico.

### 2.2 Material Biológico

Las semillas utilizadas para la elaboración de las harinas que fueron utilizadas como fuente de carbono, se adquirieron en un local comercial. El bagazo de caña fue colectado en el Ingenio Pujilic y el beneficio de café (arábica de porte alto) en el Rancho Guadalupe Tepeyac del municipio de Ocosingo, Chiapas.

## 2.3 Estrategia de Trabajo Desarrollada

Al inicio del desarrollo del trabajo experimental se contaba con una cepa de *Acinetobacter sp.* (AC1) aislada anteriormente, la cual se mantenía en medio de cultivo sólido en tubo conteniendo por litro 5 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.01 g de extracto de levadura, 0.2 g de  $\text{MgSO}_4$ , 1.5 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , y como única fuente de carbono 200 mg de fenol, todo esto a un pH de  $6.8 \pm 0.2$ , incubadas a una temperatura entre 28 y 30 °C. La reactivación de la cepa se realizó cada semana en medio sólido en tubo. Esta cepa fue utilizada para la evaluación de producción de surfactantes en medio líquido, utilizando diversas fuentes de carbono: Harina de piñón (*Jatropha curcas*), harina de soya (*Glycine max*) y harina de girasol (*Heliantus annuus*), además de bagazo de caña (*Saccharum officinarum*) y beneficio de café (*Coffea arabica* L.). La metodología de tratamiento previo de las fuentes de carbono se describe posteriormente.

En cada fermentación se evaluaron diferentes variables, biomasa, pH, concentración de surfactante por el método del ácido tioglicólico, tensión superficial, prueba de la gota y actividad emulsificante de hidrocarburos.

Por otra parte, se aislaron cepas nativas de suelo contaminado por hidrocarburos y se evaluó su producción de surfactante por el método del bromuro de cetil trimetil amonio. Se les realizó tinción de Gramm y algunas pruebas bioquímicas.



## 2.4 Métodos

### 2.4.1 Obtención de las Harinas

Las semillas utilizadas para la obtención de las harinas respectivas se descascararon y se molieron en un molino de mano marca Corona, posteriormente se hicieron pasar por un tamiz cuyo tamaño de malla era de 1mm, con esto, se homogenizó el tamaño de la muestra. Una vez tamizada, se realizaron determinaciones de contenido de grasas por el método Soxhlet. De acuerdo éste, se realizó el cálculo del peso de harina a utilizar, y se tomó de tal manera que ésta estuviera aportando el 2 % (fuente de Carbono) del peso total del medio a preparar.

### 2.4.2 Obtención de los Hidrolizados de Bagazo de Caña y Beneficio de Café.

La hidrólisis se realizó en tres etapas.

#### Etapas 1. Acondicionamiento de la materia prima

El bagazo de caña y el producto del beneficio de café se secaron a 80 °C durante 24 horas en una estufa de secado. Una vez transcurrido este tiempo se sacaron del horno y se dejaron enfriar completamente. Una vez a temperatura ambiente se molieron en un molino de mano y posteriormente se tamizaron a un tamaño de partícula de 1mm.

## Etapa 2. Hidrólisis ácida

Posteriormente se procedió a la hidrólisis ácida utilizando para esto ácido sulfúrico y nítrico para probar cuál de los dos ácidos generaba una hidrólisis con mejor rendimiento y un producto de más fácil manejo y limpio, para esto al residuo seco, molido y tamizado se adicionó una solución de ácido sulfúrico (o nítrico) al 2-3%, en una relación sólido/líquido de 1:30, esto debido a que tanto el bagazo de caña como la pulpa de café son muy voluminosos y el volumen de ácido no era el suficiente como para humedecerlos completamente. Una vez agregado el ácido se realizó el tratamiento térmico.

## Etapa 3. Tratamiento térmico

Se efectuó en una autoclave a 121 °C y 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se enfría rápidamente para detener la hidrólisis. Una vez que está completamente frío se neutralizó utilizando una solución de NaOH 3M para evitar el consumo de grandes volúmenes de otro agente neutralizante y la formación de precipitado abundante. Una vez llevado a pH  $7 \pm 0.2$ , se realizó la filtración utilizando papel filtro común.

Una vez que se prepararon las diversas fuentes de carbono (harinas y residuos agrícolas), se procedió a realizar fermentaciones utilizando diferentes concentraciones de los hidrolizados con la finalidad de elegir la concentración a la cual el microorganismo utilizado en la fermentación (*Acinetobacter sp.* AC1) creciera de manera favorable y por tanto generara una muy buena producción de nuestro metabolito de interés (biosurfactantes).

Las concentraciones que se ensayaron fueron las siguientes:

40/15, 40/10, 10%, 4% y 2% (v/v).

Estas concentraciones fueron tomadas de manera aleatoria, a excepción de la última que corresponde a la concentración utilizada con las harinas.

### **2.4.3 Preparación del Medio.**

A 1 L de agua destilada se agregaron diferentes sales minerales que se listan a continuación:  $\text{CaCl}_2$  3.5 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  774 mM,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  50 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  30 mM, EDTA 4mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  30 mM,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.4 mM a pH=6.8 (NaOH 0.3M). Un vez preparado el medio se agregaron las fuentes de carbono respectivas y previamente tratadas y se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 15 minutos.

### **2.4.4 Fermentaciones.**

Una vez preparado el medio de cultivo, se agregaron 150 mL de éste a matraces Erlenmeyer y se dejaron enfriar. Se realizaron tres repeticiones por cada fuente de carbono a utilizar. Posteriormente se inoculó el microorganismo (*Acinetobacter sp.*), y se mantuvo en agitación a 50 rpm y temperatura ambiente entre 28 – 30 °C durante 336 h (14 días). Durante ese tiempo, se tomaron alícuotas cada 48 h para realizar las determinaciones de las variables anteriormente señaladas.

## 2.4.5 Estimación De Biomasa.

### 1.- Por peso seco.

Una alícuota de 10 mL de la muestra fue tomada cada 48 h y centrifugada a 400 rpm durante 20 min. Las células depositadas en el fondo del tubo fueron secadas en un horno a 110 °C, para conocer su peso seco.

