



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA LA  
PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES UTILIZANDO UNA BACTERIA  
DEL GÉNERO *Stenotrophomonas*.

AUTOR

Daniel Alejandro Caizapanta Saltos

AÑO

2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA LA  
PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES UTILIZANDO UNA BACTERIA DEL  
GÉNERO *STENOTROPHOMONAS*.

Trabajo De Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos para  
optar por el título de Ingeniero en Biotecnología

Profesor Guía

Msc. María Alejandra Cruz Salazar

Autor

Daniel Alejandro Caizapanta Saltos

Año

2018

## DECLARACIÓN DEL DOCENTE GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Optimización de las condiciones de operación para la producción de biosurfactantes utilizando una bacteria del género *Stenotrophomonas*, a través de reuniones periódicas con el estudiante Daniel Alejandro Caizapanta Saltos, en el semestre 2018-1, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación"

---

María Alejandra Cruz Salazar  
Máster en Ingeniería en Bioprocesos y Biotecnología  
CI: 1719928572

## DECLARACIÓN DEL DOCENTE CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Optimización de las condiciones de operación para la producción de biosurfactantes utilizando una bacteria del género *Stenotrophomonas*, de Daniel Alejandro Caizpanta Saltos, en el semestre 2018-1, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

---

Mónica Cecilia Vaca Proaño  
Magíster en Ingeniería de la Energía  
CI: 1716631294

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

---

Daniel Alejandro Caizapanta Saltos

CI: 1718679184

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres y a mi hermano, por su apoyo incondicional a lo largo de toda la carrera universitaria.

A Alejandra Cruz y a Edgar Velastegui por ser una gran guía a lo largo del desarrollo de este proyecto.

A la Universidad de Las Américas por darme todas las bases necesarias para realizar este trabajo experimental.

## **DEDICATORIA**

Por ser una parte fundamental no solo en mi carrera universitaria sino en mi vida, por darme apoyo moral en todos los momentos difíciles, por aguantarme en los momentos más críticos. Este trabajo va dedicado a mi mamá, a mi papá y a mi hermano, sin ustedes no hubiera cumplido mis metas.

## RESUMEN

Los surfactantes son moléculas activas que tienen dos fases de interacción una hidrofóbica y otra hidrofílica. Estas moléculas tienen la capacidad de reducir la tensión superficial entre líquidos, sólidos y gases. Gracias a estas propiedades estas moléculas han ganado interés en el campo de remediación de hidrocarburos, debido a que aumentan la biodisponibilidad de contaminantes y además aumentan su solubilidad. Hoy en día los surfactantes comerciales son realizados químicamente, lo que impone una baja degradación, convirtiéndolos en un contaminante más. Una alternativa para el uso de surfactantes comerciales es la utilización de biosurfactantes que se producen empleando sistemas biológicos como levaduras, hongos y bacterias. Estas moléculas tienen la misma funcionalidad que los surfactantes sintéticos, la diferencia es que estas biomoléculas son biodegradables. En este trabajo se empleó la bacteria *Stenotrophomonas* sp. para producir biosurfactantes. Se analizaron las condiciones de operación tales como temperatura, pH y agitación. Se utilizó un modelo de optimización mediante 3 diseños centrales compuestos, con el fin de estudiar las variables analizadas y se obtuvieron los valores óptimos de cada variable, lo que dio como resultado una temperatura óptima de 34°C, una agitación de 135 rpm y un pH de 6,1. Se obtuvo una producción máxima de biosurfactantes de 1,55 g/L. La extracción de los biosurfactantes se realizó mediante precipitación ácida de lípidos, y una posterior liofilización. El tratamiento optimizado se llevó a cabo mediante una fermentación tipo batch en un biorreactor de 5 litros. Se demostró que las condiciones de operación estudiadas son esenciales en la producción de biosurfactantes puesto que la variación de estas resultó en rangos mínimos y máximos de producción.



## ABSTRACT

Surfactants are active molecules that have two interaction phases, one hydrophobic and the other hydrophilic. These molecules can reduce the surface tension between liquids, solids and gases. These molecules have gained interest in the field of environmental remediation. It increases the bioavailability of contaminants and also increases the solubility. Today, commercial surfactants are chemically produced, which imposes low degradation, making them another pollutant. An alternative for the use of commercial surfactants is the use of biosurfactants that are produced using biological systems such as yeasts, fungi and bacteria. These molecules have the same functionality as synthetic surfactants, the difference is that these biomolecules are biodegradable. In this work the bacterium *Stenotrophomonas* sp. to produce biosurfactants. The operating conditions such as temperature, pH and agitation were analyzed. An optimization model was used through 3 central composite designs to study the variables analyzed and the optimal values of each variable were obtained, resulting in an optimum temperature of 34°C, an agitation of 135 rpm and an optimum pH of 6.1. The maximum biosurfactant concentration was 1.55g / L. The extraction of the biosurfactants was carried out by acid precipitation of lipids, and subsequently lyophilization. The optimized treatment was carried out in a batch-type fermentation using a 5-liter bioreactor. We were able to demonstrate that the conditions of operation studied are essential in the production of biosurfactants

# ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción:.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	3
1.3 Objetivo general y objetivos específicos.....	4
1.3.1 Objetivo general.....	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
1.4 Justificación de la investigación.....	5
2. Capítulo II. Marco teórico.....	5
2.1 Contaminación con hidrocarburos.....	5
2.2 Biorremediación.....	6
2.3 Biodisponibilidad.....	8
2.4 Biosurfactantes.....	9
2.4.2 Aplicaciones de los biosurfactantes.....	11
2.5 Bacteria <i>Stenotrophomonas sp.</i> .....	12
2.6 Metodología de superficie de respuesta.....	14
3. Capítulo III. Metodología.....	15
3.1 Diseño del plan experimental.....	15
3.2. Procedimientos.....	18
3.2.1 Materiales y métodos para la obtención de los datos.....	18
3.2.3 Evaluación estadística de los resultados.....	22
4. Capítulo IV. Resultados y discusión.....	23
4.1 Curva de calibrado de <i>Stenotrophomonas sp.</i> .....	23
4.2 Curva de crecimiento de la bacteria <i>Stenotrophomonas sp.</i> escala de laboratorio antes de realizar la optimización.....	23
4.3 Curva de crecimiento escala banco de la bacteria <i>Stenotrophomonas sp.</i> utilizando las condiciones de operación optimizadas.....	24

4.4 Determinación de los parámetros cinéticos de <i>Stenotrophomonas</i> sp.....	26
4.5 Diseño central compuesto utilizando las variables de agitación y temperatura .....	28
4.5.1 Producción de Biosurfactantes.....	28
4.5.2 Gráfico de superficie de respuesta.....	28
4.5.3 Test del desplazamiento del contaminante .....	33
4.6 Diseño central compuesto utilizando las variables de agitación y pH .....	35
4.6.1 Producción de biosurfactantes .....	35
4.6.2 Gráfico de superficie de respuesta.....	35
4.6.3 Test del desplazamiento del contaminante .....	40
4.7 Diseño central compuesto utilizando las variables de pH y temperatura.....	42
4.7.1 Producción de biosurfactantes .....	42
4.7.2 Gráfico de superficie de respuesta.....	43
4.7.3 Test del desplazamiento del contaminante .....	47
4.8 Determinación de las condiciones óptimas de operación .....	49
4.9 Curva de producción de biosurfactantes a escala banco por <i>Stenotrophomonas</i> sp. utilizando las condiciones de operación optimizadas .....	51
4.10 Determinación del coeficiente volumétrico de consumo de oxígeno (K <sub>la</sub> ).....	52
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	55
5.1 Conclusiones.....	55
5.2 Recomendaciones.....	56
REFERENCIAS.....	57

## **1. Capítulo I. Introducción:**

### **1.1 Antecedentes**

Sin duda las contaminaciones más graves en cuestiones ambientales han sido las producidas por derrames de petróleo. Por lo general cuando se habla de una contaminación por hidrocarburos, es común la presencia de dos tipos de compuestos: los hidrocarburos alifáticos y los alicíclicos. (Perfumo, Banat, Cangarella, & Marchant, 2006, p135). Los alifáticos se volatilizan fácilmente mientras que los alicíclicos persisten adheridos a las superficies como suelos, piedras, plantas o corales dependiendo del lugar contaminado. Los compuestos alicíclicos son compuestos dañinos puesto que generan una gran toxicidad (Osorio, 2014).

A lo largo de la historia se han utilizado varios métodos tanto físicos como químicos para la eliminación de hidrocarburos. Sin duda la principal desventaja de estos son los altos costos económicos, debido a las grandes cantidades de energía que requieren, así como también la dificultad relacionada con la movilidad de equipos especializados (Chu, 2013, p. 19-20). Una alternativa eficiente es la Biorremediación. Estos procedimientos consisten en el uso de organismos vivos como bacterias, plantas, hongos o levaduras para acelerar el proceso de degradación del contaminante. Un factor que limita la degradación de contaminantes en la Biorremediación es la poca disponibilidad del contaminante cuando este se adhiere a una matriz sólida. En pocas palabras, la degradación de contaminantes se limita por las condiciones de transferencia de masa (Arboleda & Bravo, 2010). Una de las formas de hacer biodisponible estos compuestos es mediante el uso de surfactantes.

