



**UNIVERSIDAD NACIONAL "PEDRO RUIZ GALLO"
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**Rendimiento de surfactantes producidos por *Pseudomonas*
spp. degradadoras de hidrocarburos de petróleo, 2015**

TESIS

Para optar el Título Profesional de:

LICENCIADO EN

BIOLOGÍA-MICROBIOLOGÍA-PARASITOLOGÍA

Presentado por:

Br. Hilda Vega Cruz

Br. Jesús Eduardo Rafael Ugaz Hoyos

LAMBAYEQUE-PERÚ

2016

**Rendimiento de surfactantes producidos por *Pseudomonas*
spp. degradadoras de hidrocarburos de petróleo, 2015**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA-MICROBIOLOGÍA-PARASITOLOGÍA**

APROBADO POR:

Dra. Gianina Llontop Barandarian

PRESIDENTE

Dr. Eduardo Julio Tejada Sánchez

SECRETARIO

Dr. Cesar García Espinoza

VOCAL

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

PATROCINADORA

LAMBAYEQUE, PERÚ

2016

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental más extendida a nivel mundial se atribuye a los hidrocarburos del petróleo, causada principalmente por derrames en la explotación, accidentes de cargueros, ruptura de tanques de almacenamiento, fugas en tuberías y accidentes de transporte. Los daños ocasionados por los derrames de hidrocarburos en las fuentes hídricas, suelo, aire, fauna y vegetación son difícilmente reversibles, debido a que los procesos de descontaminación no cubren todas las áreas afectadas y en ocasiones se realizan mucho tiempo después que el crudo contaminó el ecosistema. Los hidrocarburos en el suelo afectan las propiedades físicas y químicas como el pH, textura, permeabilidad, capacidad de soporte del crecimiento vegetal y causan impacto paisajístico (Ortega, 2012).

Las industrias que generan contaminación de suelos con hidrocarburos y derivados del petróleo son la petrolera, fábrica de gas, industria textil, estaciones de servicio, centrales termoeléctricas, minería, industria agropecuaria, floricultura, lavaderos de vehículos y mecánicas automotores (Ponce, 2014), requiriéndose el uso de técnicas para su eliminación, entre las que se considera la biorremediación. La remediación de sitios contaminados es el uso de microorganismos, capaces de degradar el petróleo y derivados, mediante las estrategias de bioaugmentación y bioestimulación; sin embargo, los contaminantes presentes en la fase líquida no acuosa (NAPL, por sus siglas en inglés) o absorbidos en la matriz del suelo no están disponibles, por lo que la tasa de degradación microbiana es

a menudo limitada por problemas de transferencia de masa (Riojas *et al.*, 2010).

Para favorecer la degradación de los hidrocarburos del petróleo y derivados, así como para facilitar su extracción de los yacimientos es importante aumentar su movilización y solubilización en medio acuoso, proponiéndose el uso de surfactantes. Estos compuestos sintetizados desde 1970 presentan actividad tensoactiva. Por su composición química pueden ser aniónicos, catiónicos y no iónicos, poseen propiedades emulsificantes y dispersantes y ayudan a disminuir los contaminantes del medio porque permiten la **desorción** de éstos en suelo y agua; no obstante, la mayoría son tóxicos y resistentes a la biodegradación (Riojas *et al.*, 2010).

Los surfactantes, sintetizados por las bacterias presentan bajos valores de concentración micelar crítica (CMC), gran actividad superficial, con adsorción gradual y actividad continuada, por lo que su eficacia se equipara y en algunos casos supera a los surfactantes químicos (Burgos, 2012). Además, son biocompatibles, de baja toxicidad y biodegradables; sin embargo, la producción es un proceso que no compite económicamente, por lo que se requiere aislar bacterias con un elevado rendimiento para disminuir los costos. Una eficiente estrategia es el aislamiento y caracterización de estas bacterias en lugares contaminados. Las especies de *Pseudomonas* son ubicuas, con versatilidad nutricional, simplicidad en las condiciones de cultivo y producen surfactantes reconocidos industrialmente; no obstante, en la región Lambayeque no existe disponibilidad de estos microorganismos que puedan ser utilizados para mejorar la biorremediación de ambientes impactados con petróleo o para la producción de biosurfactantes a gran escala y bajo costo.

Los lugares contaminados con petróleo como el lote IV de la empresa Interoil Perú S.A. en Talara, tienen una diversidad biológica que no ha sido investigada (Galindo & Llontop, 2015), para la búsqueda de *Pseudomonas* spp. degradadoras de petróleo productoras de surfactantes, adaptadas a las condiciones ecológicas y por lo tanto eficaces y eficientes. Se presenta una importante oportunidad para obtener *Pseudomonas* spp, que posteriormente puedan formar parte de un paquete tecnológico propio,

permitiendo la disminución de la dependencia técnica-económica del país y el desarrollo de las capacidades de la población peruana.

La selección de *Pseudomonas* spp. productoras de surfactantes, antes de ser incorporadas en los ambientes impactados, permitiría asegurar la efectividad y establecimiento frente a la microbiota nativa, a la vez que se beneficia la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo. En este contexto, se planteó la siguiente investigación, cuyo problema fue ¿Cuál es el rendimiento de surfactantes producidos por *Pseudomonas* spp. degradadoras de hidrocarburos de petróleo?

El objetivo general fue: Determinar el rendimiento de surfactantes producidos por *Pseudomonas* spp. degradadoras de hidrocarburos de petróleo. Los objetivos específicos fueron: Determinar las características químicas, microbiológicas y toxicidad del suelo contaminado con petróleo, aislar *Pseudomonas* spp. en suelo contaminado con petróleo, caracterizar *Pseudomonas* spp. según el tiempo requerido para la utilización del petróleo como fuente de carbono y energía, seleccionar *Pseudomonas* spp. productoras de surfactantes, producir y recuperar los biosurfactantes, determinar el rendimiento de biosurfactantes y determinar la actividad detergente y emulgente de los biosurfactantes obtenidos. La hipótesis planteada fue: *Pseudomonas* spp. degradadoras de hidrocarburos de petróleo alcanzan un rendimiento de bioma en producto mayor de 30%.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

Los biosurfactantes tienen baja toxicidad y son biodegradables. Se estudió la producción de biosurfactantes por bacterias fluorescentes del género *Pseudomonas* aisladas de emulsiones de petróleo pesado. Los compuestos fueron detectados mediante el registro de la disminución de la tensión superficial de los cultivos, su capacidad hemolítica y emulsificante. Se caracterizaron mediante determinación de azúcares y proteínas, así como también mediante espectroscopía de infrarrojo IRTF y espectroscopía de RMN. Se determinó que los aceites vegetales fueron los mejores sustratos para el crecimiento de las bacterias y producción de los biosurfactantes de tipo glicolípido, que formaron rápidamente emulsiones acuosas de petróleo pesado, disminuyeron la tensión superficial entre 28,51 y 30,5 dinas cm^{-1} y formaron emulsiones estables de parafina líquida en agua, durante varios meses, a temperatura ambiente (Sulbarán *et al.*, 2005).

El efecto de los biosurfactantes se investigó en la eficiencia de los procesos de recuperación de agua contaminada con crudo liviano. Se seleccionaron seis cepas de bacterias y se cultivaron en medio mínimo mineral y gasoil como fuente de carbono. Las bacterias MI9 y MI10, cuyo sobrenadante obtenido a las 144 horas fue más eficiente en la disminución de la tensión interfacial de una mezcla de gasoil-agua, fueron escogidas para la producción de surfactantes, durante 192 horas. Los tratamientos aplicados fueron: agua de lago, hidrocarburos, cultivo mixto de bacterias y biosurfactante (ANHCB), agua de lago esterilizada, hidrocarburos y cultivo

mixto (AEHC), agua de lago, hidrocarburos y cultivo mixto (ANHC), agua de lago, hidrocarburos y biosurfactante (ANHB) y agua de lago e hidrocarburos (ANH). Con ANHCB se alcanzó 81% de remoción de los hidrocarburos, concluyéndose que el uso de biosurfactantes incrementa la eficiencia en la biorremediación de aguas contaminadas con petróleo (Araujo *et al.*, 2008).

Los biosurfactantes son de gran importancia en la tecnología de biorremediación. Se investigaron 12 aislados de bacterias de suelo contaminado con petróleo, seleccionándose cuatro fijadoras de nitrógeno con capacidad de crecimiento en queroseno como única fuente de carbono. La producción de biosurfactantes fue evaluada por determinación de la tensión superficial (TS) e índice de emulsificación (IE_{24}). La variación de la producción fue atribuida a la especificidad metabólica de cada bacteria, alcanzando 0,35 y 0,5 gL⁻¹ de productividad. El análisis de cromatografía en capa fina (TCL) demostró que el surfactante pertenecía al grupo polimérico de los ramnolípidos. Se concluyó que las bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de suelos contaminados con petróleo producen biosurfactantes, para lo que son de utilidad para la tecnología de biorremediación (Pérez *et al.*, 2010).

Con el objetivo de investigar biotensioactivos bacterianos se colectaron diez muestras de suelo volcánico, aislando 54 bacterias y seleccionando *Sphingobacterium* sp. por su capacidad para disminuir la tensión superficial e interfacial del medio de cultivo. En el medio G-MSM suplementando con n-alcanos cultivado con *Sphingobacterium* se redujo la tensión superficial de 55 mN/m a 32 mN/m. Después de 48 horas se alcanzaron 3,8 mg de biomasa proteica mL⁻¹ y 190 mg L⁻¹ de extracto orgánico, constituido por lípidos (71,6%), carbohidratos (5,6%) y proteínas (4,4%). El porcentaje de emulsión (%E₂₄) del sobrenadante del medio de cultivo se mantuvo entre 60-70% durante 5 días y solo descendió (65-60%) después de 1 mes, considerándose un biotensioactivo con potencia industrial (Burgos *et al.*, 2011).

Con el objetivo de obtener bacterias productoras de biosurfactantes, para su aplicación en técnicas de recuperación mejorada de hidrocarburos vía microbiana (MEOR), se colectaron muestras de hidrocarburos de tres pozos. Se obtuvieron cinco consorcios de bacterias capaces de crecer a 30,

40 y 60 °C utilizando glicerol, kerosene y melaza como fuentes de carbono, obteniéndose la máxima producción de biosurfactantes a 40°C. Después, se aislaron siete colonias identificándose fenotípica y molecularmente *Pseudomonas aeruginosa*. El biosurfactante producido por esta bacteria redujo significativamente la tensión superficial del medio de cultivo, de 60 a 40 mN/m, con una concentración micelar crítica de 1112,5 mgL⁻¹. La producción de biosurfactantes purificado fue de 26 mg de ramnolípidos L⁻¹, termoestable a 50-121 °C durante 1 hora. Se concluyó que las bacterias puedan ser aplicadas en técnicas de MEOR en yacimientos maduros (Mondragón, 2011).

El uso de surfactantes que solubilizan fracciones de hidrocarburos contaminantes, representa una alternativa de aplicación para cualquier proceso tecnológico de remediación. Se investigó la actividad emulsificante de un biosurfactante de naturaleza ramnolipídica producido por *Pseudomonas aeruginosa* PB25 cultivada en glicerol como fuente de carbono. Se determinó una velocidad de crecimiento específica (μ) de 0,0351 h⁻¹, un tiempo generacional (t_g) de 19,75 h, una concentración máxima de 0,13 g de ramnolípidos por gramo de glicerol y 0,082 g L⁻¹ h⁻¹ de productividad. Se determinó un máximo de actividad emulsificante de 5,257 UAE mL⁻¹ frente a crudo de petróleo e índice de emulsificación (E_{24}) de 53,64, 62 y 84% para crudo de petróleo, petróleo diésel 2, gasolina y kerosene, respectivamente. Se concluyó que el surfactante puede ser utilizado en remediación de ambientes contaminados con petróleo (Giraldo, 2012).

En la zona de hundimiento de petróleo Prestigie, a 4000 m de profundidad se colectaron muestras de agua y sedimentos marinos, aislándose 113 bacterias entre las que se seleccionaron 18 productoras de exopolisacáridos con actividad emulgente. La caracterización fisiológica y molecular identificó *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Halomonas*, *Thalassospira*, *Pseudomonas* y *Pseudoaltermonas*. En la producción de bioemulgentes se obtuvo 1 gL⁻¹ con *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *Brevibacterium casei*, *Halomonas alkantarctica*, *H. variabilis*, *Pseudomonas fluorescens* y *P.grimontii*, alcanzándose 25% de emulsión frente a siete sustancias hidrófobas. Con base al índice de calidad bioemulgente se determinó que las

mejores características correspondieron al polímero de *Halomonas* spp., considerándose un alternativa como herramientas biotecnológicas (Uad, 2012).

2.2 Base teórica

Los tensioactivos, tensioactivos o surfactantes son moléculas anfipáticas, que se acumulan o absorben en las interfases gas/líquido (aire-agua), líquido/líquido (aceite-agua) o líquido/sólido (agua-superficie de sólidos) provocando descenso de la tensión superficial e interfacial del medio y a partir de determinada concentración tienden a formar agregados como micelas, bicapas y vesículas. Dependiendo de su origen, los tensioactivos pueden ser sintéticos y biológicos (Burgos, 2012).

En su estructura química, los surfactantes presentan dos regiones: fracción hidrofílica o cabeza polar, con fuerte afinidad por disolventes polares, sobre todo agua y fracción hidrofóbica o cola apolar, con mayor afinidad por disolventes orgánicos o apolares (Burgos *et al.*, 2011; Giraldo, 2012). La parte hidrofóbica puede estar constituida por cadenas hidrocarburadas, anillos hidrocarbonados saturados y anillos aromáticos y la parte hidrofílica por grupos polares de diferente naturaleza (Burgos, 2012). El carácter anfipático de los surfactantes, les confiere la capacidad de reducir la tensión superficial e interfacial de dos fases y formar microemulsiones de dos sustancias inmiscibles, donde los compuestos hidrofóbicos pueden solubilizarse con el agua o el agua puede solubilizarse en compuestos hidrofóbicos. Por estas características son excelentes detergentes, emulsionantes, espumantes y dispersantes (Mondragón, 2011).

Las fuerzas intermoleculares de cualquier líquido originan una membrana de tensión en la superficie, es decir en el interior de un líquido cada molécula está sometida a fuerzas de atracción en todas direcciones, que en promedio son anuladas; no obstante, las moléculas de la superficie solo son atraídas al interior y de esta manera se forma una especie de película superficial. En la actividad superficial e interfacial, las moléculas del surfactante son adsorbidas ordenadamente en la interfase del líquido, con la parte hidrófoba fuera de la fase acuosa y la parte hidrófila solvatada o

rodeada de agua. La adhesión progresiva de las moléculas del surfactante en la superficie de la solución acuosa provoca un cambio en las fuerzas de interacción de las moléculas del líquido en la superficie, se disminuye la carga de los enlaces entre las moléculas y se reduce la tensión superficial (Riojas et al., 2010; Burgos, 2012).

La efectividad de todo surfactante, está determinada por la reducción de la tensión superficial o medida de la energía libre de la superficie por unidad de área. Un buen surfactante puede reducir la tensión superficial del agua de 72 a 35 mN/m y la tensión interfacial (tensión entre líquidos polares y no polares) para el agua contra el n-hexadecano de 40 a 1 mN/m (Muthusamy *et al.*, 2008). La tensión superficial puede correlacionarse proporcionalmente con la concentración del surfactante en el medio, hasta que la concentración micelar crítica (CMC) es alcanzada es decir a medida que aumenta la concentración del surfactante, aumenta el número de monómeros de esta en la superficie, disminuyendo la tensión superficial hasta alcanzar un característico o CMC (Burgos, 2012).

La tensión superficial o tensión presente en la interfase líquido – aire es disminuida por los surfactantes debido a que interfiere en la formación de puentes de hidrogeno y otras fuerzas involucradas en la adhesión entre moléculas (Raiger & López, 2009). La tensión interfacial entre dos líquidos depende de la fuerza de cohesión entre las moléculas de cada líquido y de la fuerza de adhesión entre las moléculas de un líquido y otro. De esta manera, la tensión interfacial entre dos líquidos está relacionada con la tensión superficial de cada líquido saturado en el otro. Para disminuir la tensión interfacial, los surfactantes actúan como un "puente" formando una tercera fase de "microemulsión" que favorece la interacción entre la fase acuosa y la del hidrocarburo (Burgos *et al.*, 2011).