### 2.- Por Medición de Densidad Óptica.

Se mezclaron 1 mL de la solución de tartrato de sodio, 1mL de la solución de sulfato de cobre y 98 mL de la solución de carbonato de sodio para formar la solución alcalina de cobre. Se transfirieron varias colonias del cultivo en 10 mL de solución de agua estéril. Se mezcló y suspendieron las células. Posteriormente se prepararon una serie de estándares de albúmina disolviendo cantidades específicas de albúmina en agua destilada (0, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 mg/mL). Se transfirieron 0.1 mL de la suspensión bacteriana y de sus estándares a tubos de ensayo. Se añadió 0.1 mL de NaOH 0.5 N a cada muestra y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos, se añadió 1 mL de la solución alcalina de cobre, se mezcló bien e incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se añadieron 0.5 mL de la solución diluida de Folín-Cicalteau, mezclándose e incubado a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego de incubar, se midió la densidad óptica a 500 nm con el espectrofotómetro. El estándar de 0 mg/mL se utilizó como blanco. Se graficó la curva estándar utilizando la densidad óptica vs. la concentración de proteínas.

Esta curva estándar, se utilizó para estimar la concentración de proteínas en el medio de fermentación.

#### **2.4.6 Determinación de pH.**

Cada 48 h se tomaron 5 mL de medio líquido y se determinó el pH en un potenciómetro de mesa marca Oakton modelo 1600 a 28 °C.

#### **2.4.7. Estimación de Biosurfactante.**

Cada 48 h fue tomada una alícuota de 1 mL a la cual se le adicionó 4.5 mL de ácido sulfúrico (6:1 v/v). La mezcla fue calentada a 100 °C durante 10 min y enfriada a temperatura ambiente. Posteriormente a la mezcla se le adicionó 0.1 mL solución al 3% de ác. tioglicólico recién preparada, e incubada en la oscuridad durante 3 h La absorbancia fue medida a 400 y 430 nm en un espectrofotómetro marca Perkin Elmer modelo Lamda 2. La concentración de pentosas fue calculada utilizando la fórmula

$$P = [54.18(A_{400} - A_{430}) - 1.49]F$$

Donde A400 y A430 son lecturas a 400 y 430 nm, respectivamente, y F es el factor de dilución. Se preparó una curva estándar utilizando diferentes concentraciones de L-rhamnosa (Sigma) para determinar la concentración.

#### **2.4.8 Determinación de Actividad Emulsificante (E24).**

Fue determinada mediante la adición de volúmenes iguales de medio de cultivo libre de células e hidrocarburos (benceno y tolueno) y mezcladas con un vortex durante 2 minutos y dejándolos en reposo durante 24 h. La actividad emulsificante se determinó como el porcentaje de la altura de la capa emulsificada (mm) dividido por la altura total.

#### **2.4.9 Colapso De La Gota De Aceite.**

Fue realizada en un vidrio de reloj con 5 mL de aceite para autos y 2 gotas de medio de cultivo incubado durante 14 días, por triplicado. Como control se utilizó solamente medio de cultivo esterilizado. Se tomarón fotos a 0, 5, 10 y 15 minutos.

#### **2.4.10 Determinación de la Tensión Superficial.**

Se realizó utilizando un tensiómetro marca Fisher equipado con un anillo De Nuoy de platino con 6 cm de diámetro. Para incrementar la exactitud de la medición, se realizó por triplicado. Se tomaron alícuotas de 10 mL cada 48 h y la variación de la tensión superficial se midió directamente en el equipo previamente calibrado y con la muestra sin diluir. Se realizó una curva de calibración con estándar de Surfactin (Sigma-Aldrich) a 10 %, 20%, 30%, 40%, 50% y 70%, estas

concentraciones fueron elegidas ya que eran las que esperábamos que produjera el microorganismo durante la fermentación.

#### **2.4.11 Aislamiento de Cepas Productoras de Biosurfactantes.**

En este trabajo se utilizaron dos muestras de suelos arenosos, contaminados por petróleo y sus derivados, provenientes de talleres mecánicos establecidos, por lo menos, desde hace treinta años. Se empleó la técnica de enriquecimiento de cultivo. Se depositó 1.0 g de la muestra de suelo en un tubo de ensaye conteniendo 10 mL de agua estéril, el tubo se agitó vigorosamente durante 15 minutos. 1 mL de la suspensión obtenida fue agregada a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 50 mL de un medio de cultivo el cual contenía por litro  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  774 mM,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  50 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  30 mM, EDTA 4mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  30 mM,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.4 mM a pH=6.8 y glicerol al 4 % como fuente de carbono. Los matraces fueron mantenidos en incubación a temperatura ambiente (28-30 °C), con una agitación de 50 rpm por un tiempo de 96 h.

#### **2.4.12 Tinción de Gramm.**

Se realizó una extensión del cultivo obtenido en placa, para la tinción se utilizó la modificación de Hucker, la cual utiliza 30 segundos el cristal violeta, 30 segundos la solución iódica de Gramm (lugol + bicarbonato sódico diluido), de 1 a 5 segundos la solución decoloradora de alcohol-acetona (1:1), y 30 segundos de fucsina básica al 0,1-0,2%.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Contenido de Grasas en Harinas

Para conocer la cantidad a utilizar de las harinas de soya (*Glycine max*), girasol (*Heliantus annuus*) y piñón (*Jatropha curcas*) para la preparación del medio, se realizaron determinaciones por triplicado de contenido de grasas utilizando un equipo Soxhlet y hexano como disolvente. El promedio del contenido de aceite para cada semilla se presenta en la Tabla I.



**TABLA I**

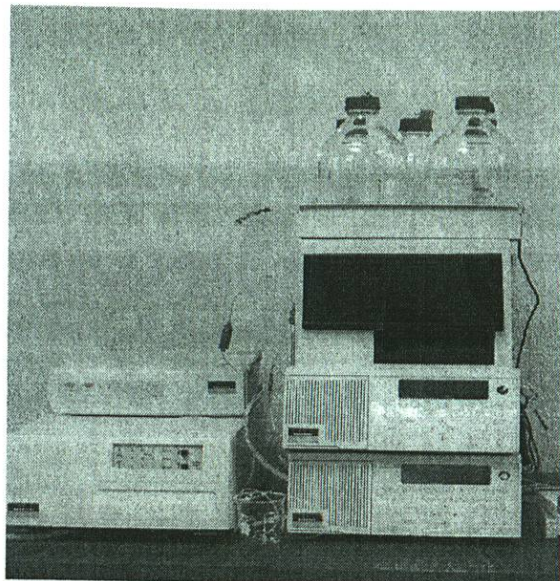
**CONTENIDO DE GRASAS EN LAS HARINAS UTILIZADAS COMO SUSTRATO**

<b>Tipo de Harina</b>	<b>Contenido de Grasas (%)</b>
Soya	22.63
Girasol	43.80
Piñón	54.96

En base a estos resultados se calculó la cantidad de harina (sustrato) a agregar al medio líquido, de tal manera que el aporte en peso de ésta al medio, fuera del 2 %. Como podemos observar en la Tabla I, la harina de piñón es la que presenta el mayor contenido de grasas.