Los surfactantes son moléculas tensoactivas que tiene la capacidad de disminuir la tensión en la interfase del agua. Estas moléculas se ubican en la interfase entre las

moléculas de agua y las moléculas no solubles como los aceites, lo que aumenta la disponibilidad y la solubilidad de los hidrocarburos (Elliot, Singhal, & Swift, 2010, p. 84-85). Gracias a esta capacidad de convertir a los hidrocarburos en moléculas más disponibles y solubles, los surfactantes son unas de las principales moléculas utilizadas para la biodegradación de contaminantes.

Las principales industrias que utilizan los surfactantes son las empresas petroleras, puesto que los utilizan en procedimientos de limpieza de tanques y oleoductos con el fin de aprovechar todos los hidrocarburos extraídos (Vallejo, Salgado, & Roldan, 2015, p. 86-87). El surfactante se puede obtener de dos maneras: química y biológicamente. Los obtenidos biológicamente (biosurfactantes) están siendo utilizados más que los químicos gracias a que los biosurfactantes no generan toxicidad, son biodegradables y tienen una mejor interacción con los microorganismos degradadores. Estas moléculas son producidas por microorganismos y pueden ser: ácidos grasos, péptidos, glicopéptidos, fosfolípidos y glucolípidos (Gonzales, Bustillos, & Fernández, 2010). Entre los microorganismos productores de biosurfactantes se encuentran varios géneros de *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, *Pseudoxanthomonas* sp, *Stenotrophomonas* sp, entre otros. Los biosurfactantes mayormente producidos son de origen lipopeptido, y ramnolipidos (Yané, 2013).

Las bacterias del género *Stenotrophomonas* son bacterias aerobias, Gram negativas, que han sido poco explotadas en cuanto a sus aplicaciones en biotecnología industrial y ambiental. Sin embargo, se han realizado estudios sobre la optimización de medios de cultivo empleando este género de bacteria, para la producción de enzimas lipasas, polihidroxicanoatos (PHA) y biosurfactantes (Tufail, 2017).

Para la producción de biosurfactantes existen estudios sobre la influencia de la concentración de compuestos como el zinc, el magnesio, el pH en el medio de

producción del microorganismo. El uso de estos biosurfactantes fue destinado para la remoción de metales pesados (Hemlata, Selvin, & Tukaram, 2015a). Adicionalmente se ha estudiado la degradación de benzopireno mediante el uso de biosurfactantes en condiciones estándar de cultivo (Arjun, 2013). Los estudios mencionados anteriormente se realizaron empleando la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia*. Esta bacteria se la agrupó en este género en el año 1993, antes de esto se la catalogaba como *Pseudomonas maltophilia*, también se la categorizó en el género de *Xanthomonas* (Palleroni & Bradbury, 1993), esta variación en el género de esta bacteria se debió a que producía ramnolípidos al igual que el género de las *Pseudomonas*, por ende se conoce que los biosurfactantes producido por *Stenotrophomonas maltophilia* son de tipo ramnolípidos (Hemlata et al., 2015). Los ramnolípidos son básicamente gliceroles, son catalogados como los principales biosurfactantes producidos por las bacterias del género *Pseudomonas* (Lang & Wullbrandt, 1999).

El antecedente más relevante es el estudio de las condiciones de cultivo para la optimización en la producción de biosurfactantes mediante la utilización de *Stenotrophomonas* sp. Tal investigación se utilizó diferentes concentraciones de carbono, magnesio y sodio. Se optimizó el medio mediante un diseño experimental de superficie de respuesta (Valdospinos, 2017). A partir de esta investigación se obtuvieron las condiciones iniciales de cultivo óptimas con las que se utilizó de referencia para comenzar con la siguiente investigación.

## **1.2 Planteamiento del problema**

Sin duda uno de los problemas ambientales más graves a lo largo de la historia ha sido la contaminación por hidrocarburos, específicamente los derrames de petróleo en suelos, ríos o mares (Plohl, Leskovsek, & Bricelj, 2012, p. 280). El método más utilizado para degradación de hidrocarburos ha sido el uso de microorganismos

nativos (Romero & others, 2012, p. 77-78). No obstante, estos solo tienen la capacidad de descomponer los contaminantes solubles, lo que limita la descomposición de los contaminantes adheridos a matrices sólidas como piedras, corales o suelos (Perfumo et al., 2009, p. 135). Para potencializar la degradación por microorganismos se suelen emplear surfactantes comerciales producidos a partir de compuestos químicos. Sin embargo, el uso de surfactantes sintéticos genera efectos negativos en las zonas tratadas. Estos efectos negativos son el aumento de la toxicidad en las zonas, muchas veces los surfactantes sintéticos al no ser utilizados en concentraciones óptimas son dañinos para la fauna del lugar, otro efecto negativo es que muchas veces los microorganismos tienen mayor afinidad a degradar el surfactante que el compuesto contaminante inicial, lo que disminuye la tasa de degradación de hidrocarburos (Rondón-Barragán, Ramírez-Duarte, & Eslava-Mocha, 2007, p. 432-433).

Una alternativa eficiente al uso de surfactantes sintéticos es la producción industrial de biosurfactantes, los cuales serían biodegradables, estos no serían consumidos por los microorganismos degradadores de hidrocarburos y presentarían una alternativa más ecológica.

### **1.3 Objetivo general y objetivos específicos**

#### **1.3.1 Objetivo general.**

- Optimizar las condiciones de operación para la producción de biosurfactantes utilizando *Stenotrophomonas* sp.

#### **1.3.2 Objetivos específicos.**

- Determinar el pH, la agitación y la temperatura óptimos para la producción de biosurfactantes utilizando *Stenotrophomonas* sp.

- Validar las condiciones óptimas de operación en un biorreactor tipo batch para la determinación de los parámetros cinéticos de *Stenotrophomonas* sp.
- Determinar el valor del coeficiente volumétrico de consumo de oxígeno de *Stenotrophomonas* sp.

#### **1.4 Justificación de la investigación**

El empleo de biosurfactantes como alternativa al uso de surfactantes sintéticos tiene una variedad de ventajas: no generan toxicidad alguna, son biodegradables en su totalidad y no compiten con el microorganismo en la degradación con los hidrocarburos.

La importancia de llevar a cabo este proyecto se basa en la generación de datos útiles para la producción optimizada de biosurfactantes mediante el uso de una bacteria del género *Stenotrophomonas*. Este estudio permitirá generar resultados relevantes acerca de la influencia que tienen las condiciones de operación como pH, agitación y temperatura sobre la producción de este metabolito. La optimización de las condiciones de operación disminuye los costos de producción cuando se requiere producir biosurfactantes a escala piloto e industrial.

## **2. Capítulo II. Marco teórico**

### **2.1 Contaminación con hidrocarburos.**

Una de las contaminaciones ambientales más problemáticas hoy en día es la provocada por explotación inadecuada de petróleo o productos derivados del mismo. El petróleo crudo básicamente es el conjunto de diferentes hidrocarburos con alta composición de carbono e hidrogeno además de compuestos tales como metales pesados, sulfuros y nitrógenos. La inadecuada explotación del petróleo ha generado la acumulación de hidrocarburos en pasivos ambientales que resultan



altamente tóxicos y nocivos tanto para los seres humanos como también para la flora y fauna de las zonas afectadas (Peng, Zi, & Wang, 2015).

Esto ha generado gran interés en el campo científico y se han desarrollado diferentes métodos de remediación como: los métodos físicos-químicos, los cuales se basan en el principio de destrucción inmovilización y separación del contaminante (Balasubramaniyam & Harvey, 2014). Mediante el estudio de las propiedades físicas y químicas de los hidrocarburos, se emplean diferentes protocolos ya sea por adición de compuestos que permitan una inmovilización o dispersión de hidrocarburos o simplemente con la inyección de aire en las zonas contaminadas lo que elimina únicamente los compuestos volátiles (Lim, Lau, & Poh, 2016). Otros métodos para la remediación de zonas contaminadas más efectivos son el uso de microorganismos degradadores de compuestos tóxicos como los hidrocarburos y sus derivados, a este método se lo conoce como biorremediación.