Desde el punto de vista fisicoquímico, cinco propiedades caracterizan a los tensioactivos: la CMC, la capacidad de formar agregados, la formación de cristales líquidos, la capacidad emulsionante y el balance hidrofílico – hidrofóbico: HLB (Burgos, 2012). También se considera que las propiedades de un tensoactivo son caracterizados principalmente por cuatro parámetros: CMC, número de agregación (n_a), HLB y punto de nube (PN). Estos parámetros indican el potencial del tensoactivo como agente

emulsificante y de superficie, determinando su aplicación principalmente a nivel industrial y ambiental (Jiménez *et al.*, 2010)

La concentración micelar crítica (CMC) es la cantidad mínima de tensioactivo que produce el descenso máximo de tensión superficial o mínima concentración necesaria para la iniciación de la formación de micelas, o concentración de surfactante por debajo de la cual, se forman las micelas espontáneamente. En la CMC, la interfase se encuentra saturada de tensioactivo y las moléculas se agregan para formar estructuras. A valores inferiores a la CMC, el surfactante en solución se encuentra en forma de monómeros en la interfase agua – aire, mientras que a valores mayores, se encuentra en fase micelar (Jiménez *et al.*, 2010).

Los dos parámetros fundamentales que definen a un tensioactivo son la eficacia, que corresponde a la máxima disminución de tensión superficial o tensión interfacial que produce y la eficiencia que es medida por la CMC. Los buenos surfactantes para la industria son aquellos que tienen una baja CMC y por lo tanto se requiere una menor cantidad de surfactante para reducir la tensión superficial (Burgos, 2012; Giraldo, 2012).

Los tensioactivos pueden formar agregados (formación de agregados) simples (un tensioactivo) o mixtos (varios tensioactivos) mediante interacciones intermoleculares no covalentes. Los agregados más característicos son las micelas esféricas, vesículas, bicapas y micelas inversas. En las micelas esféricas la región hidrófoba del tensioactivo se orienta hacia el interior del agregado, en la micelas inversas el grupo hidrófilo es el que se orienta hacia el interior; la bicapa es una doble capa de moléculas con la región hidrofóbica hacia el interior y la hidrófila hacia el exterior y las vesículas son estructuras esféricas que contienen bicapas de tensioactivos y núcleo acuoso (Burgos, 2012). El número de agregación (n_a) indica el promedio de moléculas de surfactante que se encuentran formando las micelas. Los agregados micelares tienen 20–100 nanómetros, con un radio aproximado de 1,5 – 30 Å (Jiménez *et al.*, 2010).

Conforme la concentración del tensioactivo se incrementa, las micelas se agrupan en una estructura ordenada y forman una fase o cristal líquido liotrópico. Las principales fases liotrópicas son la laminar, hexagonal normal, hexagonal inversa y cúbica y se presentan mayoritariamente en la

formulaciones farmacéuticas y cosméticas, como sistemas de liberación controlada de principios activos (Burgos, 2012).

Los tensioactivos presentan capacidad emulsionante es decir pueden estabilizar (emulsionar) o desestabilizar emulsiones aceite con agua (O/W) y agua con aceite (W/O). Una emulsión es una mezcla de dos líquidos inmiscibles de manera más o menos homogénea, en la que un líquido (fase dispersa) es dispersado en otro: fase continua o dispersante (Burgos, 2012).

El balance hidrofílico e hidrofóbico (HLB por sus siglas en inglés) representa el porcentaje en peso de la parte hidrofílica e hidrofóbica y está directamente relacionada con la solubilidad, formación de emulsiones y manejo de los tensioactivos. El HLB representa numéricamente el predominio de la parte hidrófila de la molécula en una escala de 0 a 20. También se define como un valor que representa la capacidad de un surfactante para formar emulsiones estables en sistemas agua–aceite o aceite–agua, al compararse con valores estándar establecidos para los surfactantes ácido oleico (HLB=1) y oleato de sodio (HLB=20). Valores cercanos a 1 indican que el surfactante forma emulsiones estables en sistemas agua – aceite y valores cercanos a 20 en sistemas aceite – agua (Jiménez *et al.*, 2010).

Con base al HLB, los tensioactivos se aplican como antiespumantes (HLB 1 – 3,5), emulgentes para sistemas agua – aceite (HLB 4 – 6), agentes humectantes (HLB 7 – 9), emulgentes para sistemas aceite – agua (HLB 8 – 18), detergentes (HLB 13 – 15) y solubilizantes (HLB 10 – 18). El oleil – soforolípido con un HLB de 7 – 8 es un excelente agente humectante de piel. Surfactantes con un mayor HLB como es el caso de los Tweens (80, 60, 20) dan lugar a una mayor solubilidad (Jiménez *et al.*, 2010; Riojas *et al.*, 2010; Burgos, 2012). El HLB también se define como un parámetro empírico que describa la cuantificación relativa de la fracción hidrofílica en el peso de la molécula de surfactante. Los surfactantes con valores de 3 – 6 son lipofílicos y con valores de 10 – 18 son HLB hidrofílicos (Riojas *et al.*, 2010).

El efecto punto de nube (PN) se define como la temperatura a la cual el surfactante, generalmente no iónico, pierde su solubilidad en una solución acuosa, la cual a nivel macroscópico presenta una apariencia turbia,

es decir, en forma de nube. Al incrementarse la temperatura, la solubilidad de los surfactantes decrece gradualmente y las moléculas no solubles rompen el equilibrio existente entre las del surfactante y las del agua, formando superagregados de surfactante, lo cual provoca un cambio de fase y genera turbidez (Kim *et al.*, 2006).

Los parámetros CMC, n_a , HLB y PN caracterizan a los surfactantes, por su capacidad para solubilizar compuestos poco solubles, formar emulsiones entre fases inmiscibles, humectar superficies hidrófobas y determinar la temperatura a la cual se da un cambio en las propiedades del surfactante. Los surfactantes sintetizados por vía química o sintéticos, según su estructura hidrofílica o grupo polar pueden subclasificarse en iónicos y no iónicos. Los iónicos en su estructura hidrofílica presentan grupos funcionales con cargas eléctricas negativas (aniónicos) o positivos (catiónicos), mientras que los no iónicos no presentan carga (Jiménez *et al.*, 2010). También son clasificados en catiónicos, aniónicos, no iónicos y zwitteriónicos y son caracterizados por su balance hidrofílico-lipofílico (HLB). Los compuestos solubles en agua presentan un alto HLB y los compuestos solubles en aceite un bajo HLB (Mondragón, 2011).

Los surfactantes aniónicos presentan carga negativa en el grupo polar, son moléculas con cationes orgánicos e inorgánicos (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Mg^{+2} , NH_4^+) y en su parte hidrofílica contienen los grupos aniónicos ($-\text{COO}^-$, $-\text{SO}_3^-$, $-\text{O}-\text{PO}_3^{2-}$) unidos a la fracción orgánica. La mayoría son alquil-carboxilatos o jabones, sulfonatos o detergentes en polvo y sulfatos o agentes espumantes. Los tensioactivos catiónicos presentan cargas positivas en el grupo polar, en su mayoría constituidas por sales de amonio cuaternario o bien sales de alquilaminas, con propiedades antiestáticas, suavizantes y desinfectantes. Los tensioactivos anfóteros presentan grupos aniónicos y catiónicos, como los aminoácidos, betainas y fosfolípidos, son estables en sistemas ácidos y alcalinos y se les usa en productos cosméticos. Los tensioactivos no iónicos presentan grupos hidrofílicos del tipo alcohol, fenol, éter o amida y no se ionizan en solución acuosa, por ejemplo el Tween y Span o ésteres de sorbitan etoxilados y no etoxilados, respectivamente (Mondragón, 2011; Burgos, 2012).

2.2.1 Biosurfactantes

Los biosurfactantes (BS) son moléculas anfipáticas producidas por bacterias, hongos y levaduras. La parte hidrofílica puede estar constituida por: aminoácidos, péptidos aniónicos o catiónicos y carbohidratos y la parte hidrofóbica por ácidos grasos saturados o insaturados (Jiménez *et al.*, 2010). Los biosurfactantes son producidos con hidrocarburos como sustratos, estando la producción asociada al crecimiento; no obstante, también pueden ser producidos a partir de carbohidratos como metabolitos secundarios, durante la parte final de la fase logarítmica o durante la fase estacionaria (Giraldo, 2012).

Los biosurfactantes pueden ser de bajo y alto peso molecular. Los BS de bajo peso molecular son generalmente glicolípidos, lipopéptidos, lípidos polioles, fosfolípidos, ácidos grasos y sulfonolípidos que tienden a disminuir la tensión superficial e interfacial del medio. Los BS de alto peso molecular son polisacáridos, proteínas, lipoproteínas y lipopolisacáridos que estabilizan las emulsiones, pero que no presentan una reducción significativa de la tensión superficial e interfacial del líquido en que se encuentran (Raiger & López, 2009; Riojas *et al.*, 2010; Burgos, 2012; Cortés & Barragán, 2013).

Al igual que los surfactantes sintéticos (SS), los biosurfactantes tienen propiedades emulsificantes, dispersantes, impermeabilizantes, suavizantes, lubricantes y humectantes. Reducen la tensión superficial e interfacial entre sólidos, líquidos y gases. Los microorganismos los producen con dos finalidades. La primera es romper la tensión superficial e interfacial entre fase líquido/líquido, gas/líquido y sólido/líquido. Por ejemplo los BS producidos por *P.aeruginosa* disminuyen la tensión superficial del agua destilada de 72mN/m hasta 25mN/m. La segunda finalidad es formar micelas. Ambas permiten incrementar la transferencia de masa, tal que las fuentes de carbono de baja solubilidad estén disponibles para su degradación. Asimismo, al establecer un equilibrio de desorción-solubilización, facilitan los procesos de transporte y biodegradación (Yañez & Wong, 2013).

A diferencia de los surfactantes sintéticos, los BS son clasificados por la composición química del grupo polar. Los glicolípidos son los más

conocidos. Son carbohidratos unidos a una larga cadena de ácidos grasos o hidroxácidos grasos, mediante enlaces éter o grupos éster. Los más conocidos son los ramnolípidos, trehalolípidos y soforolípidos. Los lipopeptidos están constituidos por un lípido unido a una cadena peptídica destacando la surfactina como uno de los biotensioactivos más poderosos. Los fosfolípidos y ácidos grasos son producidos en grandes cantidades por bacterias y levaduras en presencia de n-alcenos. Los biosurfactantes poliméricos tienen alto. Los biosurfactantes poliméricos están constituidos por diversos grupos químicos, destacando el emulsán y liposán. Los biosurfactantes particulados son vesículas celulares microbianas con actividad surfactante como los de *Serratia* y cianobacterias (Jiménez *et al.*, 2010).

La mayoría de bacterias, levaduras y mohos poseen un metabolismo capaz de producir biosurfactantes; no obstante, estos compuestos mayoritariamente son producidos por bacterias, destacando *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia rubidea* (ramnolípidos), *Rhodococcus erythropolis*, *Mycobacterium* spp., *Arthrobacter* spp., *Nocardia* spp. (trehalolípidos), *Torulopsis bombicola*, *Candida apicola* (soforolípidos), *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *Lactobacillus* spp., *B. brevis*, *B. polymyxa* (lipopéptidos), *Acinetobacter calcoaceticus* (emulsán) y *Candida lipolytica* (liposán), entre otros (Riojas *et al.*, 2010; Burgos, 2012; Jiménez *et al.*, 2010).

Los microorganismos utilizan una amplia variedad de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía para su crecimiento. Cuando estos sustratos son parcialmente solubles o insolubles en agua, se sintetizan los biosurfactantes para disponer de la fuente de carbono. Las principales funciones de los biosurfactantes son: emulsificación y solubilización de compuestos insolubles en fases acuosas facilitando su disponibilidad para el crecimiento y mantenimiento; adherencia y liberación de células en superficies; actividad antibiótica y mejora del transporte de hidrocarburos a nivel de la membrana celular. Por su parte, los biosurfactantes tienen una aplicación potencial en el sector ambiental y de recuperación de crudo, así como en el área agrícola, farmacéutica, de alimentos y cosméticos (Jiménez *et al.*, 2010; Burgos, 2012; Yañez & Wong, 2013).

Las especies del género *Pseudomonas* destacan por su capacidad para producir biosurfactantes glucolípidos, especialmente ramnolípidos. La biosíntesis por *P.aeruginosa* (Figura 1) ocurre a través de tres etapas secuenciales: i) la enzima Rh1A es involucrada en la síntesis del dímero de ácido graso (HAAs) del ramnolípidos; ii) la ramnosiltransferasa Rh1B que se encuentra unida a la membrana usa dTDP-L-ramnosa y la molécula de HAAs como precursores, para formar el monoramnolípidos y iii) estos monoramnolípidos son sustratos, junto con la dTDP-L-ramnosa de la ramnosiltransferasa Rh1C para producir diramnolípidos (Jiménez *et al.*, 2010).

La producción de ramnolípidos por *P. aeruginosa* depende de factores nutricionales y ambientales, incluyendo limitaciones de nitrógeno, pH, y temperatura. La biosíntesis ocurre durante la fase exponencial tardía y la fase estacionaria de crecimiento, típicamente bajo las condiciones de limitación de nitrógeno y fosfatos. Los ramnolípidos reducen la tensión superficial del agua de 72 mN/m a 30 mN/m y la tensión interfacial del agua/aceite de 43 mN/m a valores menores de 1 mN/m. Los ramnolípidos emulsifican hidrocarburos y estabilizan emulsiones (Jiménez *et al.*, 2010; Burgos, 2012).

Los métodos para la detección de bacterias productoras de biosurfactantes son: 1) método asimétrico para el análisis de la gota colapsada (ADSA), 2) estimación colorimétrica bajo el principio que los tensoactivos aniónicos reaccionan con el catión indicador formando un color característico, 3) prueba en la que una gota de agua se colapsa cuando es adicionada a una suspensión bacteriana productora de biosurfactante o su modificación, en la que una gota de suspensión bacteriana es depositada en una superficie cubierta de aceite y las gotas que contienen surfactante se colapsan y las que no contienen permanecen estables, 4) cromatografía directa en capa fina, 5) reducción de la tensión de la superficie de una solución, 6) detección de la actividad hemolítica, 7) método de dispersión en aceite, 8) ensayo de emulsificación, 9) índice de emulsificación, 10) ensayo de turbidez y 11) métodos moleculares para identificar los genes involucrados en la síntesis de biosurfactantes (Jiménez *et al.*, 2014).