**3.2 Obtención de Hidrolizados de Caña y Café.**

Para la obtención de los hidrolizados de caña (*Saccharum officinarum*) y café (*Coffea arabica* L.), se utilizaron ácido sulfúrico y ácido nítrico para evaluar con cuál de ellos y en qué condiciones se generaba mayor grado de hidrólisis. El grado de hidrólisis se cuantificó con la medición de la concentración de xilosa, arabinosa y glucosa utilizando un equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) marca Perkin Elmer modelo C756 y se ilustra a continuación.



Las concentraciones de las soluciones acuosas de ácido sulfúrico y nítrico fueron al 2 y 3 %, y los tiempos de tratamiento térmico a 121 °C y 15 lb/plg<sup>2</sup> de presión fueron de 30 y 60 min, los experimentos se realizaron por triplicado. Posteriormente se determinaron las concentraciones de xilosa, arabinosa y glucosa de cada uno de los experimentos, presentándose los promedios obtenidos en la Tabla II y III para el ácido nítrico y el ácido sulfúrico, respectivamente.

TABLA II

CONDICIONES DE REACCIÓN DE HIDRÓLISIS Y PORCENTAJE DE AZÚCARES OBTENIDOS EMPLEANDO HNO<sub>3</sub>

Residuo agrícola	HNO <sub>3</sub> (%)	Tiempo (min)	Xilosa (g/L)	Arabinosa (g/L)	Glucosa (g/L)
Bagazo de caña	2	30	5.82	32.46	7.47
		60	6.87	29.32	6.90
	3	30	9.18	36.98	3.58
		60	7.36	19.10	5.32
Pulpa de café	2	30	2.79	36.94	6.02
		60	3.81	27.57	4.93
	3	30	2.24	19.5	1.25
		60	3.90	17.42	4.20

TABLA III

CONDICIONES DE REACCIÓN DE HIDRÓLISIS Y PORCENTAJE DE AZÚCARES OBTENIDOS EMPELANDO H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Residuo agrícola	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	Tiempo (min)	Xilosa	Arabinosa	Glucosa
Bagazo de caña	2	30	6.01	39.13	8.50
		60	6.41	30.02	8.73
	3	30	<b>10.68</b>	<b>41.98</b>	<b>9.20</b>
		60	8.51	39.70	8.46
Pulpa de café	2	30	<b>3.99</b>	<b>47.80</b>	<b>9.71</b>
		60	3.85	29.04	4.99
	3	30	2.35	20.11	2.58
		60	3.92	19.64	4.22

Como podemos observar, el tratamiento con ácido sulfúrico generó las mayores concentraciones de azúcares obtenidos, siendo la concentración de 3% a 30 min las mejores condiciones de reacción para el caso del bagazo de caña y de 2% y 30 min para la pulpa de café.

### 3.3 Determinación de Biomasa por Densidad Óptica

De acuerdo a la metodología descrita, y con el objetivo de dar seguimiento al crecimiento microbiano, se obtuvieron los valores de concentración de biomasa por densidad óptica para las harinas, bagazo de caña y pulpa de café (Tabla IV).

**TABLA IV**

#### **DETERMINACIÓN DE BIOMASA UTILIZANDO LOS DIFERENTES SUSTRATOS**

<b>Sustrato</b>	<b>Biomasa (g/L)</b>
Harina de Soya	8.9
Harina de Girasol	5.7
Harina de Piñón	9.1
Bagazo de Caña	10.3
Pulpa de Café	7.2

Con estos resultados podemos ver que la harina de piñón es la que produce mayor cantidad de biomasa, en relación con el resto de las harinas, mientras que en los hidrolizados, es el de caña.

### 3.4 Determinación de Biomasa por Peso Seco

Desafortunadamente resultó muy difícil el filtrar el medio de cultivo en donde se utilizaban las harinas como sustrato, ya que conforme el tiempo de fermentación avanzaba, en todos los casos, la partícula de harina se iba haciendo más pequeña y mucho más difícil de separar, el papel filtro a secar y posteriormente pesar, contenía partículas de harina (Figura 5), por lo que esta determinación no fue posible realizarla de manera precisa.

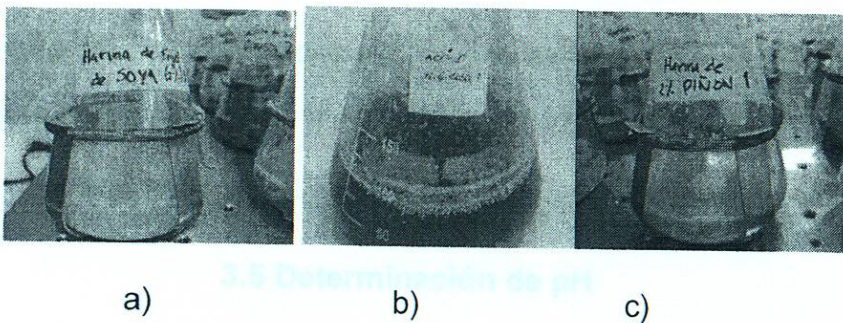


Fig. 5. Fermentaciones con harina de a) soya, b) girasol y c) piñón.

Por otra parte, la concentración de biomasa por peso seco para los residuos de caña y bagazo se puede observar en la Figura 6.