## **2.2 Biorremediación**

La biorremediación básicamente es el uso de organismos para la regeneración de ambientes contaminados ya sea mediante el empleo de plantas, bacterias, hongos, levaduras, entre otros compuestos biológicos. El papel principal de los organismos es degradar los compuestos contaminante tóxicos utilizándolos como fuentes de nutrientes. En el caso de los hidrocarburos los microorganismos utilizan el carbono para realizar reacciones metabólicas. Existen varios tipos de biorremediación como: la fitorremediación, la bioaumentación, la bioestimulación, el uso de biopilas de compost. Todas estas técnicas parten del estudio de la autoremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos por la adaptación de los organismos autóctonos (Sutton, Grotenhuis, & Rijnaarts, 2014). La bioaumentación es una técnica *in situ* que consiste en la adición de microorganismos capaces de degradar hidrocarburos a suelos contaminados, esta técnica es eficaz cuando los microorganismos nativos no tienen la capacidad de degradar los compuestos

contaminantes. Sin embargo, esta técnica tiene una desventaja puesto que al poner microorganismos que no pertenecen a ese ecosistema, se provoca un desequilibrio biológico. Inclusive se han adaptado organismos nativos *in vitro* para que puedan degradar hidrocarburos, se los cultiva en situaciones similares para posteriormente adicionarlos a los suelos contaminados y que sean más eficientes en el proceso de remoción (Szulc et al., 2014, pp. 121-128). Otra desventaja de este método es que los tiempos de remediación suelen ser muy prolongados.

La pila de compost es una técnica de biorremediación *ex situ* en donde se trasladan los suelos contaminados a espacios adaptados para evitar la filtración de lixiviados de las biopilas, estos suelos son enriquecidos con nutrientes necesarios para los organismos responsables de la remoción de contaminantes, muchas veces se agregan residuos orgánicos ricos en carbono, nitrógeno y fosforo como: estiércol, plantas en descomposición, cáscaras de frutas, entre otros. Además de esto se controla la temperatura de los suelos, la humedad y la oxigenación. Esto promueve el crecimiento de microorganismos y favorece la degradación de los hidrocarburos (Bastida et al., 2016, pp. 162-169). La desventaja de este método de biorremediación son los altos costos de movilización de los suelos contaminados y la limitación de espacio para realizar las pilas de compost.

La bioestimulación es otro método *in situ* muy parecido a la pila de compost. Se agregan nutrientes que utilizan los microorganismos para acelerar la descomposición de contaminantes. Se utilizan tuberías de presión para la oxigenación del suelo contaminado (Dzionek, Wojcieszynska, & Guzik, 2016, pp. 30-33). El principal problema de este método son los tiempos prolongados de remediación.

Todos los métodos antes descritos tienen una limitación, los microorganismos que se utilizan deben adaptarse a la contaminación por hidrocarburos, por lo que el tiempo de remediación suele ser muy prolongado. Para mejorar el tiempo de

adaptación de los microorganismos se utilizan sustancias potenciadoras, un ejemplo muy común de estas sustancias son los emulsificantes o surfactantes. Estos aumentan la biodisponibilidad de los compuestos insolubles como los hidrocarburos lo que magnifica la remediación (Szulc et al., 2014).

### **2.3 Biodisponibilidad**

Como se conoce, los microorganismos y las plantas son los principales catalizadores que realizan la descomposición de los contaminantes, por lo que es muy importante saber el grado de disponibilidad de los contaminantes para poder ser metabolizados. El término de biodisponibilidad ha sido definida como el estado de fracción de los compuestos que son viables para la transformación y/o eliminación por organismos vivos (Scow & Jhonson, 1996). Sin embargo, en biorremediación este término hace referencia a la eco toxicología de los compuestos contaminantes ya sean estos orgánicos o metálicos. En muchos casos el término de biodisponibilidad condiciona la degradación de los contaminantes del medio, una solución eficaz resolver los problemas de biodisponibilidad de hidrocarburos son el empleo de biosurfactantes. La tasa de degradación depende de las interacciones entre el microorganismo, el biosurfactante y la matriz en donde se encuentra en contaminante (Shen et al., 2016, pp. 120-128).

En el caso de los hidrocarburos estos son contaminantes hidrófobos lo que significa que no son solubles en agua esto disminuye la interacción entre el contaminante y el microorganismo remediador, estas moléculas no son biodisponibles, los biosurfactantes reducen la tensión superficial y la tensión interfacial produciendo una micela que encapsula al contaminante, lo que favorece el transporte de masa del contaminante desde el suelo hasta la membrana del microorganismo lo que aumenta la biodisponibilidad (Xia et al., 2014, pp. 498-499).

## **2.4 Biosurfactantes**

Los biosurfactantes son moléculas orgánicas producidas por diversos microorganismos, principalmente por bacterias y hongos, son moléculas anfifílicas lo que significa que en su estructura existe tanto extremos hidrófobos como extremos hidrofílicos.(Mena-Giraldo, Pérez-Buitrago, Pinal, & Hoyos, 2016) Lo que genera interfases en las zonas polares y no polares esto permite a los biosurfactantes tener la capacidad de ser moléculas dispersantes, emulsificantes y además disminuyen la tensión superficial del agua aproximadamente entre 75 a 25 mN/m. Los microorganismos logran desarrollar la posibilidad de sintetizar los biosurfactantes cuando las fuentes de nutrientes como el carbono son insolubles o parcialmente solubles en agua en otras palabras no son biodisponibles (Supaphol, Jenkins, Intomo, Waite, & O'Donnell, 2011).

Para la producción de biosurfactantes mediante la ruta biotecnológica se procede en primera instancia a la exploración, aislamiento, acondicionamiento de cepas con potencial síntesis de estas moléculas, determinación de las condiciones óptimas en el medio de cultivo y condiciones óptimas de operación, extracción, purificación y finalmente escalado industrial. La etapa de escalado industrial se estudia además la reducción de costos de producción mediante el uso de fuentes nutritivas residuales (Makkar, Cameotra, & Banat, 2011).

### **2.4.1 Origen de los biosurfactantes**

Debido a la alta contaminación de petróleo a partir de la década de 1970, se empiezan a sintetizar surfactantes inorgánicos, a fin de poder eliminar diferentes tipos de hidrocarburos y tener la posibilidad de regenerar ambientes contaminados. Estos compuestos dependiendo de su composición química pueden ser catiónicos, aniónicos y no iónicos. Sin embargo, a finales de la década de los 80, se reportó que el surfactante sintético genera toxicidad para microorganismos degradadores, lo que reflejó una baja eficiencia en estudios de biodegradación de ambientes contaminados con petróleo. A partir de este punto se realiza estudios de aislamiento

de microorganismos con el fin de obtener biomoléculas tensoactivas capaces de ser biodegradables y que no presenten una competencia de afinidad con los microorganismos degradadores (Yañez-Ocampo, Somoza-Coutiño, Blanco-González, & Wong-Villarreal, 2017).

Los biosurfactantes son moléculas de gran interés científico por lo que se han determinado varios microorganismos que los producen. Cabe recalcar que existe una gran variedad de biosurfactantes, estos pueden ser principalmente de origen lípido o proteico.

Los microorganismos productores de biosurfactantes más estudiados son *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*. con moléculas de tipo ramnolípidos y lipopéptidos respectivamente. Los biosurfactantes producidos por *Pseudomonas* sp. fueron los primeros en ser comercializados en diferentes industrias, este microorganismo se encuentra en la mayoría de los lugares en donde exista una contaminación con hidrocarburos por lo cual se conoce que es un gran productor de biosurfactantes (Das et al., 2015). Mientras que la bacteria *Bacillus subtilis* al ser un microorganismo con capacidad de adaptarse a diferentes fuentes de carbono económicos, como son desechos industriales, tiene un gran potencial como microorganismo productor de biosurfactantes puesto que la única limitación de la producción de estas moléculas son los altos costos de producción debido al uso de sustratos comerciales (Montagnolli, Lopes, & Bidoia, 2015).

En la tabla 1. se observan diferentes microorganismos que tienen la capacidad de producir biosurfactantes y el tipo de surfactante que estos producen.

Tabla 1.

*Principales bacterias productoras de diferentes tipos de biosurfactantes*

Tipo de biosurfactante	Microorganismo productor
------------------------	--------------------------

---

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Rhamnolípidos	<i>Pseudomonas sp</i> <i>Serratia rubidea</i>
Lípidos de sophorosa	<i>Candida apícola, Candida bogoriensis</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Candida bombicola</i> <i>Alcanivorax borkumensis</i>
Glicolípidos	<i>Alcanivorax sp, Serratia marcenses</i> <i>Tsukamurella sp, Arthrobacter sp</i>
Lípidos de celobiosa	<i>Ustilago maydis</i>
Glicosildiglicerolípidos	<i>Lactobacillus fermenti</i>
Lipopolisacaridos	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Artrofactina	<i>Arthrobacter sp</i>
Licosina A, B	<i>Bacillus licheniformis</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis, Bacillus pumilis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas Fluorescens</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Péptidos de lisina	<i>Streptomyces sioyaensis</i> <i>Gluconobacter cerinus</i>
Fosfolípidos	<i>Acinetobacter sp</i> <i>Penicillium spiculisporum</i> <i>Corynebacterium lepus</i>
Ácidos Grasos	<i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Talaromyces trachyspermus</i> <i>Nocardia erythropolis</i>

---

Tomado de (Mulligan, 2015)

#### **2.4.2 Aplicaciones de los biosurfactantes**

Los biosurfactantes debido a sus diferentes propiedades son moléculas de gran interés comercial, no solo en el campo de la remediación sino también han sido utilizados en la industria alimenticia, farmacéutica, petrolera.