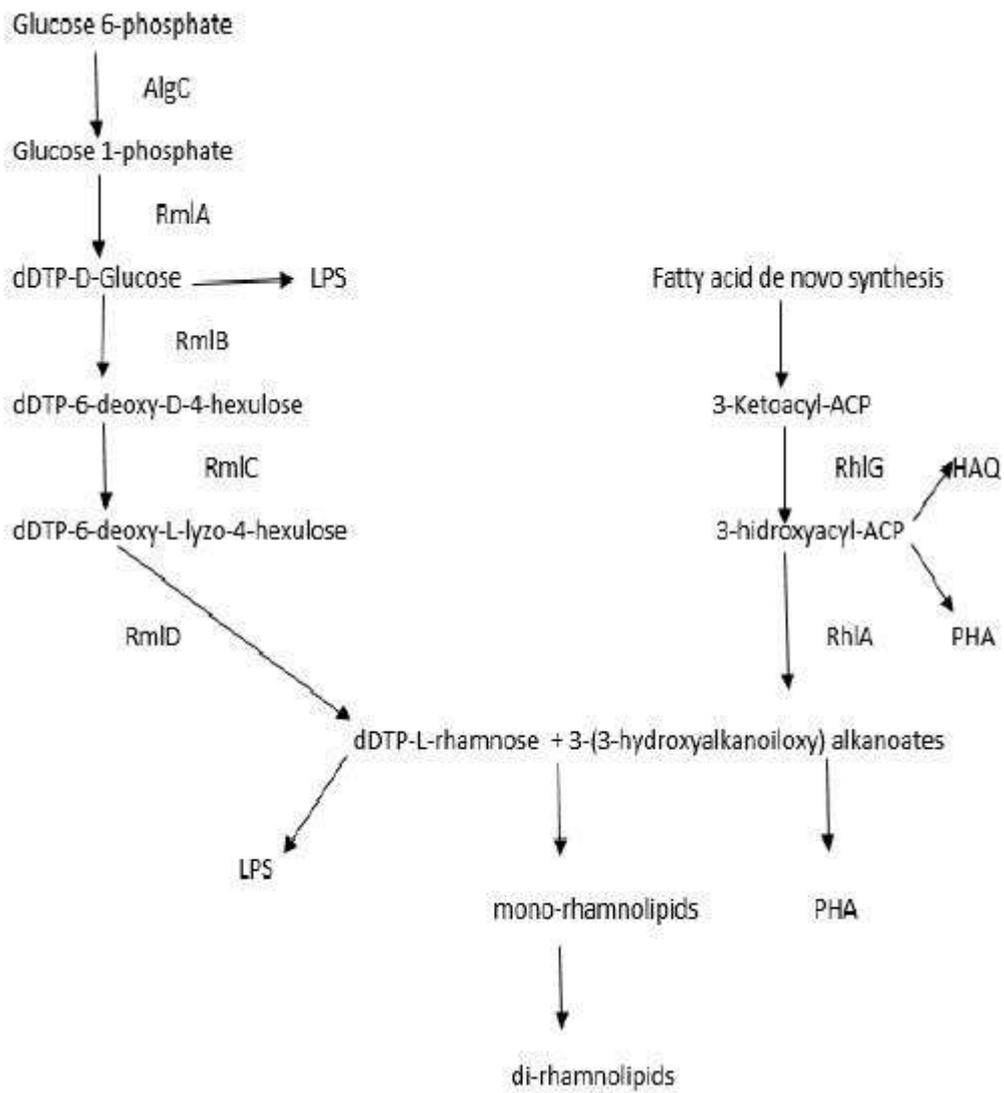


Figura 1. Biosíntesis de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* (Jiménez *et al.*, 2010).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico

Suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, *Pseudomonas* spp. degradadoras de petróleo, semillas de *Raphanus sativus* L. "rabanito".

3.2 Población y muestra de estudio

La población estuvo constituida por el suelo contaminado con petróleo en el lote IV de la Empresa Interoil Perú S.A. en la provincia de Talara, región Piura y se investigaron 54 muestras, colectadas en agosto de 2014. El número de muestras fue calculado según la fórmula mencionada por Vázquez *et al.* (2012), tomando en cuenta un estudio piloto realizado por los investigadores, en el que se determinó una prevalencia de 90% (Anexo 1).

3.3 Métodos

3.3.1 Variables en estudio

Variables cuantitativas: Tiempo para la utilización del petróleo como fuente de carbono y energía, diámetro del halo de dispersión, concentración de biomasa, rendimiento de surfactantes.

3.3.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

El trabajo de investigación descriptivo se ejecutó en dos fases contrastándose la hipótesis, con el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt (1986), mencionado por Vázquez *et al.* (2012). En la primera fase se determinaron las características químicas y microbiológicas del suelo contaminado, se aislaron e identificaron *Pseudomonas* spp. y se caracterizaron las *Pseudomonas* spp. degradadoras de petróleo. En la segunda fase se determinó el rendimiento de surfactantes producidos por *Pseudomonas* spp. degradadoras de hidrocarburos de petróleo.

3.3.3 Primera fase: Aislamiento y selección de *Pseudomonas* spp. degradadoras de hidrocarburos de petróleo

a) Lugar de muestreo

Para el aislamiento de bacterias degradadoras de petróleo se tomaron muestras de suelo contaminado en la provincia de Talara, región Piura (Figura 2), registrándose la posición de los puntos de muestreo (Tabla 1), con un GPS GARMIN eTrex Vista HCx. Talara se encuentra al noroeste de la ciudad de Piura y está comprendido entre los paralelos 4°35'00" de latitud sur y 1°16'00" de latitud oeste. La zona presenta un clima desértico subtropical árido, con una temperatura máxima de 32 °C y una temperatura mínima de 18 °C en invierno, con un promedio anual de 21 °C (Municipalidad Provincial de Talara, 2014).

b) Obtención de muestras de suelo

Las muestras de 1 kg de suelo contaminado con petróleo, se colectaron y depositaron en bolsas de plástico debidamente etiquetadas, e inmediatamente se transportaron en un envase térmico (10°C ± 1°C), para su procesamiento en el laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, en Lambayeque.

c) Análisis químico y microbiológico de muestras de suelo

En el laboratorio se tomaron submuestras de 50 g de cada unidad de muestreo, obteniéndose dos muestras compuestas de 2600 Kg, con las que se realizó el análisis químico y microbiológico y se determinó la toxicidad de los contaminantes del suelo.

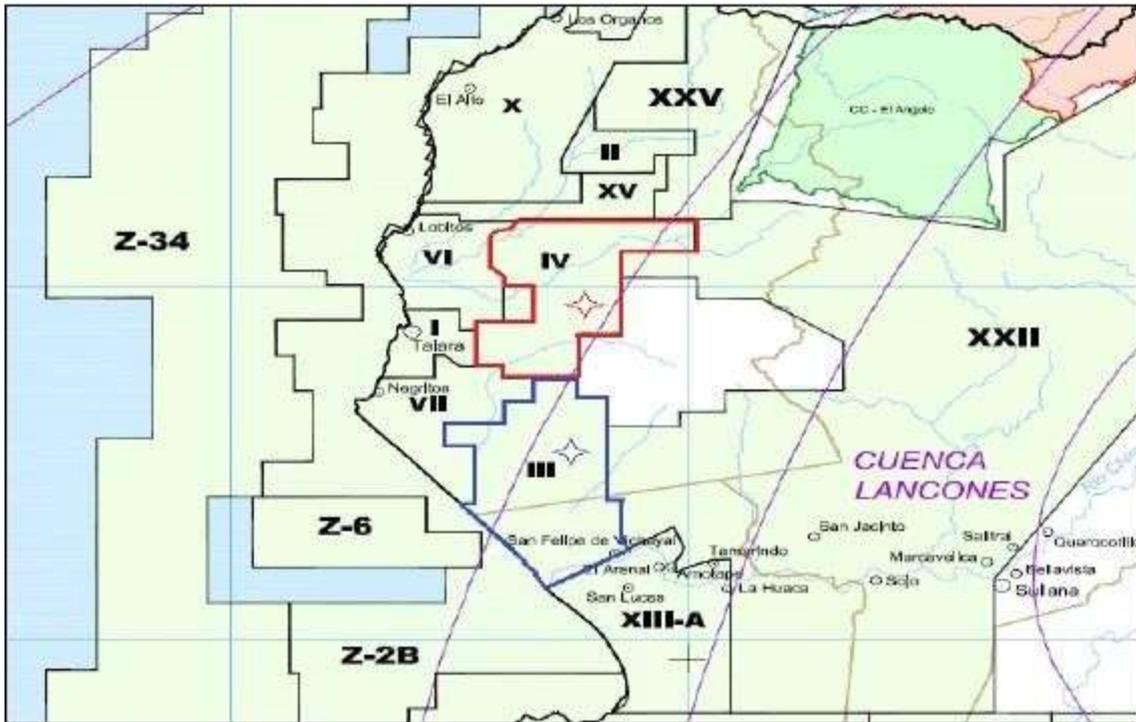


Figura 2. Ubicación del lugar de muestreo correspondiente a los lotes III y IV de la Empresa Interoil Perú S.A. en la provincia de Talara, región Piura (<http://www.perupetro.com.pe/wps/wcm/connect/d9f1197d390f4315a976b8adfb02133/ONO+Nov+2014.pdf?MOD=AJPERES>).

Tabla 1. Posición de los puntos de muestreo de los suelos contaminados con petróleo crudo en el lote IV de la empresa Interoil Perú S. A. en Piura, 2014

Punto	Posición	Punto	Posición	Punto	Posición
1	0484343 9506351	19	0484353 9506323	37	0484345 9506335
2	0484337 9506351	20	0484350 9506322	38	0484345 9506336
3	0484339 9506350	21	0484348 9506320	39	0484345 9506336
4	0484538 9506357	22	0484346 9506321	40	0484357 9506334
5	0484342 9506355	23	0484342 9506335	41	0484345 9506336
6	0484347 9506356	24	0484342 9506335	42	0484345 9506336
7	0484348 0506354	25	0484342 9506335	43	0484345 9506336
8	0484351 9506347	26	0484342 9506335	44	0484345 9506336
9	0484354 9506346	27	0484359 9506323	45	0484345 9506336
10	0484354 9506341	28	0484342 9506335	46	0484345 9506336
11	0484355 9506340	29	0484342 9506335	47	0484345 9506336
12	0484355 9506340	30	0484342 9506335	48	0484345 9506336
13	0484358 9506332	31	0484342 9506335	49	0484345 9506336
14	0484359 9506331	32	0484342 9506335	50	0484345 9506336
15	0484360 9506326	33	0484342 9506335	51	0484345 9506336
16	0484361 9506323	34	0484351 9506350	52	0484345 9506336
17	0489356 9506323	35	0484345 9506336		
18	0484355 9506325	36	0484345 9506336		

La obtención de submuestras se realizó según el método de “cuarteo y amontonamiento” (Ayasta & Bernable, 2012). Las muestras de suelo se depositaron en un papel bond, para separar las piedras y disgregar las partículas gruesas. El volumen del suelo del extremo inferior derecho se mezcló cinco veces con el superior izquierdo, el inferior izquierdo con el superior derecho, el superior con el inferior y el derecho con el izquierdo (Figuras 3, 4).

En el submuestreo, se formó un “montón” con el suelo en cada cambio de posición y una vez homogenizadas las muestras se tomaron las submuestras requeridas. El análisis químico del suelo contaminado se realizó en una submuestra de 1 Kg, determinándose la cantidad de hidrocarburos totales (HTP) en el laboratorio de la empresa Quimpetrol Perú, EIRL, en Piura, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), utilizando un cromatógrafo de gases modelo 6890N (Net Work GC system) y un espectrómetro de masas modelo 5975 inert XL (Agilent Technologies).

Para el análisis microbiológico en las muestras, se tomaron por triplicado submuestras de 10 g (Figura 5), determinándose el número de microorganismos totales y degradadores de hidrocarburos o hidrocarbonoclasticos mediante la técnica del número más probable (Viñas, 2005; Llanos, 2012). Las submuestras de suelo se depositaron en frascos con 90 mL de solución salina, NaCl 0,85%, (p/v), obteniéndose suspensiones, con las que se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-7} (Figuras 6, 7).

Para determinar el número más probable de microorganismos totales, 1mL de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} se inocularon por triplicado (Figura 8), en tubos de 150 x 20 mm conteniendo 5 mL de caldo nutritivo (Anexo 2), incubándose a 28 °C hasta por 10 días. Para determinar el número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos, 1mL de diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} se inocularon por triplicado en tubos con 5 mL de caldo Bushnell Haas e inmediatamente después en cada tubo se vertieron 0,025 mL (25 µL) de petróleo crudo liviano como fuente de carbono (Figura 9).



Figura 3. Muestras de suelo contaminado con petróleo crudo liviano.



Figura 4. Técnica del cuarteo y amontonamiento de muestra de suelo contaminado.



Figura 5. Submuestras de suelo contaminado para el análisis microbiológico.



Figura 6. Suspensión de suelo contaminado en solución salina esterilizada.



Figura 7. Diluciones decimales de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo.



Figura 8. Dilución de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo sembrado en caldo nutritivo.



Figura 9. Dilución de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo sembrado en caldo Bushnell Hass.

Los tubos se incubaron a 28 °C hasta por 10 días y se consideró como positivo a la presencia de microorganismos totales e hidrocarbonoclasticos la turbidez del medio de cultivo, realizándose el cálculo correspondiente según el método estándar mencionado por Huapaya (2011).

d) Toxicidad de contaminantes de suelo

La toxicidad de los contaminantes de las muestras de suelo investigado, se determinó por triplicado en submuestras de 10 g (Salas & Meza, 2011). Se utilizaron semillas de rabanito, a las que previamente se les determinó el porcentaje de germinación. En cinco placas de Petri, con papel esterilizado y humedecido con agua destilada esterilizada se depositaron 20 semillas por placa (Figura 10), se taparon y se mantuvieron a temperatura ambiente (28 °C), humedeciéndolas interdiariamente, hasta obtener el máximo de germinación (Figura 11), que fue 99 % después de 120 horas.

En tres frascos de vidrio de 250 mL de capacidad conteniendo 90 mL de solución salina esterilizada (NaCl 0,85% p/v), se depositaron 10 g de suelo y se homogenizaron durante 20 minutos, obteniéndose suspensiones del suelo contaminado. En simultáneo, en doce placas de Petri, se depositaron 10 g del suelo correspondiente, se vertieron 12 mL del sobrenadante de la suspensión previamente obtenida y con una pinza se depositaron 25 semillas en cada placa. Éstas se cubrieron con papel bond durante 120 horas, a 28°C y después de 48 horas, se vertieron 3 mL adicionales del sobrenadante, para mantener la humedad requerida.

A las 120 horas se contaron las semillas germinadas y se midió la longitud de las radículas emergidas. El porcentaje de germinación relativo (PGR), crecimiento relativo de la radícula (CRR) e índice de germinación (IG) fueron calculados (Llanos, 2012) según las siguientes fórmulas:

$$PGR = \frac{\text{Número de semillas germinadas en el suelo contaminado} \times 100}{\text{Número de semillas germinadas en el control positivo}}$$



Figura 10. Placas de Petri con semillas de *Raphanus sativus* L. sobre papel esterilizado y humedecido.



Figura 11. Prueba de germinación de *Raphanus sativus* L. "rabanito".

$$\text{CRR} = \frac{\text{Longitud promedio de radículas en el suelo contaminado} \times 100}{\text{Longitud promedio de radículas en el control positivo}}$$

$$\text{IG} = \frac{\text{PGR} \times \text{CRR}}{100}$$

Donde:

PGR = Porcentaje de germinación relativo

CRR = Crecimiento relativo de radícula

IG = Índice de germinación

La fitotoxicidad se determinó con el criterio de interpretación utilizado por Rodríguez (2012): IG \geq 80 % indica que no hay sustancias fitotóxicas o están en muy baja concentración, 80 % > IG > 50% se interpreta como presencia moderada de estas sustancias y un IG \leq 50% indica una fuerte presencia de sustancias fitotóxicas, criterios correspondientes a niveles de fitotoxicidad bajo, moderado y severo, respectivamente.

e) Aislamiento e identificación de *Pseudomonas* spp.

Las bacterias heterótrofas cultivables de las muestras de suelo contaminado se enriquecieron, depositando 10 g de cada una en 90 mL de caldo Bushnell Haas más 5 mL (5%) de petróleo crudo. Después de la incubación a 30 °C, durante 7 días, con agitación diaria durante 10 minutos, se tomaron por triplicado alícuotas de 0,1 mL y se sembraron mediante la técnica de agotamiento y estría en agar nutritivo y Mac Conkey (Anexo 2) y se incubaron a 30 °C, durante 24 horas (Galindo & Llontop, 2015).

Las colonias desarrolladas en el agar nutritivo se agruparon según sus características morfológicas y se seleccionó una representante de cada morfotipo. En el agar Mac Conkey se seleccionaron las colonias de bacterias no fermentadoras de lactosa (Figura 12). Con todas las bacterias aisladas se realizaron tinciones de Gram y se cultivaron en agar Tripticasa Soya (TSA) y Bushnell Haas con 5 % de petróleo crudo, constituyendo los cultivos puros (Figura 13), que después de la incubación se guardaron en refrigeración a 8 °C.



Figura 12. Bacterias heterótrofas desarrolladas en agar Mac Conkey.



Figura 13. Cultivos de bacterias heterótrofas aisladas de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo.

La identificación fenotípica del género *Pseudomonas* (Barba & Bravo, 2013; Brenner *et al.*, 2015), se realizó con base a las características fenotípicas, mediante las pruebas de oxidasa, motilidad en medio semisólido (SIM), fermentación de carbohidratos en agar hierro triple azúcar (TSI), susceptibilidad a la polimixina – B, 300 UI y producción de pigmento fluorescente en agar King B. Para su mantenimiento, las bacterias fueron sembradas en agar Trypticase soya, durante 24 horas y luego fueron llevadas a refrigeración (8 °C), realizándose subcultivos cada 30 días.

f) Caracterización de *Pseudomonas* spp. degradadoras de hidrocarburos de petróleo

Las bacterias del género *Pseudomonas* aisladas de suelo contaminado con petróleo se investigaron, considerándose degradadoras aquellas que utilizaron el petróleo como fuente de carbono y energía (Galindo & Llontop, 2015).