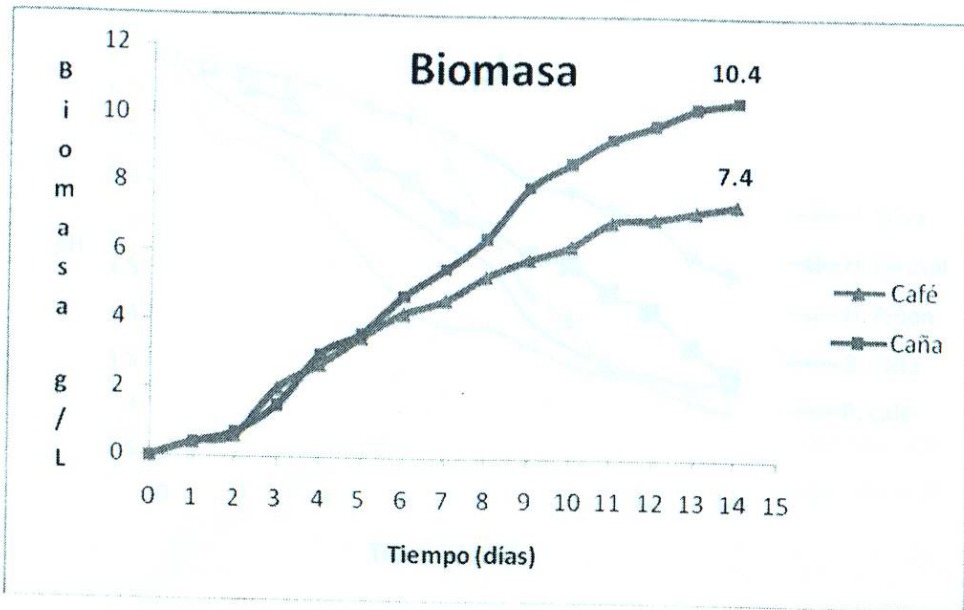


Fig. 6. Determinación de Biomasa por Peso Seco Utilizando como Sustrato Bagazo de Caña y Pulpa de Café.

Fig. 7. Determinación de pH

En la figura se observa que la fermentación con residuo de caña genera mayor cantidad de biomasa, esto está relacionado con la mayor concentración de azúcares cuantificados después del proceso de hidrólisis. Los valores de concentración de biomasa obtenidos por los dos métodos (densidad óptica y peso seco), son similares.

### 3.5 Cuantificación de Biosurfactante Utilizando Ác. Triglicídico

#### 3.5 Determinación de pH

Una de las metodologías directas para la cuantificación de biosurfactante. Con el uso de un potenciómetro de mesa marca Oakton, calibrado, se realizaron las mediciones de pH para todos los sustratos observándose su evolución durante los 14 días que duraron las fermentaciones. Estos valores pueden observarse en la Figura 7.

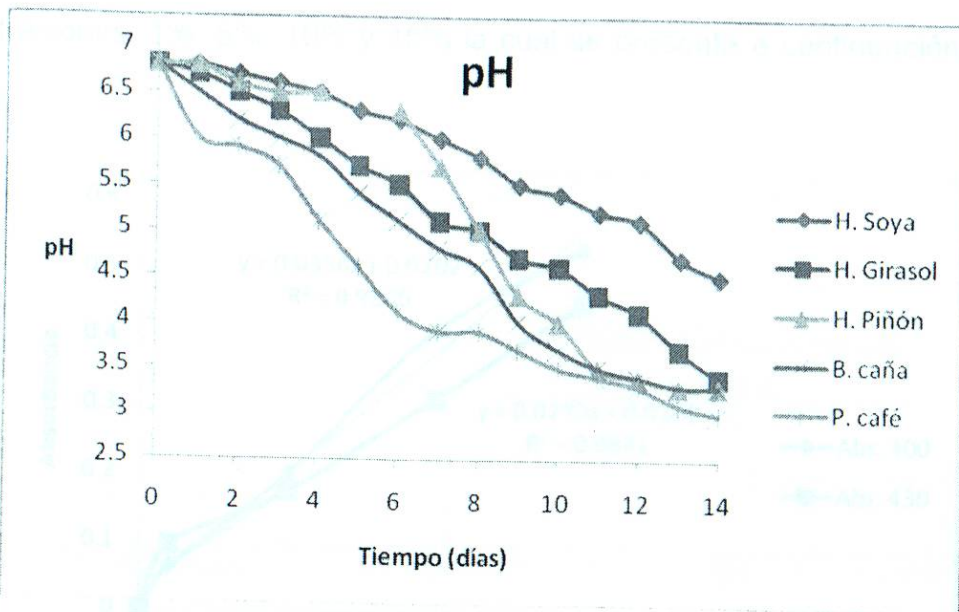


Fig. 7. Determinación de pH

Fig. 8. Curva de calibración de rhamnosa.

Se observa que, como está reportado, que el valor de pH disminuye por la producción de ácidos orgánicos (ác. láctico, ác. acético, entre otros), los cuales no fueron determinados ya que no es objetivo de este trabajo.

### 3.6 Cuantificación de Biosurfactante Utilizando Ác. Tioglicólico

Una de las metodologías descritas para la cuantificación de biosurfactantes es aquella en donde el ác. tioglicólico reacciona con este tipo de moléculas, generando un compuesto colorido que puede ser medido espectrofotométricamente. Para esta determinación se realizó una curva de calibración de solución acuosa de rhamnosa (Aldrich) a diferentes

concentraciones: 1%, 5%, 10% y 15% la cual se presenta a continuación (Figura 8).

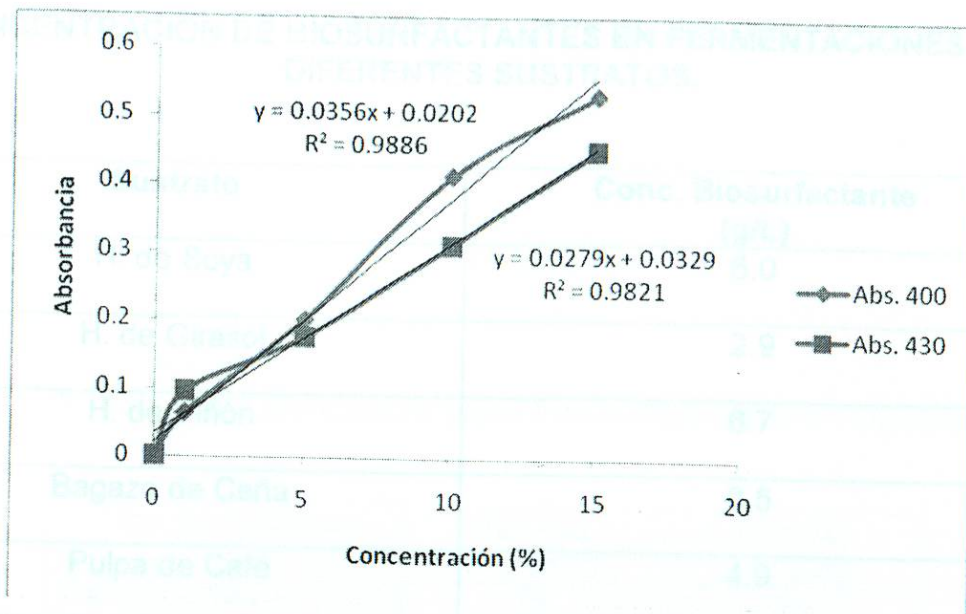


Fig. 8. Curva de calibración de rhamnosa.