En la industria alimenticia los biosurfactantes han tomado papel fundamental, puesto que se les ha utilizado como agentes estabilizadores y emulsificantes para productos industriales como son la estabilización de grasas al momento de realizar salchichas, para esto se utiliza el surfactante producido por *Candida utilis*. Se utiliza los biosurfactantes también como agentes antioxidantes como es el caso de los producidos por *Klebsiella* los cuales se utilizan para detener la oxidación del aceite de soya (Campos et al., 2013) .

Los biosurfactantes son utilizados en la industria farmacéutica gracias a sus capacidades antimicrobianas, en especial lo ramnolípidos. Se ha observado que este tipo de biosurfactantes tienen la capacidad de evitar el crecimiento de bacterias Gram positivas lo que resulta muy beneficiosos para utilizarlo para el tratamiento de infecciones a nivel dermatológico. Se ha encontrado también que los biosurfactantes producidos por *Pseudomonas* sp. ayudan a combatir enfermedades que afectan a los polimorfonucleares neutrófilos humanos que producen la enfermedad del shock séptico producidas por altas concentraciones de bacterias Gram positivas (Zheng et al., 2017).

En cuanto a la industria petrolera, los biosurfactantes aparte de ser utilizados para remediación de zonas contaminadas con petróleo se los utiliza como aditivos para la limpieza de ductos y barriles que hayan contenido petróleo con el fin de disminuir la cantidad de petróleo que se desperdicia al momento de trasladar el crudo, también se utiliza al momento de extraer los pozos petroleros, se inyecta agua con biosurfactantes para aprovechar al máximo la cantidad de petróleo extraído (Silva et al., 2014) .

### **2.5 Bacteria *Stenotrophomonas* sp.**

Este género fue creado en 1993 únicamente para ubicar a la bacteria *Xanthomonas maltophilia* antes nombrada *Pseudomonas malthophilia*. Sin embargo, estudios

recientes han encontrado 5 especies nuevas de *Stenotrophomonas* sp. las cuales son: *S. Africana*, *S. nitritireducens*, *S. rhizophila*, *S. acidaminiphila*, *S koreensis*. No obstante, cada una se diferencia de *Stenotrophomonas maltophilia* por pequeñas diferencias en la capacidad de metabolizar diferentes sustratos. Existe autores como Coenye y Cols que presumen que todas las bacterias del género *Stenotrophomonas* son cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* (Elmer & Stephen, 2008).

Esta bacteria es Gram negativa, taxonómicamente consiste en células pequeñas con una longitud de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ , son bacterias móviles gracias a que poseen flagelos politrítricos polares (Elmer & Stephen, 2008). Sus colonias son comúnmente de color blanco con tonos amarillentos en agar nutrientes sin embargo en otro tipo de agares presentan una coloración café. En cuanto a las condiciones de crecimiento esta bacteria no crece a temperaturas menores a 4°C y temperaturas mayores a 41°C por lo que su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 33 a 37°C (Martínez, García, & Jiménez, 2007, pp. 91-94).

En el 2012 se realizó un estudio, se empleó la bacteria *Stenotrophomonas koreensis*, en este estudio se buscaba optimizar las condiciones de operación y de cultivo enfocándose en la producción de biosurfactantes, se determinó que la bacteria producía la mayor concentración de biosurfactantes a un pH 6 y a una temperatura de 37°C, no se evaluó la agitación del medio y el tiempo de fermentación empleado fue 30 horas (Patil, et al, 2012).

Se ha demostrado que esta bacteria tiene la capacidad de metabolizar una gran cantidad de sustratos complejos como son aceites vegetales, aceites fósiles, glicerol entre otros. En el 2013 se realizó un estudio para la producción de biosurfactantes utilizando *Stenotrophomonas maltophilia* para la degradación de pirenos, en donde la bacteria creció por un periodo de 48 horas, en una agitación de 200 rpm y una temperatura de 30°C (Singh et al., 2015).



## 2.6 Metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta emplea técnicas estadísticas y matemáticas para analizar y modelar problemas en donde una variable dependiente de interés es influenciada por otras variables (diseños centrales compuestos). Los diseños centrales compuestos son diseños factoriales o factoriales fraccionados compuesto por puntos axiales y puntos centrales, estos diseños son útiles cuando se realizan experimentos secuenciales, por su facilidad de agregar puntos axiales a experimentos anteriores (Winters, Winters, & Amedee, 2010). Por lo general estas metodologías se usan cuando se desean optimizar la producción de la variable dependiente. Existen diferentes modelos de optimización, el empleo de cada modelo dependerá del número de variables independientes que se van a analizar, los factores analizados pueden ser cuantitativos o cualitativos. Para estandarizar los niveles de las variables o factores que se analizan por lo general se usan valores cifrados. En este estudio se utilizó un modelo en donde las variables centrales se representan con el valor de 0, los valores de escala se representan con (+-1) y los factores máximos y mínimos se representan con el valor de (+-1,4). Estos valores mediante modelos matemáticos interactúan para obtener los tratamientos que se realizaran en los diseños experimentales. (figura 1).

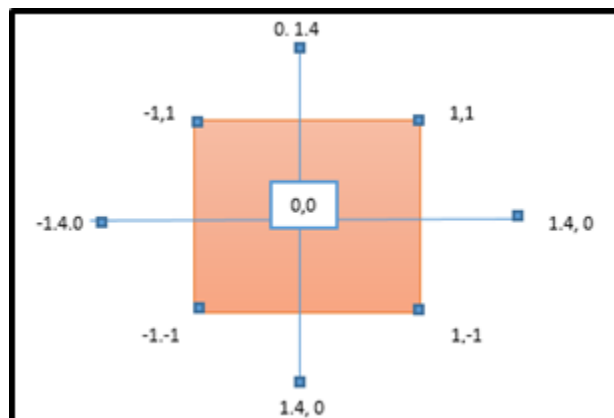


Figura 1. Esquema de combinación de variables para diseño experimental  $2^k$ .

La resolución se ilustra en una interacción en 3D (gráfico de superficie de respuesta), en donde se observa la interacción de la variable de respuesta con las variables independientes. Sin embargo, esta ilustración no suele ser muy práctica al momento de encontrar la mejor relación; el gráfico de contornos por otro lado si resalta los rangos óptimos de las variables estudiadas y el error que tienen estas (Collins, Dziak, & Li, 2009, pp. 202-224)

### 3. Capítulo III. Metodología

#### 3.1 Diseño del plan experimental

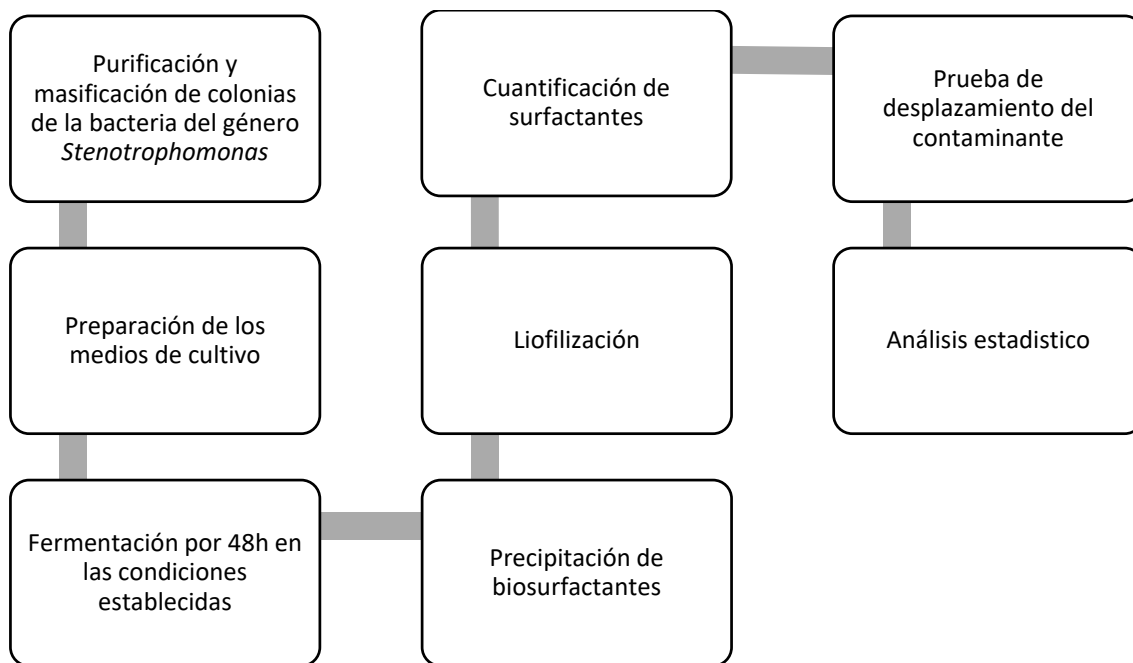


Figura 2. Diagrama de las etapas desarrolladas en el trabajo experimental

Para este estudio se determinaron 3 variables independientes: pH del medio de cultivo, agitación y temperatura en el proceso de fermentación. Las concentraciones de los nutrientes del medio de cultivo, tales como fuente de carbono, nitrógeno y sales minerales, se muestran en la tabla 6. Estos valores de concentración fueron optimizados en una investigación previa por Valdospinos (2017). La variable

dependiente de la investigación fue la concentración de biosurfactantes producidos por la bacteria.