En la determinación del tiempo requerido para la utilización de petróleo como fuente de carbono y energía, las *Pseudomonas* spp. cultivadas en agar Bushnell Haas con petróleo, fueron inoculadas por triplicado en 5 mL de caldo Bushnell Haas con indicador púrpura de bromocresol, en los que se agregó 1% (0,05 mL ó 50 µL) de petróleo crudo, incluyéndose tres tubos con caldo de cultivo no inoculado como testigo. La incubación se realizó a 30 °C, hasta por 240 horas con agitación manual, diaria por 10 minutos y en simultáneo se investigó el viraje del indicador del lila al amarillo, que se interpretó como positivo para la utilización del petróleo como fuente de carbono y energía. Cuando se observó crecimiento bacteriano, pero no viraje del indicador se consideró un tiempo mayor de 240 horas.

3.3.4 Segunda fase: Rendimiento de surfactantes producidos por *Pseudomonas* spp. degradadoras de hidrocarburos de petróleo

La selección de bacterias productoras de surfactantes se realizó mediante la prueba de dispersión de gota (Sulbarán *et al.*, 2005; Mondragón, 2011) que permite detectar el biosurfactante, debido a un halo de emulsión formado sobre una capa de hidrocarburo. La cantidad de biosurfactante

producido es directamente proporcional al diámetro del halo de emulsión formado.

a) Prueba de dispersión de gota

Los cultivos de *Pseudomonas* spp. degradadoras de hidrocarburos de petróleo se sembraron por triplicado en 1mL de medio mínimo salino de Davis con 1% v/v de glicerol (Anexo 2), incubándose a $30^{\circ}\text{C} \pm 2$, durante 24 horas, con agitación manual (5') cada 4 horas, para obtener el inóculo bacteriano (Sulbarán *et al.*, 2005). Éste fue inoculado por triplicado en 5 mL de los mismos medios, incubándolos a 30°C , durante 72 horas, con agitación manual (5') cada 12 horas (Figura 14).

Los medios cultivados se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos y los sobrenadantes se utilizaron para la prueba de dispersión de gota. En placas de 90 mm de diámetro se depositaron 10mL de agua destilada y sobre ellos se vertieron 0,5mL de petróleo crudo liviano, cuidadosamente y en toda la superficie, tratando que se forme una capa homogénea (Figuras 15, 16, 17). Estas placas de Petri se colocaron sobre papel milimetrado (Figura 18). En simultaneo se acondicionaron jeringas de 1mL a las que les adaptaron "tips" previamente esterilizados (121°C por 15 minutos en autoclave) con los que se tomaron gotas (10 μL por gota) del sobrenadante y aproximadamente a una altura de 20cm se depositaron los 10 μL en 1/3 de la superficie (Figura 19). Este proceso se repitió tres veces, constituyendo las repeticiones para cada cultivo bacteriano y después de 5 minutos, se midió (mm) el diámetro del halo de dispersión formado con los 25 cultivos de *Pseudomonas* spp. que alcanzaron los mayores diámetros en el halo de emulsión se repitió la prueba de dispersión de gota, midiéndose el diámetro de los halos al inicio (0 minutos) y transcurrido 30 minutos.

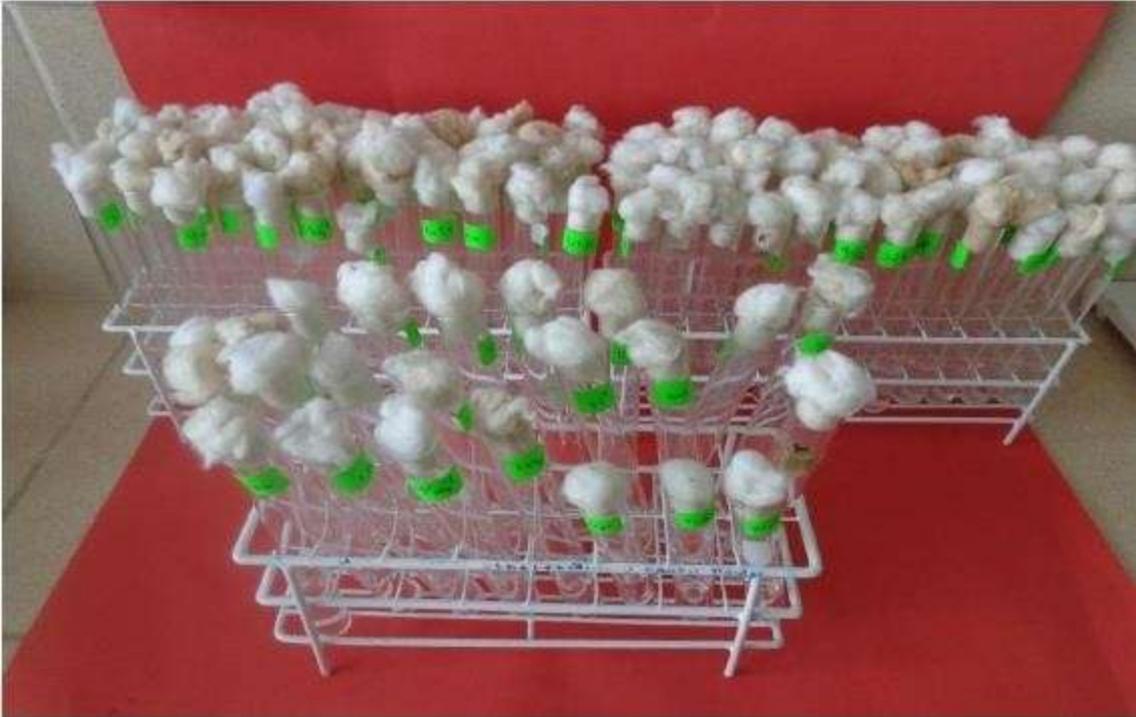


Figura 14. Caldo mínimo salino de Davis, inoculado con *Pseudomonas* spp. aisladas de suelo contaminado con petróleo.



Figura 15. Placas de Petri con agua destilada para la prueba de dispersión en gota.



Figura 16. Adición de petróleo crudo liviano sobre agua destilada en placas de Petri.



Figura 17. Placas de Petri con agua destilada y capa superficial homogénea de petróleo crudo liviano.



Figura 18. Papel milimetrado debajo de placas de Petri con agua destilada y petróleo crudo liviano.



Figura 19. Adición de sobrenadante de cultivo bacteriano para la prueba de dispersión de gota.

b) Rendimiento de surfactantes

Las bacterias productoras de surfactantes fueron cultivadas en medio mínimo salino de Davis y después de 72 horas se cuantificó la biomasa y el surfactante y se calculó el coeficiente de rendimiento $Y_{p/x}$.

b.1 Proceso productivo

Las 25 bacterias seleccionadas se cultivaron en 300 mL de medio mínimo salino de Davis con 1% v/v de glicerol (Figura 20), incubándose durante 4 días a $30^{\circ}\text{C} \pm 2$, con agitación constante manual (5') cada 12 horas (Sulbarán *et al.*, 2005). Diariamente, se realizó la prueba de dispersión según la metodología descrita en el ítem 3.3.4 a.

b.2 Cuantificación de biomasa por turbidimetría

Para cuantificar la biomasa por turbidimetría (Guzmán & Hurtado, 2011) a 600 nm (DO_{600}), inicialmente se obtuvo la curva patrón entre densidad óptica y biomasa seca. Cada bacteria desarrollada en agar mínimo salino, a 30°C , por 24 horas, se cultivó en 5 mL de medio mínimo salino, hasta alcanzar 10^7 cel mL^{-1} (tubo N° 1 del nefelómetro de MacFarland). Se colectaron submuestras de 4 mL de cada cultivo bacteriano, totalizando 100 mL. A continuación, se tomaron 4 mL, tres para determinar por triplicado la absorbancia a 600 nm (tubo 1) y otro para realizar diluciones decimales hasta 10^{-3} (tubos 2, 3,4), a los que también se determinó su absorbancia. Los 96 mL restantes de caldo mínimo salino fueron centrifugados a 3500 rpm, durante 30 minutos.

El sedimento o biomasa fue lavado en solución salina esterilizada, después centrifugado y deshidratado a 42°C (Figura 21), hasta alcanzar peso constante. La biomasa deshidratada fue pesada y el valor obtenido fue expresado en gramos por litro (gL^{-1}), correspondiendo a la absorbancia del tubo 1. Asimismo, el valor de la biomasa se dividió entre 10,100 y 1000, correspondiendo a la absorbancia de los tubos 2, 3 y 4 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). Con los valores de biomasa y absorbancia, se obtuvo la ecuación de regresión, con la que se calculó la concentración de biomasa de cada bacteria investigada cultivada en medio mínimo salino de Davis por un tiempo determinado y una absorbancia determinada a 600 nm.



Figura 20. Medio mínimo salino de Davis cultivado con *Pseudomonas* spp. degradadoras de petróleo.



Figura 21. Biomasa de *Pseudomonas* spp. en estufa.

b.3 Recuperación y cuantificación del biosurfactante

Para la recuperación del surfactante producido (Pérez *et al.*, 2010; Burgos *et al.*, 2011), el cultivo bacteriano se centrifugó a 3500 rpm, durante 20 minutos. El extracto crudo libre de células se acidificó hasta alcanzar un pH 2, mediante la adición de HCl 1N (Sulbarán *et al.*, 2005) y se dejó en reposo en refrigeración por 48 horas después se centrifugó nuevamente a 5000 rpm, por 20 minutos a 4 °C. El biosurfactante se recuperó en una pera de decantación, en la cual se vertieron inicialmente 100 mL del sobrenadante, añadiéndose inmediatamente 150 mL de acetato de etilo (Figuras 22, 23). Se realizaron tres extracciones sucesivas con intervalos de 1 hora. En cada extracción se recuperó el sobrenadante o acetato de etilo conteniendo el biosurfactante que fue depositado en un vaso de precipitación, luego evaporado a 40 °C, hasta alcanzar peso constante y finalmente pesado (Figura 24).

b.4 Cálculo del rendimiento

El Y (p/x) o coeficiente de rendimiento del producto en relación a la biomasa o cantidad del producto obtenido por cantidad de biomasa formada ($g\ g^{-1}$), se calculó dividiendo los gramos de biosurfactante entre los gramos de biomasa, según Dorán (1998).

$$Y_p = \frac{P - P_0}{X - X_0} \frac{P}{X}$$

b) Actividad detergente de los biosurfactantes obtenidos

La actividad detergente del biosurfactante obtenido o capacidad para remover petróleo crudo liviano adherido a las placas de vidrio se determinó en tubos con tapa rosca (Sulbarán *et al.* 2005), en los que se depositaron 10 mL de una solución 10% del biosurfactante en bicarbonato de sodio 0,1 M (Anexo 3) y se agregaron 10 mL de petróleo crudo liviano, teniendo como testigo un tubo con 10 mL de bicarbonato de sodio 0,1 M sin biosurfactante y 10 mL de petróleo crudo liviano (Figura 25). Los tubos se agitaron manualmente por 5 minutos para homogenizar el contenido (Figura 26) y se dejaron en reposo por 1 hora a temperatura ambiente, para favorecer la separación de las fases acuosa y aceitosa (Figura 27).

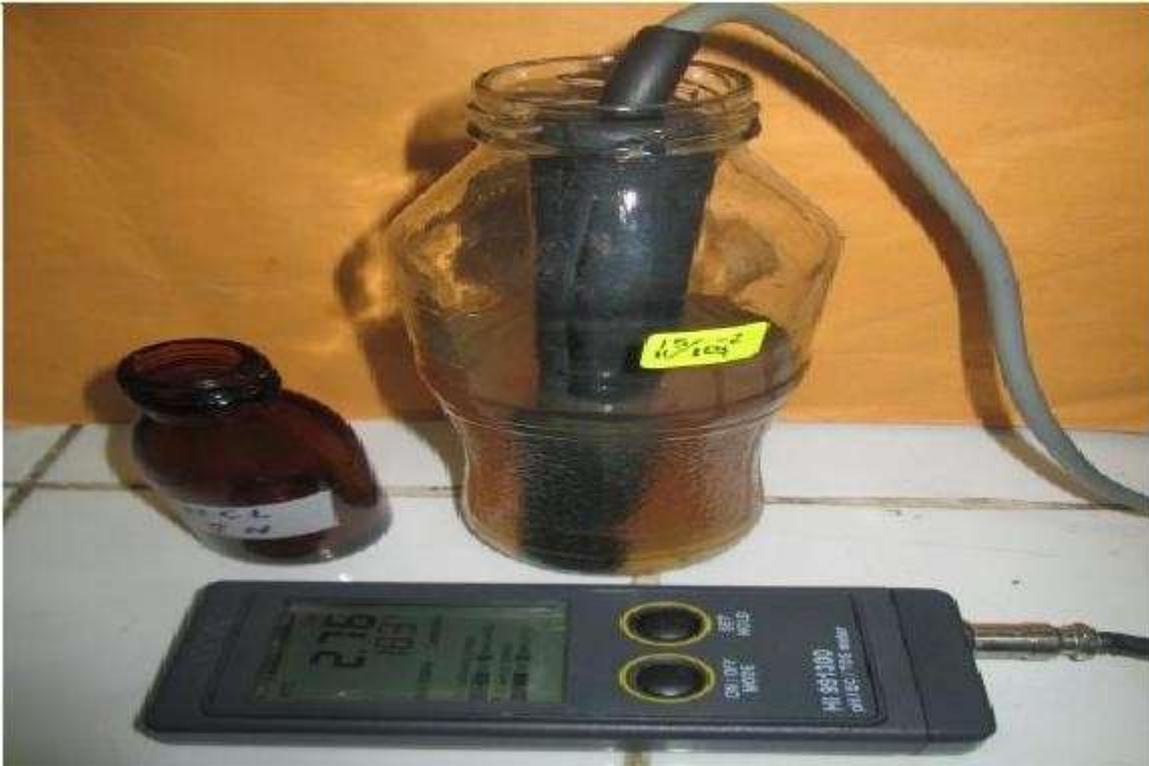


Figura 22. Acidificación del cultivo bacteriano.



Figura 23. Pera de decantación con extracto acidificado y acetato de etilo.



Figura 24. Recuperación del acetato de etilo con el biosurfactante.



Figura 25. Tubos con solución de biosurfactante en bicarbonato de sodio más petróleo crudo liviano.



Figura 26. Solución de biosurfactante en bicarbonato de sodio más petróleo crudo liviano agitada manualmente.



Figura 27. Reposo de solución de biosurfactante y petróleo crudo liviano.



Figura 28.Vertido de la solución de biosurfactante y petróleo crudo liviano.