A partir de ésta, se obtuvieron los valores de concentración de biosurfactantes generados por *Acinetobacter* y los diferentes sustratos generados. Las alícuotas fueron tomadas cada 24 h e inmediatamente procesadas. Las concentraciones observadas se encuentran en la Tabla V.

### 3.7 Determinación de la Actividad Emulsificante (E24)

Después de 14 días de fermentación, se realizó a todos los sustratos, la prueba de actividad emulsificante, en donde el biosurfactante generado, es capaz



**TABLA V**

**CONCENTRACIÓN DE BIOSURFACTANTES EN FERMENTACIONES CON DIFERENTES SUSTRATOS.**

Sustrato	Conc. Biosurfactante (g/L)
H. de Soya	6.0
H. de Girasol	2.9
H. de Piñón	6.7
Bagazo de Caña	8.5
Pulpa de Café	4.9

Se aprecia que en el caso de las harinas, la de piñón sigue siendo el mejor sustrato para la obtención de surfactante. En el caso de los hidrolizados, existe una relación entre el mayor contenido de carbohidratos en el de bagazo de caña y la producción de biosurfactante. Esto puede deberse a que hay una mayor cantidad de fuente de carbono disponible para el metabolismo del microorganismo.

**3.7 Determinación de la Actividad Emulsificante (E24)**

Después de 14 días de fermentación, se realizó a todos los sustratos, la prueba de actividad emulsificante, en donde el biosurfactante generado, es capaz

de emulsificar un hidrocarburo. Esta es una prueba importante ya que una de las aplicaciones que podrían tener los biosurfactantes, es la de biorremediación de suelo o agua contaminados con derivados del petróleo o disolventes no polares. Los valores de actividad emulsificante se presentan en la Tabla VI.

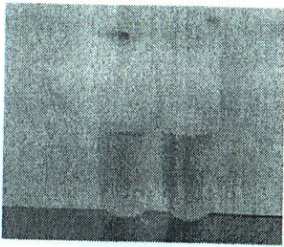
**TABLA VI**

**ACTIVIDAD EMULSIFICANTE (E24) PARA BENCENO Y TOLUENO**

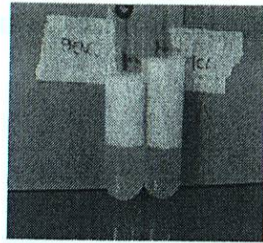
<b>Tipo de Sustrato</b>	<b>E24 (%) Benceno</b>	<b>E24 (%) Tolueno</b>
Harina de Soya	75	79
Harina de Girasol	81	87
Harina de Piñón	85	90
Hidrolizado de Bagazo de Caña	89	94
Hidrolizado de Pulpa de Café	70	73

Estos valores demuestran que, en el caso de las harinas, la de piñón presenta los mayores porcentajes con los dos hidrocarburos, y para el caso de los hidrolizados, el de bagazo de caña emulsificó el volumen total de los hidrocarburos, por lo que presentó valores mucho más altos comparados con los de la pulpa de café, lo cual está relacionado con la mayor concentración observada de biosurfactantes producidos durante la fermentación.

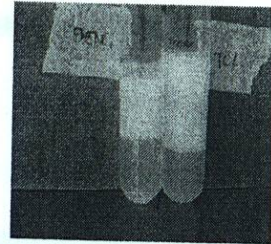
En la figura 9, se presentan fotografías de las pruebas realizadas.



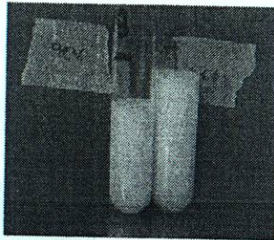
a) Harina de soya



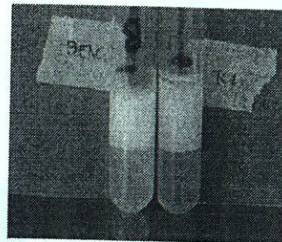
b) Harina de girasol



c) Harina de piñón



d) Bagazo de caña



d) Pulpa de café

Fig. 9 Actividad Emulsificante (E24)

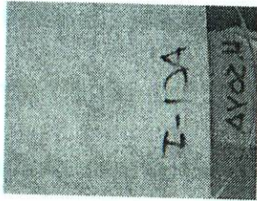
### 3.8 Colapso de la Gota

Mediante esta determinación cualitativa, se puede comprobar la formación de biosurfactante de una manera rápida y económica. Se agrega medio de cultivo inoculado a aceite, en esta ocasión se utilizó aceite de motor de autos marca Quaker State. Con el paso de los minutos se observa la deformación de la gota por la presencia de surfactante que modifica la tensión superficial del medio.

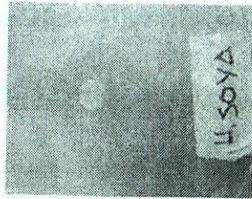
Fig. 10 A, B y C. Colapso de la gota

Se determinó en cada una de las fermentaciones, con todos los sustratos, tanto harinas como hidrolizados. En la figura 10 podemos observar cómo la gota de medio fermentado va modificando su forma.