En este trabajo se realizaron 3 diseños experimentales centrales compuestos, con gráficos de superficie de respuesta correspondientes a las 3 variables estudiadas. Para esto, cada tratamiento de cada diseño se evaluó por triplicado, lo que resultó en un total de 27 tratamientos por diseño experimental.

Para determinar los rangos de las variables que se estudiaron se determinó un valor central: pH = 6,5, agitación = 130 rpm y temperatura = 33°C. El primer diseño experimental central se realizó mediante la combinación de las variables temperatura (X) y agitación (Y) (Tabla 2)

Tabla 2.

*Interacción de las variables del primer diseño experimental.*

<b>Tratamiento</b>	<b>X</b>	<b>Y</b>
<b>1</b>	0,0	0,0
<b>2</b>	1,4	0,0
<b>3</b>	1,0	1,0
<b>4</b>	0,0	1,4
<b>5</b>	-1,0	-1,0
<b>6</b>	-1,4	9,0
<b>7</b>	-1,0	1,0
<b>8</b>	0,0	-1,4
<b>9</b>	1,0	-1,0

El segundo diseño experimental central se realizó mediante la combinación de las variables Agitación (X) y pH (Y) (Tabla 3)

Tabla 3.

*Interacción de las variables del segundo diseño experimental.*

<b>Tratamientos</b>	<b>X</b>	<b>Y</b>
1	0,0	0,0
2	1,4	0,0
3	1,0	1,0
4	0,0	1,4
5	-1,0	-1,0
6	-1,4	9,0
7	-1,0	1,0
8	0,0	-1,4
9	1,0	-1,0

El tercer diseño experimental central se realizó mediante la combinación de los variables pH (X) y Temperatura (Y) (Tabla 4)

Tabla 4.

*Interacción de las variables del tercer diseño experimental.*

<b>Tratamientos</b>	<b>X</b>	<b>Y</b>
1	0,0	0,0
2	1,4	0,0
3	1,0	1,0
4	0,0	1,4
5	-1,0	-1,0
6	-1,4	9,0
7	-1,0	1,0
8	0,0	-1,4
9	1,0	-1,0

Tabla 5.

*Rangos decodificados de las variables independientes estudiadas*

<b>Variables independientes</b>			
<b>Valores del diseño</b>	<b>Agitación (rpm)</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
<b>+1,4</b>	81	7,9	37,2
<b>+1,0</b>	95	7,1	36,0
<b>0,0</b>	130	6,3	33,0
<b>-1,0</b>	165	5,5	30,0
<b>-1,4</b>	180	5,1	28,8

### 3.2. Procedimientos

#### 3.2.1 Materiales y métodos para la obtención de los datos

Los diferentes equipos que se utilizaron en este proyecto fueron: balanza analítica (Radwag, Polonia), centrífuga refrigerada (Sigma, E.E.U.U), espectrofotómetro (Thermo Scientific, E.E.U.U), incubadora (Biobase, Alemania), liofilizador (SP Scientific, Inglaterra)

Los diferentes reactivos que se utilizaron en este proyecto fueron: ácido clorhídrico, (Casa del Químico, Ecuador) Agar nutriente, caldo nutritivo (Becton and Dickinson, Francia), cloruro de calcio (Loba Chemie, India), cloruro de sodio (Fisher Scientific, E.E.U.U), fosfato mono básico de potasio, fosfato di básico de potasio (Fisher Scientific, E.E.U.U), glucosa (Panreac and AppliChem, España and Alemania), nitrato de potasio (Loba Chemie, India), peptona (Merck, Alemania), sulfato de amonio (Fisher Scientific, E.E.U.U), sulfato de manganeso hidratado (Loba Chemie, India), sulfato de magnesio heptahidratado (Panreac and AppliChem, España and Alemania), sulfato de hierro heptahidratado (Loba Chemie, India) y Úrea (Fisher Scientific, E.E.U.U)

Masificación y purificación de las colonias de *Stenotrophomonas* sp.

La bacteria fue cedida por el laboratorio de Biotecnología LQ3 la cual fue obtenida del stock de cepas del laboratorio de Biotecnología Industrial de la Universidad de Las Américas, Quito. La bacteria fue masificada en medios comerciales específicamente en agar nutriente y caldo nutritivo. Mediante diluciones seriadas se aislaron las colonias para evitar algún tipo de contaminación. Se inoculó la bacteria en varias cajas Petri con agar nutriente. Estos inóculos fueron utilizados como cultivos madre que se utilizaron a lo largo del proyecto. Para iniciar los diseños experimentales la cepa se cultivó en un medio básico de sales, aceite de soya como fuente de carbono y peptona como fuente de nitrógeno.

Preparación del medio de cultivo

Las concentraciones establecidas para el medio de cultivo se muestran en la tabla 6. Estas concentraciones fueron obtenidas de la investigación realizada por Valdospinos (2017). Las concentraciones de los reactivos fueron constantes en toda la investigación.

Tabla 6.

*Concentraciones constantes del medio de cultivo.*

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
Peptona	2,500 g/L
Aceite de soya*	18,400 g/L
NaCl	0,055 g/L
FeSO <sub>4</sub>	0,008 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,000 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,500 g/L
CaCl <sub>2</sub>	0,100 g/L

MnSO <sub>4</sub>	0,003 g/L
MgSO <sub>4</sub>	0,780 g/L
ZnSO <sub>4</sub>	0,050 g/L

Nota: Densidad aceite: 0,92 g/L

#### Curva de crecimiento de la bacteria *Stenotrophomonas sp.*

La curva de crecimiento se realizó a escala laboratorio previo a la optimización de las condiciones de operación; se utilizó una temperatura de 27°C, una agitación de 150 rpm y un pH de 6,5. Se tomó un inóculo inicial de 50 mL, el cual se utilizó posteriormente para inocular un medio de cultivo de 500 mL. El crecimiento celular se determinó midiendo la absorbancia cada hora, para esto se centrifugó 1 mL de la muestra, se resuspendió en 1 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 600 nm. Los datos obtenidos fueron convertidos a medidas de absorbancia mediante una curva de calibrado (Doran, 2013, pp. 65-67).

#### Condiciones de cultivo correspondientes a los tratamientos experimentales

El medio de cultivo para cada tratamiento se realizó en matraces de 100 mL con un volumen total de 60 mL, y un volumen de inóculo del 10% del volumen del medio de cultivo; las concentraciones de los nutrientes fueron valores constantes mientras que las condiciones de operación fueron las variables analizadas (Doran, 2013, p. 174). El tiempo de fermentación fue 48 horas. Cada tratamiento se realizó por triplicado. El pH, la agitación y la temperatura fueron las variables a ser optimizadas (Valdospinos, 2017).

#### Precipitación de los biosurfactantes

Tras 48 horas de fermentación se separó la biomasa del medio fermentado mediante una centrifugación a 8000 rpm y 4°C por 20 minutos. Se trabajó solo con el sobrenadante, el cual fue ajustado a un pH igual a 2, mediante el uso de ácido clorhídrico al 37%. Se congeló la muestra a -14°C por 24 horas. Pasadas las 24 horas se descongelaron las muestras en baño maría a 25°C y se centrifugaron a

7000 rpm por 20 minutos a 4°C. El pellet se homogeneizó en un tubo falcón de 15 mL con 3 mL de agua destilada. Los tubos se pesaron antes de colocar la muestra (Moussa, Mohamed, & Samak, 2014)

#### Obtención de los biosurfactantes

Una vez que los lípidos fueron resuspendidos en agua, se procedió a congelar las muestras a una temperatura de -80°C por 15 minutos. Las muestras totalmente congeladas se sometieron a un proceso de liofilización por un periodo de 24 horas hasta eliminar totalmente el agua de estas. Los biosurfactantes totales se pesaron para obtener un resultado cuantitativo por gravimetría (Han, Wen, Chen, & Li, 2011).