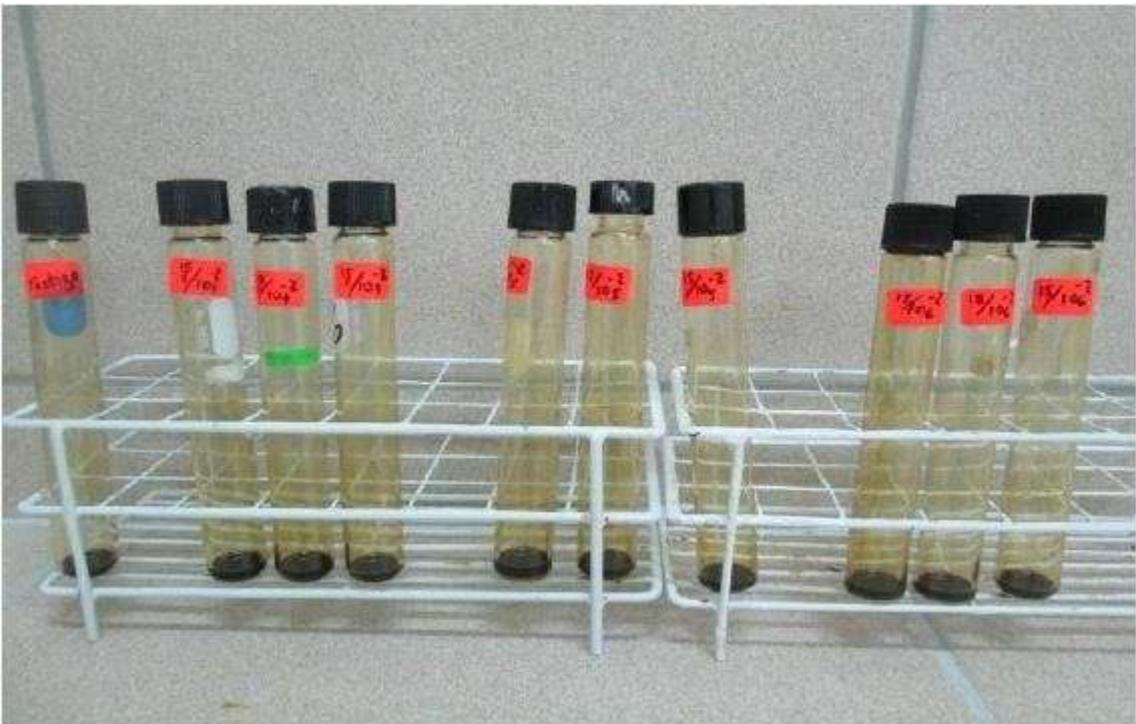


Figura 29. Observación de la superficie de las paredes de los tubos para calificar la actividad detergente y tensoactiva de los biosurfactantes.

Trascurrido la hora de reposo, el contenido de los tubos se vertió rápidamente a placas de Petri (Figura 28) y después de 5 minutos se observó la superficie de las paredes para calificar la actividad detergente según el petróleo remanente adherido a las paredes (Figura 29). Con base a una escala convencional elaborada por los autores, se determinó: += Mínima cantidad de petróleo adherido a las paredes o marcada actividad, ++= Regular cantidad de petróleo o mediana cantidad y +++= Abundante cantidad de petróleo o mínima actividad detergente.

c) Actividad emulsificante del biosurfactante

La actividad emulsificante del biosurfactante (Giraldo, 2012) se determinó en tubos con tapa rosca en los que se depositaron 10 mL de una solución 10% (p/v) del biosurfactante en agua destilada y se agregaron 0,2 mL de petróleo crudo liviano (Figura 30). Los tubos se agitaron manualmente durante 5 minutos para favorecer la emulsión (Figura 31) y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 540 nm. Los valores de absorbancia fueron convertidos a Unidades de Actividad Emulsificante por mL (UAE mL⁻¹), considerando 0,816 de absorbancia igual a una Unidad de Actividad Emulsificante por mL (Escalante, 2002).

d) Conservación de *Pseudomonas* spp. productoras de surfactantes

Las bacterias productoras de surfactantes, se cultivaron en caldo nutritivo, durante 24 horas a 30 °C. A continuación, se tomó 1 mL del cultivo y se llevó a tubos Eppendorf conteniendo 0,4 mL de una solución de glicerol al 40% previamente esterilizada, alcanzándose una concentración final de 15%. El contenido se homogenizó, se tapó herméticamente y se llevó a refrigeración a 4 °C, por 24 horas y luego a -18 °C en el freezer.

3.4 Análisis de los datos

Los valores obtenidos en el tiempo para la utilización del petróleo como fuente de carbono y energía, diámetro del halo de dispersión y concentración de biomasa fueron ordenados en tablas y figuras que permitieron analizar el rendimiento de surfactantes producidos por *Pseudomonas* spp. degradadoras de petróleo. Se utilizaron los programas Microsoft Office Word y Excel versión 2013.

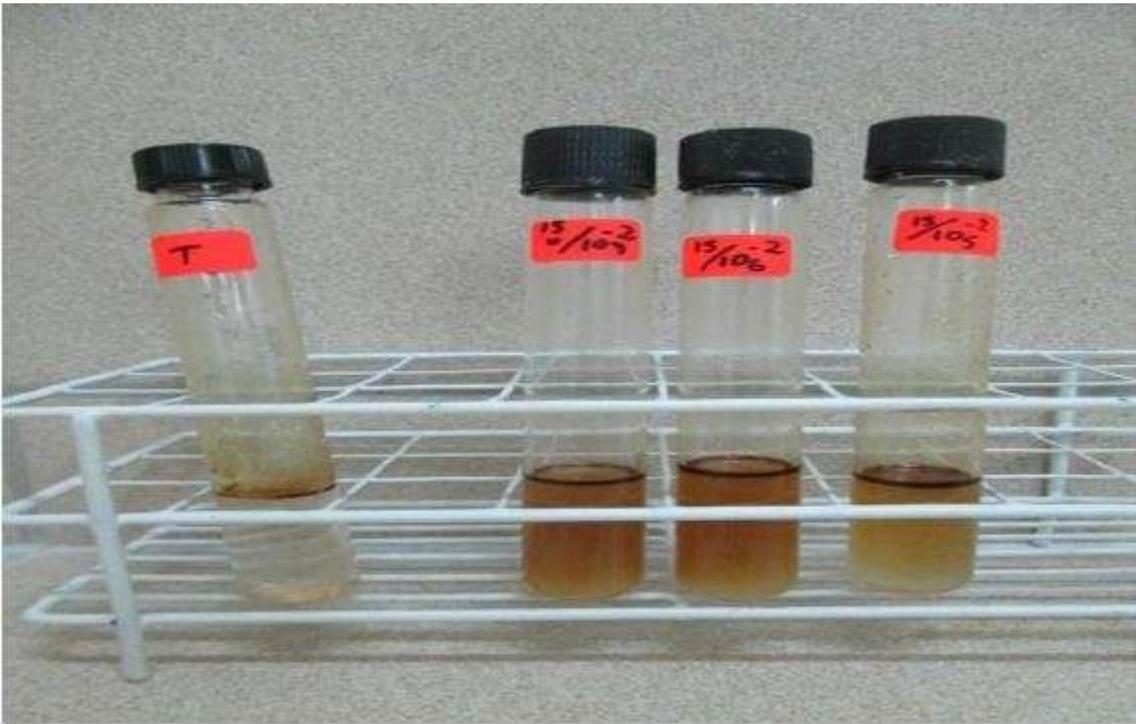


Figura 30. Tubos con solución de biosurfactante en agua destilada más petróleo crudo liviano.

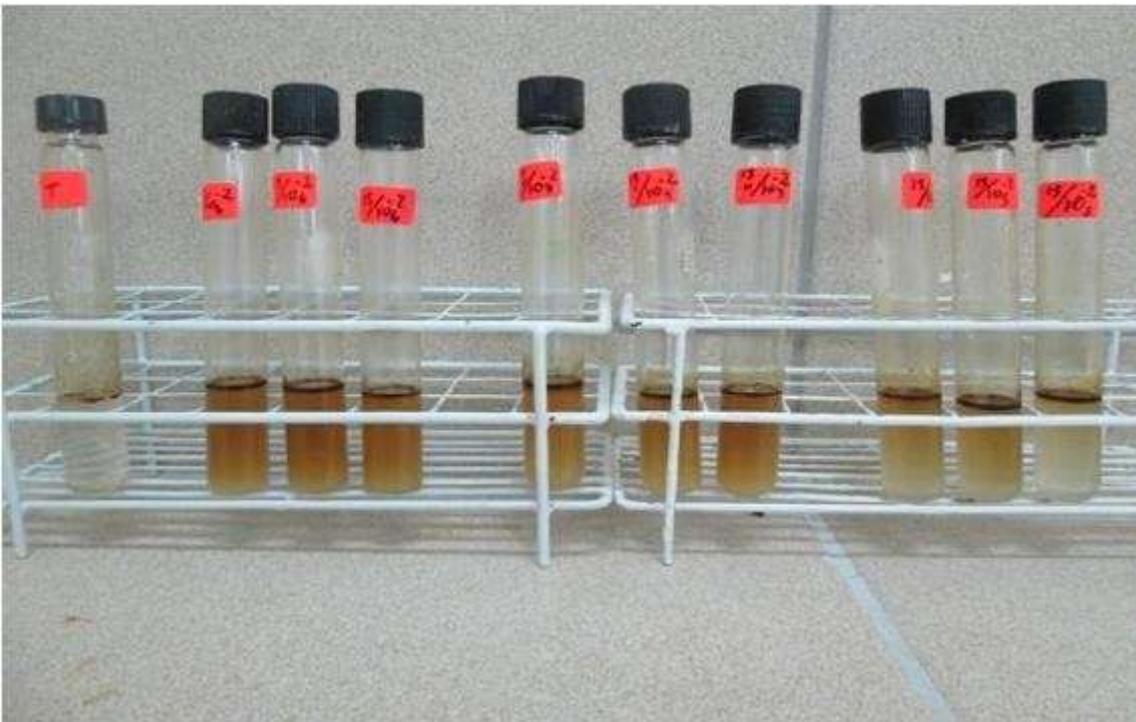


Figura 31. Solución de biosurfactante en agua destilada más petróleo crudo liviano después de la agitación.

IV. RESULTADOS

4.1 Características químicas, microbiológicas y toxicidad de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo crudo liviano

Las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo crudo liviano del lote IV presentaron un contenido de hidrocarburos totales, HTP de 22 900 mg kg⁻¹ (Tabla 2). El número más probable de microorganismos totales fue de 1,1 x 10⁷ NMP g⁻¹, población que superó a la hidrocarbonoclástica de 1,5 x 10⁴ NMP g⁻¹. En cuanto al nivel de toxicidad, fue severo (Tabla 3) en el índice de germinación de rabanito.

4.2 *Pseudomonas* spp. aisladas e identificadas

En todas las muestras de suelo contaminado se aislaron bacterias heterótrofas cultivables, obteniéndose 113 aislados con agar nutritivo y 135 con agar Mac Conkey (Tablas 4), con un total de 248 aislados bacterianos. El género *Pseudomonas* se identificó en el 15,93% (18) de bacterias identificadas con agar nutritivo y 44,44% (60) aislados en agar Mac Conkey, obteniéndose 78 aislados de *Pseudomonas* spp. (Tabla 5).

4.3 *Pseudomonas* spp. degradadoras de hidrocarburos de petróleo caracterizadas

El 55,56%(10) de *Pseudomonas* spp. aisladas en agar nutritivo y 93,33%(56) aisladas en agar Mac Conkey utilizaron petróleo crudo liviano como fuente de carbono y energía (Figuras 32, 33), durante 24 - 96 horas (Tablas 6, 7), considerándose degradadoras de hidrocarburos de petróleo el 84,62% (66) de aislados de *Pseudomonas* spp.

Tabla 2. Contenido de hidrocarburos totales, HTP y número más probable, NMP, de microorganismos totales e hidrocarbonoclasticos en suelo contaminando con petróleo liviano

Características		Lote IV
HTP (mg kg ⁻¹)		22 900
Microorganismos (NMP g ⁻¹)	totales	1,1 x 10 ⁷
Microorganismos hidrocarbonoclasticos (NMP g ⁻¹)		1,5 x10 ⁴

Tabla 3. Nivel de toxicidad de suelo contaminado con petróleo crudo liviano determinado en *Raphanus sativus* L.

Características	Lote IV
Promedio elongación radicular (mm)	12,00
Porcentaje relativo de germinación (PGR)	77,78
Crecimiento relativo de radícula (CRR)	57,14
Índice de germinación (% IG)	44,44
Nivel de fitotoxicidad	Severo

Tabla 4. Bacterias heterótrofas aisladas en muestras de suelo contaminado con petróleo crudo liviano

Muestra código	Agar nutritivo	Agar Mac Conkey
F33 0484342 9506335	5	6
P28 0484342 9506335	1	2
P37 0484345 9506335	2	2
P29 0484342 9506335	4	1
P45 0484345 9506336	1	1
P46 0484345 9506336	3	1
P26 0484342 9506335	1	2
P24 0484342 9506335	2	1
P48 0484345 9506336	1	2
F30 0484342 9506335	1	2
P42 0484345 9506336	1	1
P23 0484342 9506335	0	6
P38 0484345 9506336	1	3
P41 0484345 9506336	2	2
P39 0484345 9506336	1	2
P47 0484345 9506336	2	5
P52 0484345 9506336	2	2
F31 0484342 9506335	3	2
P43 0484345 9506336	2	3
P49 0484345 9506336	2	1
P36 0484345 9506336	2	3
P35 0484345 9506336	1	6
P53 0484345 9506336	3	5
F32 0484342 9506335	1	1
P44 0484345 9506336	1	3
P25 0484342 9506335	2	1
P50 0484345 9506336	2	1
P13 0484357 9506334	5	4
P22 0484346 9506321	2	2
P7 0484348 0506354	2	2
P18 0484355 9506325	4	2
P15 0484360 9506326	2	6
P11 0484355 9506340	2	2
P16 0484361 9506323	4	2
P13 0484358 9506332	3	5
P21 0484348 9506320	2	3
P17 0489356 9506323	3	2
P10 0484354 9506341	2	5
P6 0484347 9506356	3	3
P2 0484337 9506351	2	2
P9 0484354 9506346	3	3
P5 0484342 9506355	1	3
P8 0484351 9506347	1	2
P12 0484355 9506340	2	2
P3 0484339 9506350	3	3
P14 0484359 9506331	5	2
P17 0484359 9506323	2	2
P4 0484538 9506357	3	2
P1 0484343 9506351	1	2
P20 0484350 9506322	3	3
P7 0484351 9506350	2	2
P19 0484353 9506323	2	2

Tabla 5. Características diferenciales *Pseudomonas* spp.*

Características	<i>Pseudomonas</i> spp.
Forma de células	Bacilos rectos
Tinción de Gram	-
Motilidad	+
Prueba de oxidasa	+
Prueba de catalasa	+
Descarboxilación de arginina	+
Hidrólisis de gelatina	+
Hidrólisis de esculina	+
Reducción de nitratos	-
Descarboxilación de lisina	+
Polimixina B (300UI)	Resistente
Acidez en:	
• Glucosa	+
• Maltosa	+
• Manitol	+
• Sacarosa	+
• Xilosa	+
Utilización de citrato	+

* Alvarado & Valderrama (2014)

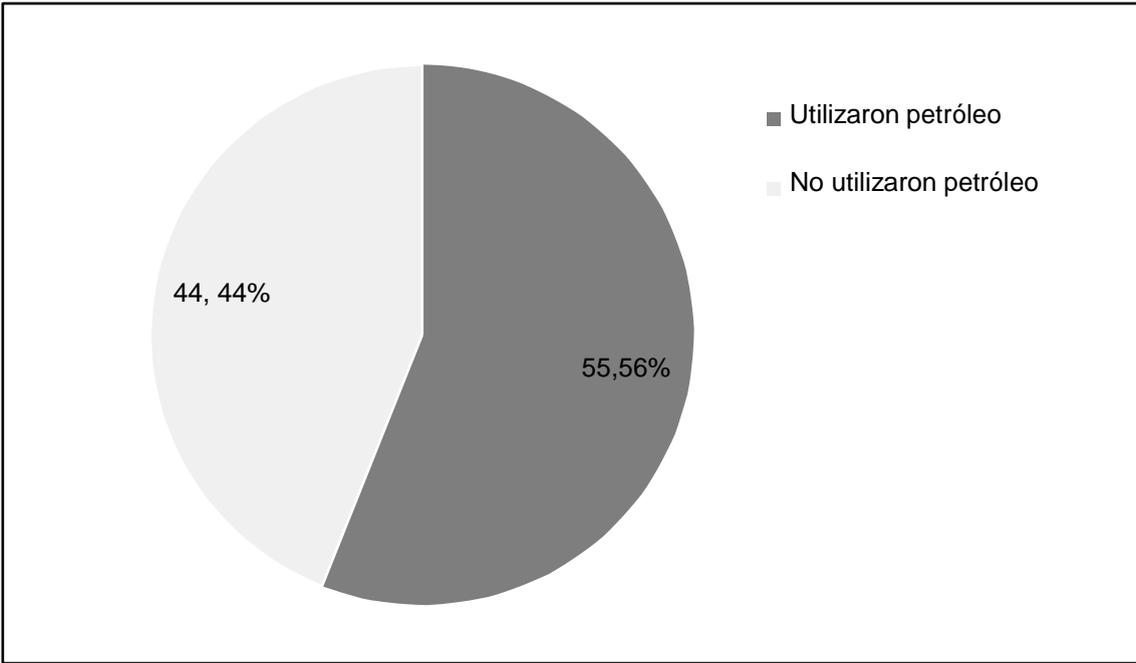


Figura 32. Porcentaje de *Pseudomonas* spp. aisladas en agar nutritivo que utilizaron petróleo crudo liviano como fuente de carbono y energía.