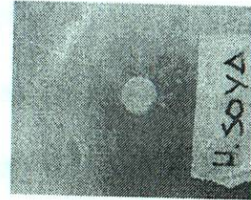
### Harina de Soya



a) 0 min



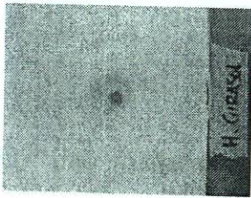
b) 5 min



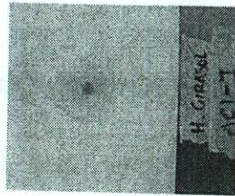
c) 10 min

Fig. 10 A

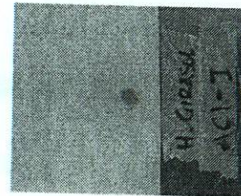
### Harina de Girasol



a) 0 min



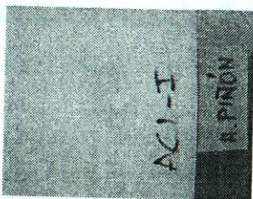
b) 5 min



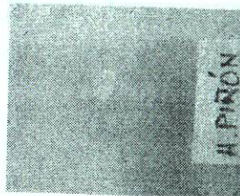
c) 10 min

Fig. 10 B

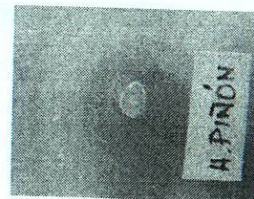
### Harina de Piñón



a) 0 min



b) 5 min



c) 10 min

Fig. 10 C

Fig. 10 A, B y C, Colapso de la gota

### 3.9 Determinación de Tensión Superficial

La medición de la tensión superficial de las muestras se realizó mediante el método del anillo utilizando un Tensiómetro Fisher equipado con un anillo de platino De Nouy, a temperatura ambiente. Los tensiómetros determinan la tensión superficial con la ayuda de un anillo óptimamente humedecido, suspendido de una balanza de precisión. En el método del anillo, este, se aproxima al líquido (medio de cultivo fermentado), hasta que hace el contacto con la superficie y esto se registra, se hace descender la muestra y el líquido produce con el anillo una "capa" muy delgada. La fuerza máxima necesaria para romper esta capa es la que se registra en el tensiómetro como tensión superficial.

Esta medición se realizó durante toda la fermentación para monitorear el cambio de tensión superficial que presentaba el medio, a medida que la fermentación avanzaba y los biosurfactantes eran generados. Los datos fueron calculados de la curva estándar realizada a soluciones acuosas Surfactin, un biosurfactante comercial proveniente de cepas de Bacillium, marca Aldrich, a concentraciones de 2, 5, 10, 15, 20 g/L. Los resultados obtenidos están en la Tabla VII.

TABLA VII

**TENSIÓN SUPERFICIAL DE LOS MEDIOS DE CULTIVO FERMENTADOS UTILIZANDO LOS DIFERENTES SUSTRATOS**

Sustratos	Tensión Superficial (mN/m)
Harina de Soya	4.7
Harina de Girasol	6.5
Harina de Piñón	4.0
Bagazo de Caña	2.9
Pulpa de Café	5.3

Los datos de tensión superficial coinciden con los de cuantificación de biosurfactante y con los de actividad emulsificante. La harina de piñón es la que presenta menores valores de Tensión Superficial comparada con el resto de las harinas, y el bagazo de caña en el caso de los hidrolizados. Esto indica que estos dos sustratos son los que producen mayor cantidad de biosurfactante, lo que hace que disminuya en mayor medida, la tensión superficial del medio.

Debido a sus diversas características, fueron tratadas como microorganismos diferentes. En cuanto a la morfología microscópica, se observó mediante tinción de Gram que todas las cepas mostraron ser cocobacilos gram-negativos.

### 3.10 Aislamiento de Microorganismos Productores de Biosurfactantes

A partir del aislamiento de microorganismos de muestras provenientes de suelo contaminado con hidrocarburos, se obtuvieron cinco cepas, cuyas características morfológicas se presentan a continuación (Tabla VIII).

TABLA VIII

#### MORFOLOGÍA COLONIAL DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

Nombre	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Color
R01	Circular	Entero	Convexa	Lisa, brillante	Blanca
R02	Circular	Entero	Convexa	Lisa, translúcida	Crema
R03	Circular	Entero	Convexa	Lisa, brillante	Incolora
R04	Circular	Entero	Convexa	Lisa, brillante	Amarilla
R05	Circular	Entero	Convexa	Lisa, brillante	Crema

Debido a sus diversas características, fueron tratadas como microorganismos diferentes. En cuanto a la morfología microscópica, se observó mediante tinción de Gram que todas las cepas mostraron ser cocobacilos gram-negativos.

### 3.11 Realización de Pruebas Bioquímicas

RESUMEN Para conocer el género al que pertenecen estas bacterias que presentaban diferencias en su morfología colonial, se realizaron diversas pruebas bioquímicas. Los resultados de éstas parecen indicar que todas pertenecen al género Acinetobacter, ya que todas se caracterizaron por ser coccobacilos Gram negativos, muchas veces dispuestos en pareja, no fermentan lactosa ni sacarosa, son aerobios, inmóviles, prueba catalasa positiva, prueba de oxidasa e indol negativa y prueba en urea negativa (Tabla IX).

LIA	H <sub>2</sub> S (-), descarboxilación de la lisina (+), fermentación (-)
Caldo Urea	(-)
Medio MIO	Movilidad (-)
Medio SIM	H <sub>2</sub> S(-), movilidad (-)
Caldo rojo fenol y sacarosa	Fermentación (-)
Catalasa	(+)

(+) Positiva, (-) negativa



**TABLA IX**

**RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICA APLICADAS A LAS CEPAS AISLADAS**

Prueba Bioquímica	R01, R02, R03, R04, R05
Agar Citrato de Simmons	(+)
Agar Hierro de Kligler	Fermentación (-), H <sub>2</sub> S (-)
Agar TSI	Gas (-), utilización de lactosa y/o sacarosa (-), glucosa (+)
LIA	H <sub>2</sub> S (-), descarboxilación de la lisina (+), fermentación (-)
Caldo Urea	(-)
Medio MIO	Movilidad (-)
Medio SIM	H <sub>2</sub> S(-), movilidad (-)
Caldo rojo fenol y sacarosa	Fermentación (-)
Catalasa	(+)

(+) Positiva, (-) negativa

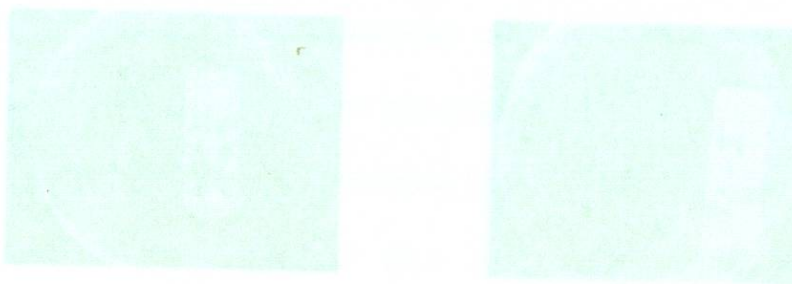


Fig. 11 Pruebas del Bromuro de Citrato aplicadas a cepas aisladas

### 3.12 Producción de Biosurfactantes. Prueba del Bromuro de Cetil Trimetil Amonio

#### Amonio

Para conocer si las cepas aisladas eran o no productoras de biosurfactantes, se realizó la prueba del bromuro de cetil trimetil amonio. En esta prueba, al medio de cultivo sólido, se le agregó como única fuente de carbono al glicerol, además de azul de metileno y cetil trimetil amonio. La bibliografía indica que si el medio de cultivo varía de color azul a amarillo, es una prueba de que los biosurfactantes son generados por los microorganismos.