#### Método de desplazamiento del contaminante

Después de obtener los biosurfactantes se procedió a probar la funcionalidad de estos, para lo cual se hizo una prueba de desplazamiento. Se colocaron 4 gotas de petróleo en 10 mL de agua destilada vertida en una caja Petri. A la muestra de petróleo se le aplicaron 100 µL de la muestra Biosurfactante obtenido y se midió la distancia del halo con una cinta métrica. De esta manera se determinó la presencia indirecta de biosurfactante en las muestras procesadas (Montoya & Loredó, 2012)

#### Determinación de los parámetros cinéticos del medio optimizado

Para la determinación de los parámetros cinéticos se inoculó en el biorreactor de 5 litros, un inóculo de 500 mL, se determinó el crecimiento celular durante 50 horas, mediante la toma de muestras cada hora. Paralelamente se determinó la concentración de biosurfactantes. Una vez obtenidos los datos correspondientes a la producción celular y de producto, se realizaron los cálculos correspondientes. Esta fermentación se realizó con las condiciones de cultivo optimizadas. Para el cálculo de los parámetros cinéticos se utilizaron las siguientes fórmulas: (Doran, 2013)



$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{x_f}{x_0}\right)}{t} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$Td = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$Y_{\frac{P}{X}} = -\frac{\Delta P}{\Delta X} \quad (\text{Ecuación 3})$$

### Determinación del coeficiente volumétrico de consumo de oxígeno

Este procedimiento se realizó en un biorreactor de 5 litros. Se colocó el medio estéril y se lo saturó con oxígeno hasta llegar al 100%. Posteriormente se inoculó con 10% y se canceló el suministro de oxígeno hasta que la concentración del mismo llegó a 10%. Se volvió a suministrar oxígeno hasta que éste sea constante. Se procesaron los datos y se determinaron las constantes de consumo de oxígeno con las siguientes fórmulas: (Soler & Buitrago, 2010)

$$\frac{dC}{dt} = KLa(C^{\circ} - C) \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$\ln\left(1 - \frac{C(t)}{C^{\circ}}\right) = -klat \quad (\text{Ecuación 5})$$

### **3.2.3 Evaluación estadística de los resultados**

Para el análisis de datos provenientes de los diseños experimentales se realizó una regresión multivariable utilizando Excel® y Statistica 13®, con esta regresión multivariable se determinaron los rangos óptimos de las variables analizadas. Para obtener las gráficas de superficie de respuesta se utilizó el software Statistica 13®. En la prueba de desplazamiento del contaminante, se determinó el mejor tratamiento que genera una mayor calidad del biosurfactante producido mediante gráficas de barras en Excel®.

## 4. Capítulo IV. Resultados y discusión

### 4.1 Curva de calibrado de *Stenotrophomonas* sp.

Se obtuvo una curva de calibrado de la bacteria *Stenotrophomonas* sp. (figura 3), utilizando el método de gravimetría y el método de absorbancia. Se obtuvo la ecuación de la recta:  $y = 1341,5x + 0,2136$  con un coeficiente de regresión ( $R^2$ ) de 0,9912, lo cual indica que el 99,12% de los datos obtenidos se ajustan a la ecuación de la recta y por lo tanto a la regresión lineal. Según Colla et al. (2010), un valor aceptable para coeficiente de regresión en una investigación biológica debe superar los 0,8; lo que confirma que esta curva es óptima para la investigación.

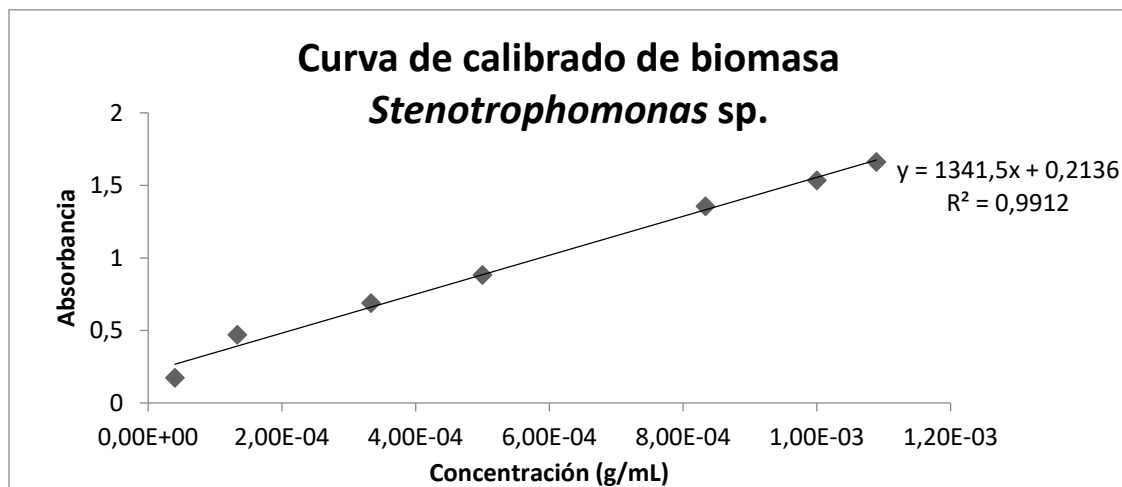


Figura 3. Curva de calibrado de *Stenotrophomonas* sp.

### 4.2 Curva de crecimiento de la bacteria *Stenotrophomonas* sp. escala de laboratorio antes de realizar la optimización.

Se realizó una curva de crecimiento de la bacteria *Stenotrophomonas* sp. (figura 4), la cual fue obtenida mediante la fermentación de la bacteria por un periodo de 50 horas. No se identificó una fase de latencia; se observa la etapa exponencial, que ocurre entre la hora 9 y la hora 36; la fase estacionaria va desde las 37 hasta las 50 horas; no se observó la fase de muerte celular.

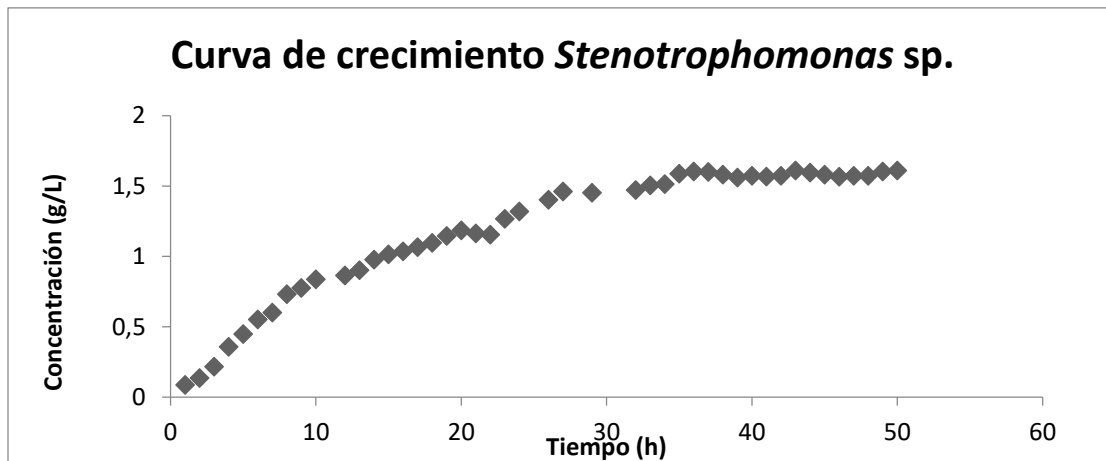


Figura 4. Curva de crecimiento a escala laboratorio previo a la optimización.

#### 4.3 Curva de crecimiento escala banco de la bacteria *Stenotrophomonas* sp. utilizando las condiciones de operación optimizadas.

Se realizó una curva de crecimiento de la bacteria *Stenotrophomonas* sp. (figura 5), la cual fue obtenida mediante la fermentación de la bacteria por un periodo de 50 horas, no se observa una fase de latencia, pero se observa la etapa exponencial, la cual comienza a las 0 horas y dura hasta las 28 horas; la fase estacionaria va desde las 32 hasta las 42 horas, y la fase de muerte celular se produce a partir de las 43 horas.