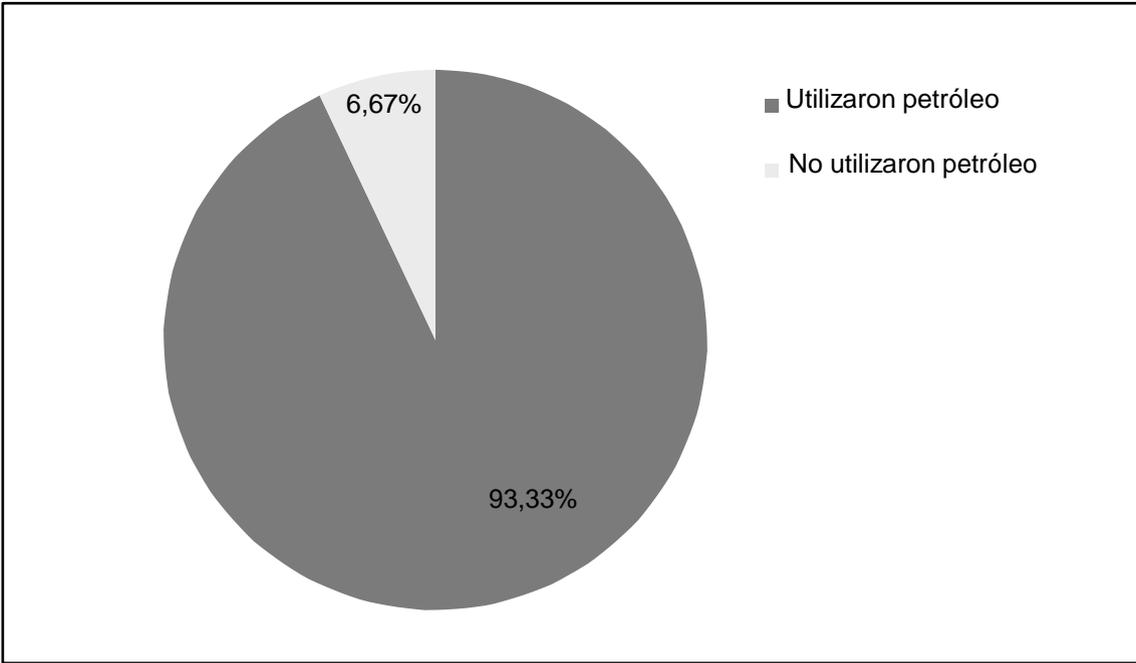


Figura 33. Porcentaje de *Pseudomonas* spp. aisladas en agar Mac Conkey que utilizaron petróleo crudo liviano como fuente de carbono y energía.

Tabla 6. Tiempo requerido para la utilización de petróleo crudo liviano como fuente de carbono y energía por *Pseudomonas* spp. aisladas en agar nutritivo

<i>Pseudomonas</i> spp. código	Tiempo (horas)
7H	24
1Y	24
26J	48
17B	48
6Z	48
15C	48
21A	48
7P	72
3F	72
67X	96

Tabla 7. Tiempo requerido para la utilización de petróleo crudo liviano como fuente de carbono y energía por *Pseudomonas* spp. aisladas en agar Mac Conkey

<i>Pseudomonas</i> spp. código	Tiempo (horas)	<i>Pseudomonas</i> spp. código	Tiempo (horas)
16Q	24	22V	48
17R	24	13E	48
18S	24	71Q	48
19T	24	2Z	48
4CF	24	13M	72
20U	24	14N	72
21V	24	15P	72
7D	24	22X	72
6I	24	23Z	72
8F	24	3B	72
91B	24	4C	72
4M	24	1J	72
15L	24	2T	72
10K	24	34Y	72
5Y	24	26C	72
8X	24	4M	72
36Z	24	20B	72
4J	24	10J	72
55B	24	12L	72
8JU	24	9D	72
1A	24	6F	96
2B	24	5E	96
8H	24	4D	96
2HI	24	3C	96
11K	24	3S	96
19C	48	7G	96
9R	48	97D	96
24A	48	67Q	96

4.4. *Pseudomonas* spp. productoras de surfactantes seleccionadas

En el medio mínimo de Davis con glicerol como fuente de carbono, el 92,42% (61) de cultivos de *Pseudomonas* spp. degradadores de petróleo desarrollaron durante 72 horas con producción de surfactante, evidenciado en la prueba de dispersión de gota, en la que se observaron halos de emulsión del petróleo crudo liviano cuyos diámetros fueron de 1,0- 22,0 mm (Figura 34, tabla 8), después de 5 minutos. Con los 25 cultivos de *Pseudomonas* spp. que alcanzaron los mayores halos, se repitió la prueba de dispersión de gota, observándose halos 10,0 - 16,0 mm al inicio y 12,0 - 30,0 mm después de 30 minutos (Tabla 9).

4.5. Biosurfactante producido y coeficiente de rendimiento de *Pseudomonas* spp.

Con los valores de absorbancia de diferentes concentraciones de biomasa, se obtuvo la ecuación $y = 6,2267x + 0,0066$ (Tabla 10, figura 35) y debido a que R^2 fue mayor de 0,9 se aceptó como patrón de referencia para el cálculo de la biomasa.

La absorbancia del medio mínimo salino de Davis cultivado con *Pseudomonas* spp. productoras de surfactantes osciló entre 0,226 a las 24 horas y 0,916 a las 120 horas, valores correspondientes a concentraciones de biomasa de 1,414 y 5,704 gL^{-1} , respectivamente (Figura 36, tablas 11, 12). La concentración máxima de biomasa de *Pseudomonas* spp. (Tabla 12) se alcanzó a las 48 horas (*Pseudomonas* spp. 36Z), 72 horas (*Pseudomonas* spp. 17R, 4CF, 5Y, 10K, 1A, 4M, 8H, 15L), 96 horas (*Pseudomonas* spp. 91B) y 120 horas (*Pseudomonas* spp. 55B, 2HI, 16Q, 18S, 19T, 20U, 21V, 7D, 6I, 8F, 8X, 4J, 8JU, 2B, 11K, 19C, 9R, 24A).

En todas las bacterias de *Pseudomonas* spp. se verificó la producción de surfactante desde las 24 horas, evidenciado por el halo de emulsión de petróleo crudo liviano (Tabla 13), con rangos de valores de 1-13 mm (24 horas), 10-18 mm (48 horas), 9-25 mm (72 horas), 11-28 mm (96 horas) y 12-30 mm (120 horas). En este contexto, los mayores valores en el diámetro del halo de emulsión para todas las *Pseudomonas* spp. se alcanzaron a las 120 horas y en el 40% (10) de bacterias investigadas, no correspondieron a la concentración máxima de biomasa (Tabla 14).



Figura 34. Halos de emulsión de petróleo crudo liviano por efecto de medio mínimo salino cultivado con *Pseudomonas* spp. productoras de surfactantes.

Tabla 8. Diámetro del halo de emulsión de petróleo liviano por efecto de medio mínimo salino de Davis cultivado por 72 horas con *Pseudomonas* spp. degradadoras

<i>Pseudomonas</i> spp. código	Diámetro del halo (mm)	<i>Pseudomonas</i> spp. código	Diámetro del halo (mm)
8JU	22,0	12L	9,0
2HI	20,0	4D	8,0
20U	20,0	3X	8,0
4CF	18,0	5E	8,0
15L	16,0	10J	8,0
5Y	15,0	1J	7,0
36Z	14,0	15C	7,0
2B	14,0	1Y	7,0
8H	13,0	7G	7,0
9I	13,0	13M	7,0
6I	13,0	26C	6,0
10K	13,0	17B	6,0
35T	12,0	3S	6,0
16Q	12,0	26J	5,0
17R	12,0	6Z	5,0
19T	12,0	20B	5,0
7D	12,0	29C	5,0
91B	12,0	6F	5,0
1A	12,0	3B	5,0
18S	11,0	34Y	5,0
21V	11,0	67X	5,0
4C	11,0	9D	5,0
55B	11,0	15P	5,0
13N	11,0	13E	5,0
27M	11,0	71Q	5,0
32R	11,0	2Z	5,0
9Y	11,0	22V	5,0
15U	11,0	1H	5,0
8A	11,0	18L	5,0
97D	11,0	2T	4,0
8X	11,0	21A	4,0
8F	11,0	3F	4,0
14N	11,0	22X	3,0
4J	10,0	7P	3,0
24A	10,0	3C	3,0
4M	10,0	7H	2,0
23Z	9,0	67Q	1,0
19C	9,0	31P	1,0
11K	9,0		
9R	9,0		

Tabla 9. Diámetro del halo de emulsión de petróleo liviano por efecto de medio mínimo salino de Davis cultivado por 72 horas con *Pseudomonas* spp. seleccionadas

<i>Pseudomonas</i> spp. código	Diámetro del halo (mm)	
	0 minutos	30 minutos
55B	16,0	20,0
36Z	16,0	17,0
8F	15,0	24,0
4CF	15,0	20,0
2HI	14,0	30,0
16Q	14,0	14,0
17R	14,0	20,0
21V	14,0	24,0
91B	14,0	28,0
4M	14,0	18,0
10K	14,0	20,0
8JU	14,0	22,0
1A	13,0	18,0
2B	13,0	15,0
18S	13,0	18,0
19T	13,0	12,0
7D	13,0	17,0
4J	13,0	16,0
8H	12,0	15,0
20U	12,0	22,0
8X	12,0	15,0
6I	11,0	22,0
15L	11,0	13,0
5Y	11,0	18,0
11K	10,0	21,0

Tabla 10. Valores de absorbancia (600nm) de biomasa de *Pseudomonas* spp. productoras de biosurfactantes

Biomasa (gL ⁻¹)	Absorbancia (600 nm)
0,15	0,944
0,015	0,106
0,0015	0,015
0,00015	0,003

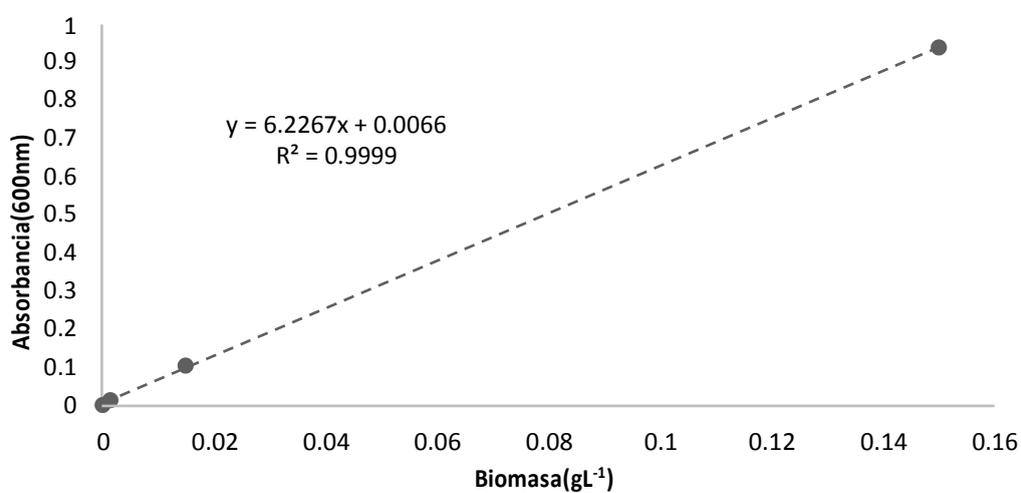


Figura 35. Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de *Pseudomonas* spp. productoras de surfactantes.



Figura 36. Biomasa de cultivos de *Pseudomonas* spp.

Tabla 11. Absorbancia (600 nm) corregida de biomasa de *Pseudomonas* spp. productoras de surfactantes en medio mínimo salino de Davis

<i>Pseudomonas</i> spp.	Absorbancia* 600nm/horas				
UNPRG	24	48	72	96	120
1A	0,414	0,387	0,616	0,541	0,521
11K	0,275	0,388	0,589	0,599	0,666
8H	0,324	0,424	0,784	0,699	0,649
91B	0,266	0,421	0,715	0,721	0,693
15L	0,315	0,446	0,568	0,533	0,558
5Y	0,273	0,387	0,503	0,494	0,519
8X	0,237	0,340	0,402	0,407	0,575
36Z	0,322	0,900	0,704	0,665	0,635
55B	0,241	0,331	0,375	0,591	0,648
8JU	0,266	0,464	0,635	0,685	0,776
6I	0,297	0,399	0,568	0,571	0,772
10K	0,291	0,575	0,626	0,630	0,631
18S	0,300	0,398	0,501	0,559	0,621
21V	0,228	0,292	0,435	0,563	0,664
4CF	0,321	0,640	0,865	0,817	0,812
19T	0,315	0,581	0,575	0,693	0,828
4J	0,309	0,438	0,630	0,607	0,636
7D	0,258	0,417	0,404	0,512	0,613
17R	0,253	0,457	0,806	0,790	0,682
20U	0,226	0,318	0,361	0,514	0,646
2HI	0,410	0,455	0,608	0,647	0,694
8F	0,342	0,473	0,607	0,662	0,662
4M	0,246	0,375	0,847	0,650	0,442
16Q	0,309	0,350	0,472	0,716	0,916
2B	0,236	0,407	0,518	0,763	0,896

*Promedio de tres repeticiones

Tabla 12. Concentración (gL^{-1}) de biomasa de *Pseudomonas* spp. productoras de surfactantes en medio mínimo salino de Davis

<i>Pseudomonas</i> spp. UNPRG	Biomasa*(gL^{-1})/horas				
	24	48	72	96	120
55B	1,507	2,067	2,710	3,687	4,042
2HI	2,559	2,839	3,792	4,035	4,328
17R	1,582	2,852	5,025	4,928	4,253
91B	1,663	2,628	4,459	4,496	4,323
7D	1,613	2,603	2,522	3,195	3,824
19T	1,968	3,624	3,587	4,322	5,162
11K	1,719	2,4227	3,674	3,736	4,154
36Z	2,012	5,611	4,390	4,147	3,961
8JU	1,663	2,896	3,961	4,272	4,839
4CF	2,005	3,992	5,393	5,094	5,063
5Y	1,707	2,416	3,238	3,083	3,139
10K	1,819	3,587	3,936	3,929	3,905
8H	2,024	2,647	4,888	4,359	4,048
8F	2,136	2,952	3,786	4,129	4,129
1A	2,585	2,416	3,842	3,375	3,251
6I	1,856	2,491	3,543	3,562	4,814
18S	1,875	2,485	3,126	3,487	3,873
4J	1,931	2,734	3,967	3,786	3,929
21V	1,426	1,825	2,715	3,512	4,141
20U	1,414	1,987	2,254	3,207	4,029
15L	1,968	2,784	3,543	3,325	3,481
8X	1,482	2,124	2,509	2,541	3,587
4M	1,538	2,342	2,759	4,054	5,281
16Q	1,931	2,186	2,946	4,465	5,704
2B	1,476	2,541	3,232	4,758	5,586

*Promedio de tres repeticiones

Tabla 13. Diámetro del halo de emulsión de petróleo liviano por efecto de medio mínimo salino cultivado con *Pseudomonas* spp. productoras de surfactantes

<i>Pseudomonas</i> spp.	*Diámetro de halo(mm)/horas				
	24	48	72	96	120
UNPRG					
55B	13,0	15,0	15,0	18,0	20,0
2HI	13,0	16,0	20,0	25,0	30,0
17R	9,0	10,0	13,0	16,0	23,0
91B	13,0	14,0	13,0	15,0	18,0
7D	9,0	13,0	13,0	15,0	15,0
19T	9,0	12,0	12,0	13,0	17,0
11K	9,0	13,0	14,0	15,0	20,0
36Z	9,0	12,0	13,0	16,0	18,0
8JU	14,0	18,0	25,0	28,0	28,0
4CF	15,0	16,0	23,0	28,0	29,0
5Y	9,0	12,0	13,0	20,0	24,0
10K	1,0	13,0	14,0	22,0	23,0
20U	9,0	12,0	10,0	17,0	20,0
8F	7,0	10,0	12,0	13,0	14,0
1A	10,0	10,0	13,0	17,0	18,0
6I	14,0	14,0	13,0	14,0	22,0
18S	10,0	8,0	13,0	17,0	20,0
4J	9,0	13,0	18,0	14,0	19,0
21V	9,0	10,0	14,0	13,0	14,0
8H	12,0	14,0	12,0	18,0	20,0
15L	10,0	12,0	18,0	16,0	18,0
8X	10,0	9,0	9,0	12,0	18,0
4M	15,0	13,0	16,0	15,0	16,0
16Q	13,0	12,0	14,0	12,0	13,0
2B	12,0	11,0	12,0	11,0	12,0