En la siguiente figura (Figura 11) se puede apreciar que después de 48 horas de incubadas a 28 °C, el medio de cultivo se torna amarillo en la zona de la estría, siendo ésta una prueba de que estas cepas son productoras de biosurfactantes. Sin embargo, haría falta realizar todas las pruebas que se realizaron en este trabajo de tesis para tener una mayor certeza y para poder cuantificarlo.

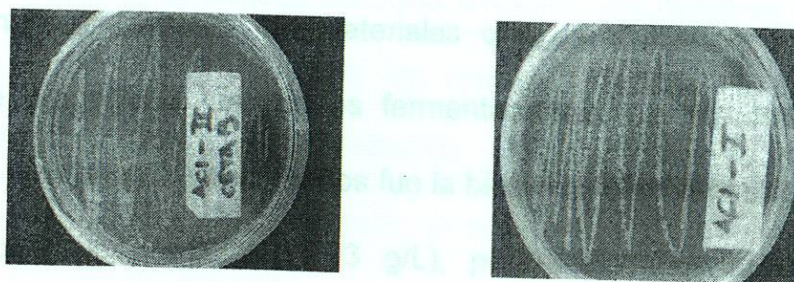


Fig. 11 Prueba del Bromuro de Cetil trimetil amonio a cepas aisladas.

## CAPÍTULO IV

### DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este estudio, inicialmente se trataron los materiales que se utilizaron como sustratos. En el caso de las harinas se secaron y se molieron, en el caso del bagazo de caña y la pulpa de café, se procedió a definir las condiciones de hidrólisis. De acuerdo a las concentraciones de glucosa, xilosa y arabinosa obtenidas de los hidrolizados, observamos que los mejores tratamientos resultaron ser, en los dos casos, con ácido sulfúrico, siendo la concentración de 3% a 30 min las mejores condiciones de reacción para el caso del bagazo de caña y de 2% y 30 min para la pulpa de café.

Una vez tratados los materiales que se utilizarían como fuente de carbono, se procedió a realizar las fermentaciones, cuantificándose diferentes parámetros. Uno de estos parámetros fue la biomasa, siendo el bagazo de caña el que produjo mayor cantidad (10.3 g/L), probablemente por la cantidad de azúcares. Es importante notar la cantidad producida por la harina de piñón (9.1 g/L), la segunda en producción de biomasa, ya que podría ser utilizada como

fuentes de carbono de muy bajo costo, para la producción de moléculas de alto valor agregado a partir de este desecho agroindustrial, y evitar así la contaminación generada por una mala disposición.

En el caso de determinación de pH, aunque todos tienen el mismo valor inicial, se nota un mayor descenso para cuando el sustrato fue pulpa de café. La harina de soya fue el sustrato que menor acidificación del medio produjo. Es probable que esta fuente de carbono genere menor concentración de ácidos orgánicos como el láctico, acético, entre otros. **hidrocarburos**

En cuanto a la producción de biosurfactante, observamos que el sustrato que mayor cantidad produce es el de bagazo de caña (8.5 g/L), seguido de la harina de piñón (6.7 g/L). Esto coincide con los valores de biomasa obtenidos, por lo que podemos decir que hay una relación directa entre estos dos valores.

En lo que se refiere a la determinación de la actividad emulsificante a las 24 horas, primeramente vemos que el tolueno es emulsificado en mayor grado que el benceno, además, el bagazo de caña presenta los mayores porcentajes. Si comparamos los valores de todos los sustratos, podemos comentar que la cantidad de biomasa, la concentración de biosurfactante y la actividad emulsificante tienen una relación directa, ya que se sigue la misma tendencia.

La Tensión Superficial es disminuida en mayor medida cuando en la fermentación se utiliza como sustrato bagazo de caña, y si observamos los

valores, aunque se hay una tendencia opuesta, podemos ver que a mayor biomasa, conc. de biosurfactante y actividad emulsificante, menor valor de tensión superficial, lo que está de acuerdo con lo esperado.

En cuanto al aislamiento de microorganismos y de acuerdo a las pruebas bioquímicas y tinciones de Gram que se realizaron, observamos que todas pertenecen al género *Acinetobacter*, y de acuerdo a la prueba del bromuro de cetil trimetil amonio se probó que se lograron aislar cinco cepas generadoras de biosurfactantes de suelos contaminados con hidrocarburos.

De acuerdo a los objetivos planteados podemos concluir que:

1. Se obtuvieron los hidrolizados de bagazo de caña y pulpa de café variando el tiempo de reacción y el ácido catalizador, ácido nítrico y sulfúrico, siendo el último el que dio el mejor resultado para ambos casos.

Para el bagazo de caña, la concentración de 3 % y 30 minutos de reacción y para la pulpa de café la de 2% y 30 minutos, ambas a 121 °C y 15 lb/pig<sup>2</sup> fueron las condiciones que generaron el mayor grado de hidrólisis, cuantificado por los azúcares liberados tras la reacción.

2. El sustrato que produjo la mayor cantidad de biomasa, concentración de biosurfactante y menor tensión superficial fue el hidrolizado de bagazo de caña, esto probablemente por la mayor cantidad de azúcares disponibles en el medio de fermentación.

de 100%. Los resultados de la prueba de Gram en que todos dieron positivo, la prueba de promoto de gelatina y amoníaco. Muchas pruebas bioquímicas y tinción de Gram se sugiere que todas pertenecen al género *Acetobacter*.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados podemos concluir que:

1. Se obtuvieron los hidrolizados de bagazo de caña y pulpa de café variando el tiempo de reacción y el ácido catalizador, ácido nítrico y sulfúrico, siendo el último el que dio el mejor resultado para ambos casos.  
Para el bagazo de caña, la concentración de 3 % y 30 minutos de reacción y para la pulpa de café la de 2% y 30 minutos, ambas a 121 °C y 15 lb/plg<sup>2</sup> fueron las condiciones que generaron el mayor grado de hidrólisis, cuantificado por los azúcares liberados tras la reacción.
2. El sustrato que produjo la mayor cantidad de biomasa, concentración de biosurfactante y menor tensión superficial fue el hidrolizado de bagazo de caña, esto probablemente por la mayor cantidad de azúcares disponibles en el medio de fermentación.