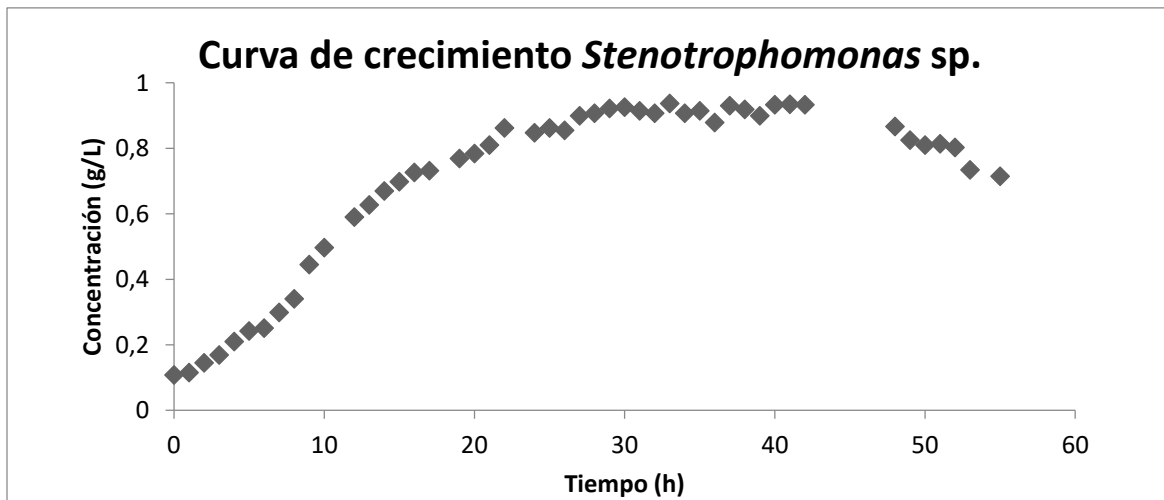


Figura 5. Curva de crecimiento a escala banco posterior a la optimización

En ambas curvas de crecimiento de la bacteria *Stenotrophomonas* sp. tanto el tratamiento no optimizado (figura 4) como el tratamiento optimizado (figura 5) no se observa una fase “lag” en el crecimiento de la bacteria. Esta fase comúnmente se da porque las células agotan varias coenzimas esenciales u otros compuestos celulares necesarios y requieren un cierto tiempo de adaptación para ser resintetizadas. Según Rolfe et al. (2012), la ausencia de esta fase de crecimiento es producida por dos motivos: la bacteria inoculada ya estaba acondicionada previamente al nuevo medio de cultivo térmica y químicamente, o porque la bacteria posee una capacidad adaptativa acelerada lo que permite tener una fase exponencial de crecimiento al momento de inocular la bacteria. En esta investigación, el inóculo fue refrigerado previamente para mantener la concentración celular, por lo tanto, la temperatura entre el inóculo y el medio de cultivo no son las mismas. Se cree que esta bacteria posee un periodo de adaptación eficaz y rápido, lo que se corroboró con una investigación previa realizada por Zissi & Lyberatos (1999), donde se realizó un estudio de la cinética de crecimiento de la bacteria *Stenotrophomonas Maltophilia* para la degradación de anilina. En dicha investigación la bacteria presentó un crecimiento sin fase lag, con una fase exponencial desde las 0 hasta las 17 horas, comportamiento que se apega a la conducta de crecimiento de la bacteria utilizada en esta investigación.

La primera fermentación se realizó a escala laboratorio en un matraz de 500 mL mientras que la segunda fermentación se realizó en un biorreactor de 5 L. Al comparar las curvas de crecimiento de ambas fermentaciones (figuras 4 y 5), se observó que en la segunda fermentación la bacteria posee una pendiente mayor que en la primera, lo que indica que la velocidad específica de crecimiento  $\mu$ , es mayor en la segunda fermentación a escala de biorreactor. Esto quiere decir que el crecimiento bacteriano se produce mucho más rápido a escala de biorreactor (tabla 7). Según Casalta et al (2010), al realizar el escalado en una fermentación las cinéticas de crecimiento varían debido a un mayor control en cuanto a la homogenización y oxigenación del medio. El crecimiento bacteriano en un biorreactor por lo general se ve favorecido con respecto al crecimiento bacteriano a escala laboratorio; esto explica la diferencia de la velocidad de crecimiento que se obtuvo entre las dos fermentaciones realizadas en esta investigación.

#### 4.4 Determinación de los parámetros cinéticos de *Stenotrophomonas sp.*

Se obtuvieron los parámetros cinéticos de crecimiento de la bacteria *Stenotrophomonas sp.* antes y después de la optimización. Cuando se realizó el escalado de laboratorio a banco, la velocidad específica de crecimiento aumentó de  $0,065 \text{ h}^{-1}$  a  $0,12 \text{ h}^{-1}$  respectivamente, lo mismo sucedió con el tiempo de duplicación el cual aumentó de 3,00 a 3,66 horas.

Tabla 7.

*Parámetros cinéticos de Stenotrophomonas sp.*

Parámetros Cinéticos	Fórmula	Escala Banco	Escala laboratorio
		$0,120 \text{ h}^{-1}$	$0,065 \text{ h}^{-1}$

---

<b>Velocidad específica de crecimiento</b> ( $\mu$ )	$\mu = \frac{\ln\left(\frac{x_f}{x_0}\right)}{t}$		
<b>Velocidad máxima de crecimiento</b> ( $\mu_{max}$ )	$\mu_{max} = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1}$	0,231 h <sup>-1</sup>	0,189 h <sup>-1</sup>
<b>Tiempo de duplicación</b> ( $T_d$ )	$T_d = \frac{\ln 2}{\mu}$	3,00 h	3,660 h
<b>Productividad global de biomasa</b> ( $\gamma_x$ )	$\gamma_x = \frac{X_f - X_0}{T_f - T_0}$	0,021 $\frac{g}{Lh}$	0,041 $\frac{g}{Lh}$

---

La variación de las velocidades de crecimiento y los tiempos de duplicación se debe a la relación entre las cinéticas de crecimiento y el escalado de un bioproceso, detallado previamente. En una investigación realizada por Hernández (2016) que utilizó la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia*, se optimizaron las condiciones de operación para la obtención de biomasa utilizando como fuente de carbono la glucosa, una temperatura de 24°C, una agitación de 70 rpm y un pH de 5; se obtuvo una velocidad específica de crecimiento de 0,149 h<sup>-1</sup> y un tiempo de duplicación de 2,64 h. Esto indica que mediante el uso de dichas condiciones de operación el crecimiento de la bacteria se ve afectado positivamente. Según Cervantez (2014), esta bacteria cuando llega a adaptarse completamente al medio, utilizando sustratos fáciles de metabolizar, puede llegar a tener una velocidad específica de crecimiento de 0,3 h<sup>-1</sup>. Por otro lado, si la bacteria solo tiene a disposición sustratos

complejos tales como la artrazina y el pireno, las cinéticas de crecimiento se ven afectadas negativamente. En el presente estudio la fuente de carbono utilizada fue aceite de soya. Para este sustrato es necesario un tiempo de adaptación, lo que explica una menor velocidad específica de crecimiento y un mayor tiempo de duplicación.

#### 4.5 Diseño central compuesto utilizando las variables de agitación y temperatura

##### 4.5.1 Producción de Biosurfactantes

Se obtuvo la producción de biosurfactantes neta de cada tratamiento (figura 6), el metabolito se determinó en una concentración de g/L. Se observó que el tratamiento 1 es el que posee la mayor producción de biosurfactantes con 1,074 g/L mientras que el tratamiento 8 es el que posee la menor producción de biosurfactantes con 0,649 g/L.

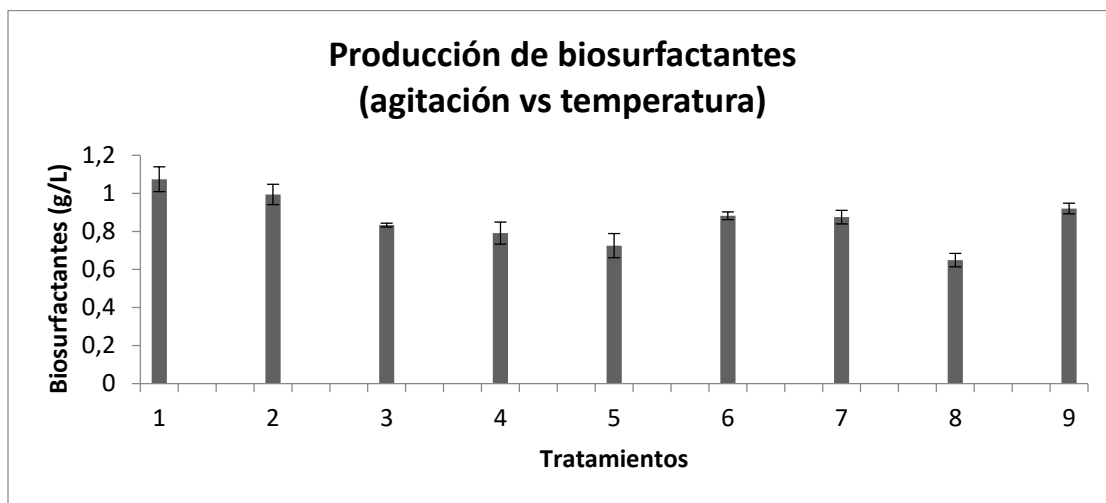


Figura 6. Producción neta de biosurfactantes del diseño experimental.

##### 4.5.2 Gráfico de superficie de respuesta

Mediante la aplicación del diseño central compuesto, se obtuvo un gráfico de superficie de respuesta con la finalidad de estudiar la relación entre las variables de temperatura, agitación y la influencia de estas en la producción de biosurfactantes.

El análisis de ANOVA del diseño experimental (tabla 8) determinó que existe una diferencia significativa para la variación lineal (L) en ambas variables, y una diferencia significativa para la variación cuadrática (Q) en la variable de agitación con relación a la producción de biosurfactantes. Esto debido a que en las 3 variaciones el valor de la probabilidad es menor a 0,05. El error típico del diseño fue 0,0038, valor aceptable para la evaluación de la respuesta de este diseño. Se obtuvo un valor del coeficiente de regresión ( $R^2$ ) de 0,95, lo que indica que el 95% de los datos se representan en la gráfica y en la regresión. El valor de F observado fue 12,5 mientras que el valor de F crítico fue 0,0007, con esto se acepta la hipótesis alternativa y se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto, al menos un tratamiento es diferente entre los demás tratamientos.

Tabla 8.