*Promedio de tres repeticiones

Tabla 14. Biomasa máxima y diámetro del halo de emulsión a las 120 horas por *Pseudomonas* spp. productoras de surfactantes

<i>Pseudomonas</i> spp. UNPRG	Biomasa/Tiempo (gL ⁻¹ - h)	Diámetro de halo (mm)
2HI	4,328-120	30,0
4CF	5,393-72	29,0
8JU	4,839-120	28,0
5Y	3,238-72	24,0
17R	5,025-72	23,0
10K	3,936-72	23,0
6I	4,814-120	22,0
11K	4,154-120	20,0
55B	4,042-120	20,0
8H	4,888-72	20,0
18S	3,873-120	20,0
20U	4,029-120	20,0
4J	3,967-120	19,0
91B	4,496-96	18,0
8X	3,587-120	18,0
15L	3,543-72	18,0
1A	3,842-72	18,0
36Z	5,611-48	18,0
19T	5,162-120	17,0
4M	3,967-72	16,0
7D	3,824-120	15,0
21V	4,141-120	14,0
8F	4,129-120	14,0
16Q	5,704-120	13,0
2B	5,586-120	12,0

Los mayores valores en el diámetro del halo de emulsión correspondieron a *Pseudomonas* spp. 2 HI (30 mm), 4CF (29 mm) y 8JU (28 mm), con biomásas máximas de 4,328 gL⁻¹ (120 horas), 5,393 gL⁻¹ (72 horas) y 4,839 gL⁻¹ (120 horas), respectivamente (Figuras 37,38). Estas bacterias seleccionadas alcanzaron 1,0-1,5 gL⁻¹ de surfactante (Figura 39, tabla 15), con rendimientos de 35% (*Pseudomonas* sp. 2HI), 31% (*Pseudomonas* sp. 8JU) y 19% (*Pseudomonas* sp. 4CF).

La actividad detergente de los biosurfactantes obtenidos o capacidad para facilitar la remoción del crudo de petróleo, se determinó visualmente al observar las paredes de los tubos de ensayo con una mínima (*Pseudomonas* spp. 8JU y 2HI) y regular cantidad de petróleo remanente (*Pseudomonas* spp. 4CF), comparado con los tubos del control que presentaron abundante petróleo adherido a las paredes (Tabla 16). La actividad emulgente de los surfactantes obtenidos se determinó mediante espectrofotometría, alcanzando 2,364 UAE mL⁻¹; 2,337 UAE mL⁻¹ y 1,304 UAE mL⁻¹ con *Pseudomonas* spp. 8JU, 2HI y 4CF respectivamente (Tabla 17).

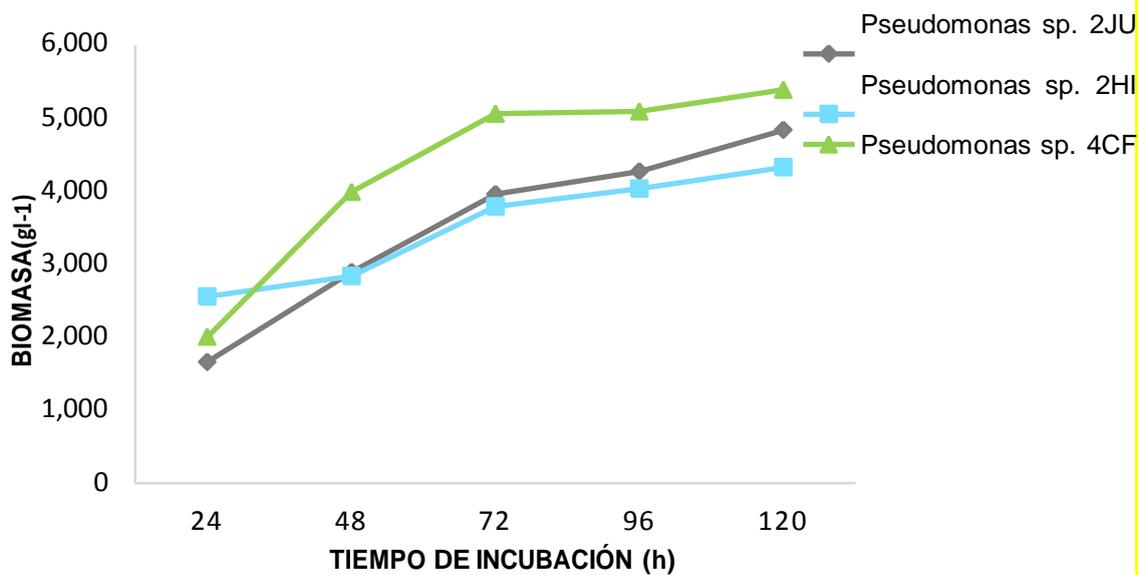


Figura 37. Cinética de la producción de biomasa por *Pseudomonas* spp. seleccionadas.

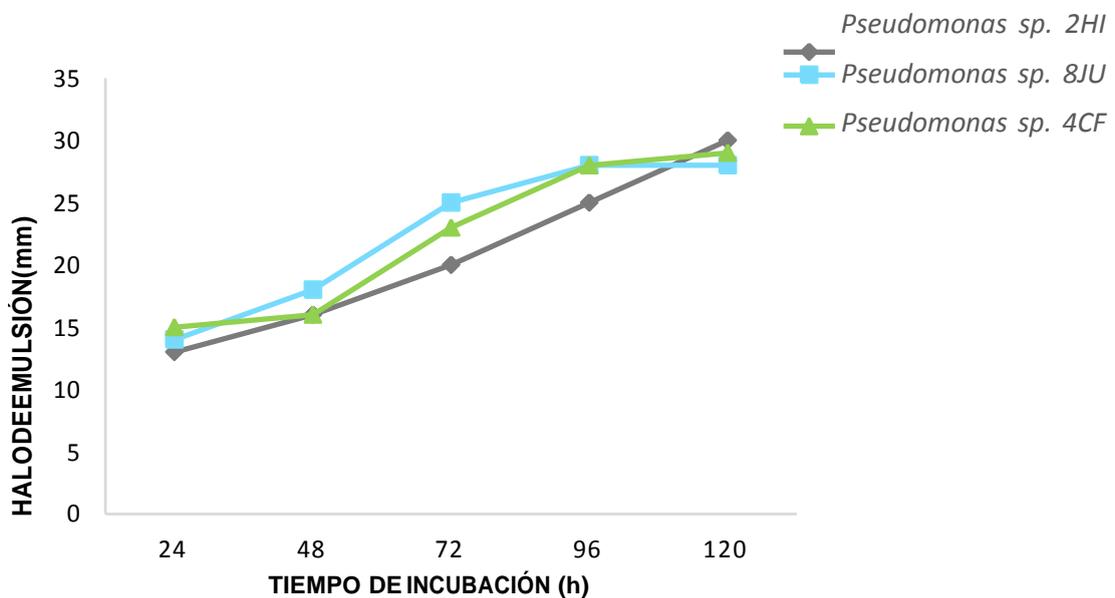


Figura 38. Cinética del diámetro del halo de emulsión por biosurfactantes producidos por *Pseudomonas* spp. seleccionadas.

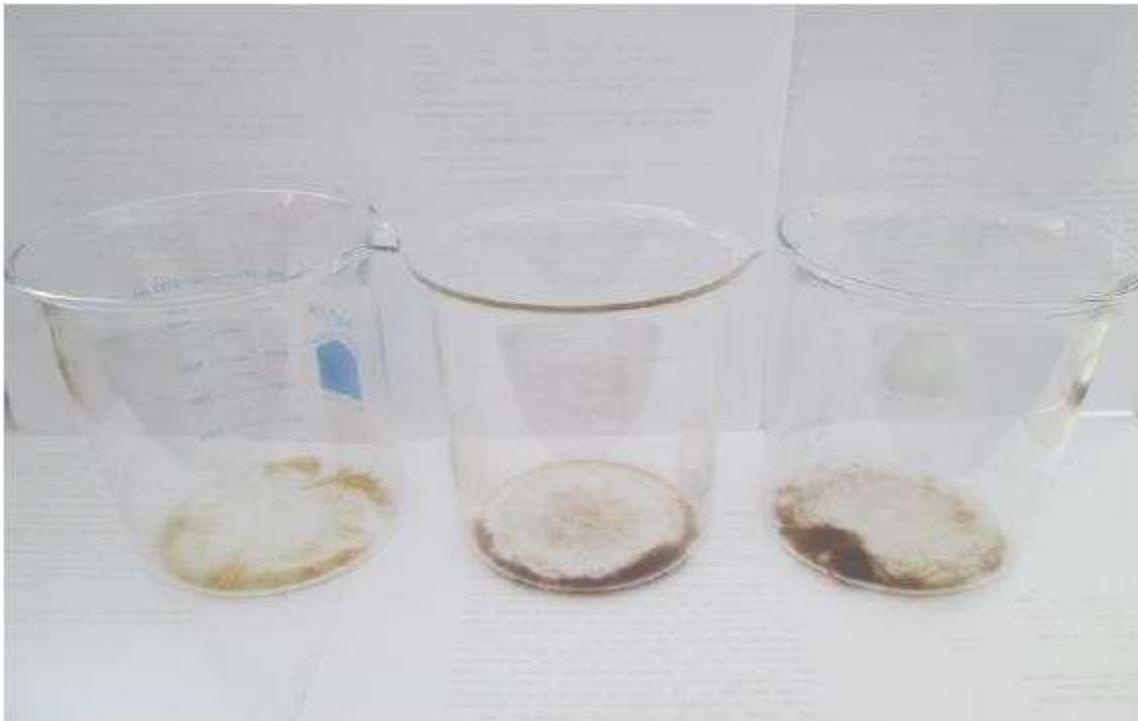


Figura 39. Biosurfactante producido por *Pseudomonas* spp.

Tabla 15. Rendimiento Y (p/x) de surfactantes producidos por *Pseudomonas* spp. degradadoras de hidrocarburos de petróleo

<i>Pseudomonas</i> spp. UNPRG	x Biomasa (gL ⁻¹)	p Surfactante (gL ⁻¹)	Y (p/x) Rendimiento	
			g ⁻¹	%
2HI	4,328	1,50	0,35	35
8JU	4,839	1,50	0,31	31
4CF	5,393	1,00	0,19	19

Tabla 16. Actividad detergente de biosurfactantes producidos por *Pseudomonas* spp. degradadoras de hidrocarburos de petróleo

<i>Pseudomonas</i> spp. UNPRG	Petróleo remanente (cantidad)	Actividad detergente
8JU	+=Mínima	Marcada
2HI	+=Mínima	Marcada
4CF	++=Regular	Mediana
Control	+++ = Abundante	Mínima

Tabla 17. Actividad emulgente de biosurfactantes producidos por *Pseudomonas* spp. degradadoras de hidrocarburos de petróleo

<i>Pseudomonas</i> spp. UNPRG	Absorbancia* (540 nm)	Actividad emulgente (UAE mL ⁻¹)
8JU	1,929	2,364
2HI	1,907	2,337
4CF	1,064	1,304
Control	0,138	0,169

*Promedio de tres repeticiones

V. DISCUSIÓN

Las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo presentaron un contenido de hidrocarburos de petróleo, HTP de 22 900 mg kg⁻¹, una población microbiana y toxicidad de los contaminantes en el índice de germinación de rabanito, condiciones que comprobaron la presencia del contaminante y por tanto la idoneidad para el aislamiento de bacterias del género *Pseudomonas*, capaces de metabolizar los hidrocarburos de petróleo (Llanos, 2012).

En las muestras de suelo contaminado se aislaron bacterias heterótrofas, que utilizan sustratos orgánicos como fuente de carbono y energía, coincidiendo con Llanos (2012), Galindo & Llontop (2015), Flores & Benites (2016). El género *Pseudomonas* se identificó en las bacterias heterótrofas aisladas, por cuanto estas bacterias son ubicuas y son comúnmente aisladas de suelos (Barba & Bravo, 2013; León, 2014), agua y sedimentos marinos (Uad, 2012).

El porcentaje de bacterias aisladas con agar Mac Conkey e identificadas como *Pseudomonas* spp. superó al del agar nutritivo, resultado explicado porque el agar Mac Conkey es un medio selectivo diferencial en el que se desarrollan además de las enterobacterias, otros géneros de bacterias no fermentadoras de lactosa como *Pseudomonas* spp. coincidiendo con Barba & Bravo (2013), Dávila & Linares (2013) y León (2014).

El 84,62% de los cultivos de *Pseudomonas* spp. se consideraron degradadores de hidrocarburos de petróleo porque utilizaron el contaminante como fuente de carbono y energía (Chávez, 2010; Llanos 2012; Galindo & Llontop, 2015). Estos microorganismos oxidan las

fracciones del petróleo, generando ácidos grasos que finalmente son degradados hasta dióxido de carbono y agua (López *et al.*, 2006).

El tiempo mínimo requerido por las bacterias para la utilización del petróleo fue 24 horas, coincidiendo con Pérez *et al.* (2010), quienes determinaron que en el periodo de 24 - 72 horas *P. aeruginosa* degradó los hidrocarburos más sencillos, n alcanos de cadenas cortas y posteriormente a las 96 – 480 horas las fracciones más pesadas como isoprenoides, alcanos de cadenas de más de 20 carbonos, cicloalcanos y aromáticos (Pérez *et al.*, 2010; Llanos, 2012).

Las bacterias degradadoras de petróleo se utilizan para la tecnología de bioaumentación en la biorremediación de ambientes contaminados (Pissani & Cabanillas, 2015); no obstante, la degradación microbiana es a menudo limitada por problemas de transferencia de masa (Riojas *et al.*, 2010). En este contexto se investigó la producción de surfactantes, que incrementan la biodisponibilidad de los hidrocarburos mediante la acción paralela de la desorción y solubilización del contaminante, facilitando la biodegradación (Riojas *et al.*, 2010).

El 92,42% de cultivos de *Pseudomonas* spp. degradadoras de hidrocarburos de petróleo se reconocieron como productoras de surfactantes, coincidiendo con Sulbarán *et al.* (2005), Mondragón (2011), Burgos (2012) y Giraldo (2012). Una amplia gama de microorganismos incluyendo bacterias, levaduras y hongos filamentosos son capaces de sintetizar biotensoactivos; no obstante, las bacterias son las principales productoras (Jiménez *et al.*, 2010), destacando especies de *Pseudomonas* como *P. putida* (Sulbarán *et al.*, 2005), *P. fluorescens* (Giraldo, 2012; Yañez & Wong, 2013) *P. aeruginosa* (Sulbarán *et al.*, 2005; Mondragón, 2011; Giraldo, 2012) y *P. alcaligenes* (Yañez & Wong, 2013). Bacterias del género *Pseudomonas* producen mono y diramnofosfolípidos, con una regulación genética (transcripcional y postranscripcional) en *P. aeruginosa*; no obstante, un exceso en la fuente de carbono y estrés en la fuente de nitrógeno favorecen la producción (Yañez & Wong, 2013).

Las bacterias del género *Pseudomonas* productoras de surfactantes se aislaron de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, al igual que Mondragón (2011). Los biosurfactantes tienen diversos roles fisiológicos,

como aumentar la biodisponibilidad de los sustratos insolubles en agua por emulsificación, movilizar metales pesados o presentar actividad antimicrobiana, entre otros. Con esta versatilidad los microorganismos productores pueden ser encontrados en diferentes ambientes contaminados (Mondragón, 2011; Yañez & Wong, 2013) o no con compuestos orgánicos hidrofóbicos (Burgos *et al.*, 2011; Burgos, 2012).