3. Se aislaron cinco cepas productoras de biosurfactantes ya que todas dieron positiva la prueba de bromuro de cetil trimetil amonio. Mediante pruebas bioquímicas y tinción de Gram se sugiere que todas pertenecen al género *Acinetobacter*.

### Bibliografía Consultada

- 1.- Abdel-El-Hakem, D. Substratum environment and microbiological applications. *African Journal of Microbiology* Vol. 2 (6), 11-14, 2002.
- 2.- Abalos, A. Producción de biosurfactante con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC aplicando la metodología de selección en consorcio. Caracterización y aplicación del producto. Tesis Doctoral Universidad de Zaragoza, 2004.
- 3.- Albert, J., Galbraith, J. Cuanto es mejor el agua dulce: Natural and human factors. *Journal of Great Lakes Research* Vol. 20, 204-210, 1994.
- 4.- Aboel, R. Microbial degradation: Significant bioremediation of oil spills. *Journal of Chemical Technology Biotechnology* Vol. 10, 145-151, 1991.
- 5.- Balba, M., Al-Awadhi, H., Al-Dhahir, A. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for monitoring performance and EAC evaluation. *Journal of Microbiological Methods* Vol. 72 (2), 195-204, 2004.
- 6.- Campt, C. Biodegradation of petroleum storage hydrocarbons. *Biodegradation* Vol. 1, 263-269, 1992.
- 7.- Hanson, P. Plant availability of terrigenous N in soil amended with a high dose of sewage sludge under drought conditions. *Energy and Fertility of Soils*, Vol. 40, (3), 109-115, 1987.
- 8.- Hama, O., Thompson, P. Tropical Saline Environments as Significant Indicators of Mercury and Organochlorine Use of Living Resources. *Environment, Development and Sustainability* Vol. 1 (3), 254-258, 1999.
- 9.- Harayama, S., Kishita, H., Kato, Y., Kuroki, D. Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of Marine Biotechnology Biotechnology* 1, 63-70, 1998.

## Literatura Consultada

- 1.- Abdel-El-Haleem, D. Acinetobacter: environmental and biotechnological applications, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 2 (4), 71-74, **2003**.
- 2.- Abalos, A. Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 aplicando la metodología de superficies de respuesta. Caracterización y Aplicación del producto. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, **2001**.
- 3.- Albert, J.; Guillén, J. Coastal changes in the Ebro delta: Natural and human factors, *Journal of Coastal Conservation*, Vol. 4(1), 2048-2056, **1994**.
- 4.- Atlas, R. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, Vol. 52, 149-156, **1991**.
- 5.- Balba, M., Al-Awadhi, N., Al-Daher, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation, *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 32 (2), 155-164, **1998**.
- 6.- Cerniglia, C. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Biodegradation* Vol. 3, 351-368, **1992**.
- 7.- Hanson, P., Plant availability of heavy metals in a soil amended with a high dose of sewage sludge under drought conditions, *Biology and Fertility of Soils*, Vol. 40, (5), 109-115, **1997**.
- 8.- Harris, O., Thompson, P. Tropical Coastal Organisms as Qualitative Indicators of Mercury and Organomercury for Sustainable Use of Living Resources , Environment, *Development and Sustainability*, Vol. 1, (2), 2545-2551, **1997**.
- 9.- Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., Kazuaki, S. Petroleum biodegradation in marine environments, *Journal of Molecular Microbiology Biotechnology* 1, 63-70, **1999**.



- 10.- López, H., Bonilla, A., Anthropogenically induced fish diversity reduction in Lake Valencia Basin, Venezuela, *Biodiversity and Conservation*, Vol. 9 (6), 234-245, **2002**.
- 11.- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. Brock, *Biology of Microorganisms* Pearson Education Inc., New Jersey, U.S.A. **1998**.
- 12.- Marin, M., Pedregosa, A., Laborda, F., Emulsifier production and microscopical study of emulsions and biofilms formed by the hydrocarbon utilizing bacteria *Acinetobacter calcoaceticus*, *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol. 44, (5), 60-667, **1996**.
- 13.- Pennell, K., Adinolfi, A., Abriola, L., Diallo, M. Solubilization of dodecane, tetrachloroethylene and 1,2-dichlorobenzene in micellar solutions of ethoxylated nonionic surfactants, *Environmental Science Technology*, Vol. 31, 1382-1389, **1997**.
- 14.- Pieper, D., Reineke, W. Engineering bacteria for bioremediation, *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 11, 262-270, **2000**.
- 15.- Prince, R., Drake, E. Transformations and Fate of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil. En: Adriano, D.C., Bollag, J. M., Frankenberger, W.T., Sims R.C. (Eds). *Bioremediation of Contaminated Soils*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, U.S.A. 89 – 110, **1999**.
- 16.- Rahman, K., Thahira-Rahmana, A., Lakshmanaperumalsamy, P., Banat, I., Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium, *Bioresource Technology*, Vol. 85, (3), 257-261, **2002**.
- 17.- Ron, E., Rosenberg, E. Biosurfactants and oil bioremediation, *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 13, 249-252, **2002**.
- 18.- Stelmack, P., Gray, M., Pickard, M. Bacterial Adhesion to Soil Contaminants in the Presence of Surfactants, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, (1), 163-168, **1999**.
- 19.- Thomassin-Lacroix, E., Eriksson, M., Reimer, K., Mohn, W., Biostimulation and bioaugmentation for on site treatment of weathered fuel in Arctic soil, *Applied Microbiology Biotechnology*, Vol. 59, 551-556, **2002**.
- 20.- Vasudevan, N., Rajaram, P., Bioremediation of oil sludge- contaminated soil, *Environmental International*, Vol. 26, (23), 409-411, **2001**.
- 21.- Venosa, A. Bioremediation treatability trials using nutrient application to enhance cleanup of oil contaminated shoreline, in proceedings 83rd. Air and waste management Association Annual Meeting in Pittsburg, 90-92, **1999**.



Av. Independencia No. 22-"A" Tlaxcala, Tlax. Centro  
Tel; y Fax. (01 246) 46 2 61 42 y Cel. (044) 246 45 90 750  
[tesislenny@hotmail.com](mailto:tesislenny@hotmail.com)  
¡Llame nosotros vamos!