El glicerol fue utilizado como fuente de carbono en el medio para seleccionar bacterias productoras de surfactantes, coincidiendo con Sulbarán *et al.* (2005), aunque también se han reportado glucosa, melaza, parafina, aceite de maíz, aceite de resino (Sulbarán *et al.*, 2005), gasoil (Araujo *et al.*, 2008), queroseno (Pérez *et al.*, 2010) y n – alcanos (Burgos *et al.*, 2011). La fuente de carbono influye en las rutas de síntesis y en la estructura del compuesto producido. Se pueden utilizar sustratos solubles en agua como el glicerol, glucosa, manitol y etanol; no obstante, la adición de sustratos inmiscibles en agua promueve la inducción del biosurfactante. En este contexto, se ha determinado el cometabolismo de glucosa y C₁₁₋₁₃, en el que la glucosa es la fuente de energía y C₁₁₋₁₃ inducen la producción de surfactantes (Burgos, 2012), porque se requiere sintetizar moléculas tensoactivos que favorezcan la biodegradación de los sustratos insolubles (Yañez & Wong, 2013).

Los cultivos de las bacterias investigadas en medio líquido por 72 horas se utilizaron para seleccionar aquellos productores de surfactantes, mediante la prueba de dispersión de gota en la que se observa un halo de emulsión formado sobre una capa de hidrocarburo de petróleo, coincidiendo con Sulbarán *et al.* (2005) y Mondragón (2011). En la búsqueda de nuevos biosurfactantes se requiere encontrar productos con algunas de las siguientes propiedades: alta capacidad emulsionante, elevada actividad superficial e interfacial, baja CMC, buena solubilidad y actividad en un amplio rango de pH (Burgos, 2012). La capacidad emulsionante permite estabilizar o desestabilizar emulsiones aceite con agua y agua con aceite (Burgos, 2012).

En la selección de bacterias productoras de surfactantes, el diámetro de los halos de dispersión de gota osciló entre 10 – 30 mm, rango similar a 7-35 mm, reportado por Mondragón (2011) para bacterias cultivadas

durante 48 horas. El halo de emulsión está directamente relacionado con la actividad de biosurfactante producido (Mondragón, 2011).

La biomasa bacteriana fue cuantificada por turbidimetría coincidiendo con Flores & Idrogo (2015) y se alcanzó una concentración máxima de 5,704 gL⁻¹ valor que se encuentra en el rango de biomasa de 3 -11 gL⁻¹ reportado por Rosero *et al.* (2002) para *P. aeruginosa* cultivada con parafina como fuente de carbono.

La producción de surfactantes se verificó en los cultivos bacterianos seleccionados de 24 – 120 horas de incubación. Al respecto, Mondragón (2011) reportó que la fase de crecimiento exponencial de *Pseudomonas* sp. comenzó a las 4 horas y terminó a las 24 horas de incubación, iniciándose la producción de surfactantes a las 20 horas, para incrementarse considerablemente y alcanzar el máximo de producción en la fase estacionaria, a las 36 horas de incubación, manteniéndose constante hasta las 48 horas. Coincidiendo, Santa Anna *et al.* (2002) concluyeron que la producción de surfactantes ramnolípidos por especies de *Pseudomonas* es típica de un metabolismo secundario y se incrementa considerablemente en la fase estacionaria.

La producción del biosurfactante en la fase estacionaria explica que los valores mayores en el diámetro del halo de emulsión de petróleo crudo se registraron en todos los caldos cultivados con las bacterias a las 120 horas; no obstante, las concentraciones máximas de biomasa se alcanzaron en el 40% de las bacterias, a las 42,72 y 96 horas. Al respecto, Giraldo (2012) demostró que la producción de biosurfactantes está asociada al crecimiento bacteriano cuando el sustrato es un hidrocarburo y se lleva a cabo al final de la fase logarítmica o en la fase estacionaria con otros sustratos como los carbohidratos. Se ha reportado producción de biosurfactantes asociada a la fase exponencial con *Sphingobacterium detergens* (Burgos, 2012), exponencial y estacionaria en *Bacillus* sp. (Nitschke & Pastore, 2006) y estacionaria en *P. aeruginosa* (Santa Anna *et al.*, 2002; Mondragón 2011; Rosero *et al.*, 2002).

Para la obtención del biosurfactante los cultivos bacterianos fueron centrifugados, porque el metabolito es extracelular (Yañez & Wong, 2013) y luego se recuperó mediante extracción con acetato de etilo (Pérez *et al.*,

2010), así como también se puede utilizar otro solvente orgánico (Yañez & Wong, 2013). Se obtuvo 1,0 – 1,5 gL⁻¹ de surfactante, superando 0,190 gL⁻¹ reportado por Burgos *et al.* (2011) para *Sphingobacterium detergens* y 0,5 gL⁻¹ registrado por Pérez *et al.* (2010) para bacterias diazótrofes productoras de surfactantes.

Diferenciándose de los resultados obtenidos, Rosero *et al.* (2002) reportaron 6,5 – 15 gL⁻¹ de ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* a nivel de planta piloto, calculando un rendimiento de biomasa en producto de 1,36 gramos de ramnolípidos por cada gramo de biomasa; sin embargo bajo condiciones de laboratorio el rendimiento fue de 0,45 gg⁻¹. En este contexto, las bacterias investigadas en la presente investigación: *Pseudomonas* sp. 2HI y 8JU con 0,35 y 0,31 gg⁻¹ son consideradas promisorias para la producción de surfactantes, por cuanto con la optimización del medio de cultivo y condiciones de fermentación será posible incrementar el rendimiento inicial (Burgos, 2012).

La detergencia de los biosurfactantes obtenidos o capacidad para remover el petróleo de las paredes del tubo de ensayo se verificó en el extracto crudo libre de células de *Pseudomonas* spp. 8JU, 2HI y 4CF, coincidiendo con Sulbarán *et al.* (2005). Asimismo, se determinó hasta 2,364 UAE mL⁻¹, valor inferior a 3 UAE mL⁻¹ reportadas por Giraldo (2012) para el ramnolípidos producido por *P. aeruginosa* PB 25. En la biotecnología industrial las bacterias productoras de surfactantes son de gran interés para aplicarlas en procesos de biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos de petróleo, debido a que incrementan biodisponibilidad y biodegradabilidad (Araujo *et al.*, 2008; Yañez & Wong, 2013).

VI. CONCLUSIONES

- El suelo contaminado presentó un HTP de 22 900 mg Kg⁻¹; 1,1x10⁷ NMP g⁻¹ de microorganismos totales; 1,5x10⁴ NMP g⁻¹ de hidrocarbonoclasticos y toxicidad severa en el índice de germinación del rabanito.
- En el suelo contaminado se obtuvieron 78 aislados de *Pseudomonas* spp.
- El 84,62% de aislados de *Pseudomonas* spp. utilizó el petróleo como fuente de carbono y energía en 24-96 horas.
- El 92,42% de *Pseudomonas* spp. degradadoras de petróleo produjo biosurfactantes.
- Los biosurfactantes producidos por *Pseudomonas* spp. fueron recuperados por extracción con acetato de etilo.
- La concentración de surfactantes producidos por *Pseudomonas* spp. fue de 1,0-1,5 gL⁻¹ con rendimientos de 35% (*Pseudomonas* sp. 2HI), 31% (*Pseudomonas* sp. 8JU) y 19% (*Pseudomonas* sp. 4CF).
- Se determinó actividad detergente y actividad emulgente en los biosurfactantes producidos por *Pseudomonas* spp.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar la caracterización molecular de *Pseudomonas* spp. 2HI y 8JU.
- Determinar la eficiencia de la degradación de hidrocarburos de petróleo por *Pseudomonas* spp. 2HI y 8JU.
- Realizar la caracterización físico-química del biosurfactante producido por *Pseudomonas* spp. 2HI y 8JU.

VIII. RESUMEN

La biorremediación de hidrocarburos de petróleo que es favorecida por los biosurfactantes. El objetivo de la presente investigación fue determinar el rendimiento de surfactantes producidos por *Pseudomonas* spp. degradadoras de hidrocarburos de petróleo. Se colectaron muestras de suelo contaminado y las *Pseudomonas* spp. se consideraron degradadoras cuando utilizaron el petróleo como fuente de carbono y energía. Las bacterias productoras de surfactantes se seleccionaron mediante la prueba de dispersión de gota en el medio mínimo salino de Davis con 1% de glicerol como fuente de carbono y con las tres bacterias que alcanzaron el mayor diámetro en el halo de emulsión se determinó el rendimiento. En el suelo con un HTP de 22 900 mg g⁻¹ se obtuvieron 78 aislados de *Pseudomonas* spp., entre las que el 84,62% utilizó el petróleo como fuente de carbono y energía en 24-96 horas. El 92,42% de estas bacterias produjo biosurfactante evidenciado por los halos de emulsión de petróleo crudo liviano, con diámetros de 10-30 mm. La concentración de surfactantes producidos por *Pseudomonas* spp. fue de 1,0-1,5 gL⁻¹, con rendimiento de 35% (*Pseudomonas* sp. 2HI), 31% (*Pseudomonas* sp. 8JU) y 19% (*Pseudomonas* sp. 4CF). Se demostró la producción de surfactantes por *Pseudomonas* spp. degradadoras de petróleo, y su potencial para la remediación de suelos contaminados.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, P. & Valderrama, M. (2014). *Caracterización de los géneros Burkholderia y Pseudomonas solubilizadoras de fosfato aisladas de Zea mays L. en el distrito de Requena en Lambayeque, Marzo- mayo, 2014.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Araujo, I., Gómez, A., Barrera, M., Angulo, N., Morillo, G., Cárdenas, C. & Herrera, L. (2008). Surfactantes biológicos en la biorremediación de aguas contaminadas con crudo liviano. *Interciencia*, 4(33), 245-250.
- Ayasta, J. & Bernable, C. (2012). *Mejoramiento del proceso de compostaje de residuos sólidos urbanos biodegradables del distrito de ciudad Eten, en Lambayeque. Julio a diciembre de 2011.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Barba, S. & Bravo, R. (2013). *Especies de Burkholderia y Pseudomonas aisladas de la rizosfera de malezas y su potencial como promotoras del crecimiento de plantas en Lambayeque.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Brenner, D., Krieg, N. & Staley, J. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria.* doi:10.1007/bergeysoutline200405.
- Burgos, C. (2012). *Biotensioactivos producidos por Sphingobacterium detergens sp. nov.: Producción, caracterización y propiedades.* (Tesis de Doctorado). Universidad de Barcelona. España.
- Burgos, C., Pons, R., Espuny, M., Aranda, F., Teruel, J., Manresa, A., Ortiz, A. & Marques, A. (2011). Isolation and partial characterization of a biosurfactant mixture produced by *Sphingobacterium sp.* isolated from soil. *Journal of Colloid and Interface Science*, 361,195-204.
- Chávez, G. (2010). *Eficiencia de la degradación de petróleo por Pseudomonas sp. nativa en terrarios a diferentes concentraciones y tiempos.* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Cortés, S. & Barragán, B. (2013). Producción de biosurfactantes por microorganismos halófilos. *Revista Sistemas Ambientales*, 6(1),1-8.

- Dávila, J. & Linares, V. (2013). *Especies de Burkholderia y Pseudomonas aisladas de la rizósfera de Jatropha curcas L. piñon blanco y su potencial como promotoras del crecimiento de plantas en Lambayeque, 2012* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Dorán, P. (1998). *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*. España: Acribia, S.A.
- Escalante, R. (2002). *Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios* (Tesis de Maestría).Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
- Flores, A. & Idrogo, E . (2015). *Rendimiento de polihidroxicanoatos, PHA, de bacterias halófilas aisladas de suelo y agua de salinas en Mórrope, Lambayeque, 2014*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Flores, S. & Benites, J. (2016). *Efecto del estiércol de cuy, porcino y vacuno en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de diésel en terrarios*. (Tesis de Licenciatura).Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Galindo, M. & Llontop, J. (2015). *Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con petróleo por bacterias nativas de la provincia de Talara, región Piura*. (Tesis de Licenciatura).Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Giraldo, J. (2012). *Producción de ramnolípidos por Pseudomonas aeruginosa PB 25: evaluación de su actividad emulsificante y de remoción de metales pesados*. (Tesis de Biología). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
- Guzmán, C. & Hurtado, A. (2011). *Producción de polihidroxicanoatos por bacterias halófilas nativas en diferentes concentraciones de almidón contenido en cáscaras de Solanum tuberosum L.* (Tesis de Licenciatura).Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Huapaya, R. (2011). *Metodos Estándares de Análisis Microbiológicos de Aguas. Curso de capacitación. 10 y 11 de diciembre 2011*. Chiclayo, Perú.
- Jiménez, D., Medina, S. & Gracida, J. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensioactivos. *Revista Intemacional de Contaminación Ambiental*, 26(1), 65-84.
- Kim, H., Jeon, J., Kim, B., Ahn, C., Oh, C. & Yoon, B. (2006). Extracellular productiort of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70,391-396.
- León, C. (2014). *Pseudomonas spp. aisladas de la rizósfera Lycopersicom esculentum Mill. tomate y su potencial como promotoras del crecimiento de plantas en Lambayeque, 2012*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.

- Llanos, C. (2012). *Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con petróleo por bacterias nativas en el distrito de Pimentel, departamento de Lambayeque, 2011.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- López, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S. y García, J. (2006). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo.* *Nova-Publicación Científica*, 4(5), 82-90.
- Mondragón, L. (2011). *Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas aerobias autóctonas de yacimientos petroleros productoras de biosurfactantes para su aplicación en técnicas de MEOR.* (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.
- Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Kochupappy, R. & Sivachidambaram, P. (2008). Biosurfactants. *Properties, commercial production and application.* *Current Science*, 94(6), 736-747.
- Municipalidad Provincial de Talara. (2014). Piura, Perú. Recuperado de <http://www.munitalara.gob.pe/parinas-talara/>
- Nitschke, M. & Pastore, G. (2006). Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, 97(2), 336-341.
- Ortega, M. (2012). *Modelización de un proceso de biorremediación de suelos contaminados con gasoil* (Tesis de Doctorado). Universidad de Granada, España.
- Pérez, J., Anaya, O., Chang, C., Membrillo, I. & Calva, G. (2010). Producción de biosurfactantes por bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno crecidas en hidrocarburos. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 41, 1-9.
- Pissani, V. & Cabanillas, J. (2015). *Efecto de la bioaumentación y bioestimulación en la eficiencia de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Ponce, D. (2014). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos* (Tesis de Ingeniería). Universidad del Bio-Bio, Chile.
- Raiger, L. & López, N. (2009). Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Revista Química Viva*, 3(8), 146-161.
- Riojas, H., Torres, L., Mondaca, I., Balderas, J. & Gortáres, P. (2010). Efectos de los surfactantes en biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Química Viva*, 3(9), 120-145.
- Rodríguez, C. (2012). *Producción de biogas a partir de bagazo cervecero* (Tesis de Ingeniería). Universidad de Chile, Chile.

- Rosero, G., Dugarte, F., Pimienta, A., Díaz, M. & Carvajal, F. (2002). Producción de un tensoactivo biológico. *Revista Colombiana de Biotecnología*, IV(1), 22-28.
- Salas, T. & Meza, V. (2011). *Compost de etiquetas de cerveza. Evaluación de la fitotoxicidad en semillas. Segundo Simposium de Residuos Sólidos en el Perú*. Universidad Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Santa Anna, L., Sebastian, G., Menezes, E., Alves, T., Santos, A., Pereira, N. & Freine, D. (2002). Production of biosurfactans from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19(2), 159-166.
- Sulbarán, M., Bahsas, A., Velásquez, W. & Otoniel, J. (2005). *Caracterización de biosurfactantes producidos por Pseudomonas fluorescentes aisladas de emulsiones de petróleo pesado*. CIENCIA, 13(2), 228-239.
- Uad, I. (2012). *Caracterización fisiológica y molecular de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de fondos marinos (Del Prestige)*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Granada, España.
- Vásquez, A., Diaz, N., Vásquez, W. (2012). *Metodología de la Investigación Científica*. Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Viñas, M. (2005). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos : caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Barcelona, España.
- Yañez, G. & Wong, A. (2013). Biosurfactantes microbianos, producción potencial con residuos agroindustriales de Chiapas. *BioTecnología*, 17(3), 12-28.