*ANOVA de las variables de temperatura y agitación para obtención biosurfactante.*

<b>ANOVA</b>					
Var: Biosurfactantes (g/L); R-sqr=0,97544					
2 factors, 1 Blocks, 10 Runs; MS Residual=0,001116					
DV: Biosurfactantes (g/L)					
<b>Factor</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
(1) Temperatura (C°) (L)	0,012	1	0,012	10,858	0,045
Temperatura (C°) (Q)	0,004	1	0,004	1,064	0,363
(2) Agitación (rpm)(L)	0,010	1	0,010	8,996	0,057
Agitación (rpm)(Q)	0,088	1	0,088	79,179	0,002
1L by 2L	0,014	1	0,014	1,258	0,381



Error	0,003	3	0,001
Total, SS	0,136	8	

En la gráfica de superficie de respuesta (figura 7) las variables independientes fueron temperatura (eje X) y agitación (eje Y), mientras que la variable dependiente que corresponde a la producción de biosurfactantes se presenta en el eje Z. Mediante este gráfico se determinó la producción máxima de biosurfactantes, la cual fue 1,2 g/L, y se observa en el gráfico en la zona de color rojo oscuro, mientras que la producción mínima del metabolito fue 0,32 g/L, que se visualiza en las zonas verde y amarillas del gráfico. Para obtener esta concentración máxima de biosurfactantes los rangos óptimos de las variables estudiadas fueron: temperatura de 33 a 33,5 C°, y agitación 134 a 135 rpm. Lo descrito anteriormente se observa con detalle en el gráfico de contornos (figura 8).

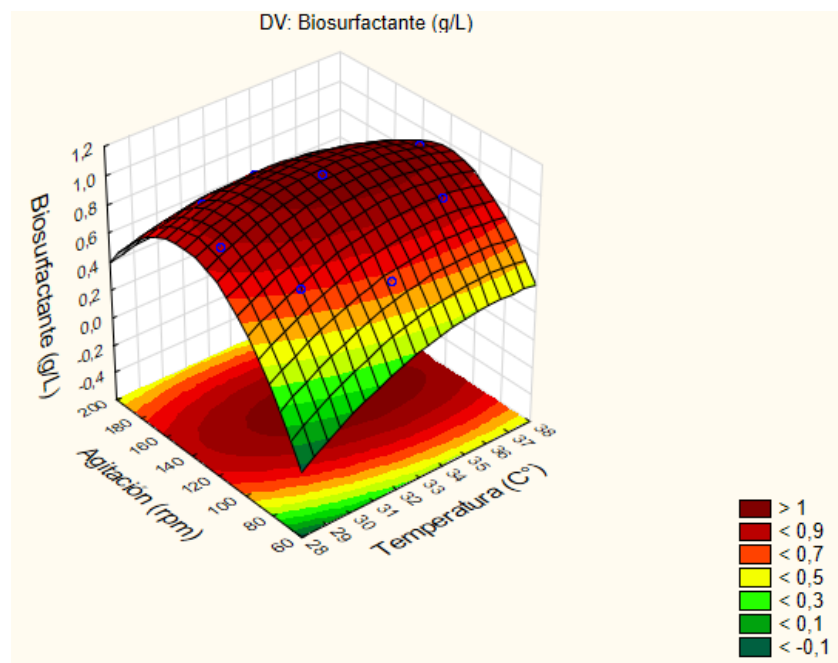


Figura 7. Superficie de repuesta de las variables: Temperatura, agitación

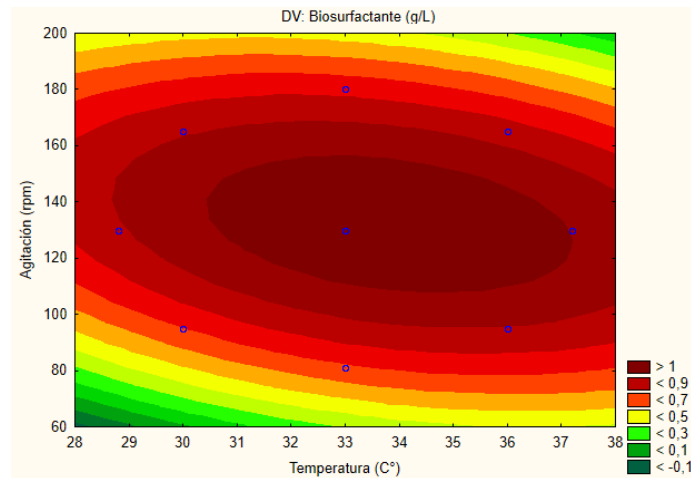


Figura 8. Gráfico de contornos correspondientes a las variables de temperatura y agitación

Mediante una regresión multivariable se determinó una ecuación de segundo orden, esta permite conocer la influencia de las variables independientes X y Y sobre la variable dependiente Z.

Donde X corresponde a la temperatura, Y corresponde a la agitación y Z corresponde a la producción de biosurfactantes. La Ecuación obtenida fue la siguiente:

$$Z = f + aX_1 + bY + cX^2 + dY^2 + eXY \quad (\text{Ecuación 6})$$

Los coeficientes fueron determinados mediante cálculos en el software Excel®:  $a = 0,0014$ ,  $b = 0,0033$ ,  $c = -0,0018$ ,  $d = -0,0088$ ,  $e = -0,0062$ , y  $f = 0,0536$ . Se derivó la ecuación 6 en función de cada variable establecida. Luego de la derivación se obtuvieron las siguientes ecuaciones:

$$\frac{\delta Z}{\delta X} = -0,0037X - 0,0062Y + 0,0014 \quad (\text{Ecuación 7})$$

$$\frac{\delta Z}{\delta Y} = -0,0062X - 0,0176Y + 0,0033 \quad (\text{Ecuación 8})$$

Mediante la resolución de las ecuaciones 7 y 8 se obtuvieron los valores codificados tanto para la variable X, como para la variable Y, ( $X = 0,1469$ ;  $Y = 0,1357$ ). Se descodificó estos valores con el fin de obtener los valores óptimos reales de cada variable independiente con las siguientes ecuaciones:

$$X = (X \text{ Codificado} * 3) + 33 \quad (\text{Ecuación 9})$$

$$Y = (Y \text{ Codificado} * 35) + 130 \quad (\text{Ecuación 10})$$

Se obtuvieron valores de temperatura óptima de  $33,4^{\circ}\text{C}$  y agitación de  $134,74 \text{ rpm}$ ; La máxima producción de biosurfactantes predicha por el modelo fue  $1,078 \text{ g/L}$ . Por otro lado, la concentración de producto obtenido con las variables óptimas fue  $1,1376 \text{ g/L}$ .

En el diseño experimental se evidenció que la bacteria produjo la mayor cantidad de biosurfactantes en el tratamiento 1, al cual le corresponden una temperatura de  $33^{\circ}\text{C}$  y una agitación de  $130 \text{ rpm}$ ; la bacteria produjo menor cantidad de biosurfactantes cuando esta fue incubada a una agitación menor a  $130 \text{ rpm}$ . Sin embargo, mediante la regresión multivariable, se obtuvieron los valores óptimos de cada variable, siendo estos una temperatura de  $33,4^{\circ}\text{C}$  y una agitación de  $134,74 \text{ rpm}$ , con una concentración de biosurfactantes de  $1,13 \text{ g/L}$ . En un estudio realizado por Zambrano (2012) se utilizó la bacteria *Pseudomonas Aeruginosa* en donde se obtuvo la mayor concentración de biosurfactantes, la cual fue  $1,3 \text{ g/L}$  mediante el empleo de una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  y una agitación de  $120 \text{ rpm}$ . Bedoya & Hoyos (2010) argumentan que la importancia de la agitación en la producción de metabolitos es la influencia que tienen estos factores con el crecimiento microbiano. Una agitación muy baja disminuye la disponibilidad de nutrientes, genera la acumulación de compuestos tóxicos que se puedan producir en la fermentación, y además produce una acumulación de la biomasa. Mientras que una agitación muy

alta genera estrés hidrodinámico en las bacterias, lo que puede producir lisis celular. Todos estos parámetros varían dependiendo del microorganismo, por lo cual es crucial realizar estudios de optimización al utilizar una bacteria como una biofactoría.

Por otro lado, la importancia que tiene la temperatura en la producción de biosurfactantes también está relacionada con el crecimiento celular, sin embargo, Sousa et al., (2014) recalca que la importancia de la temperatura, aparte de influir en el crecimiento bacteriano, es la estabilización de emulsiones. En temperaturas mayores a 30°C se reduce la viscosidad de aceites, lo que aumenta la diferencia de densidad entre la fase acuosa y la fase oleosa, esto se ve reflejado en el incremento del movimiento de Brownian.

#### 4.5.3 Test del desplazamiento del contaminante

En la tabla 9 se observa la longitud de desplazamiento del contaminante con el uso de los biosurfactantes producidos en el diseño experimental. El tratamiento que obtuvo mayor longitud de desplazamiento fue el tratamiento 2, mientras que los diseños que obtuvieron menor longitud de desplazamiento fueron los tratamientos 8 y 9.

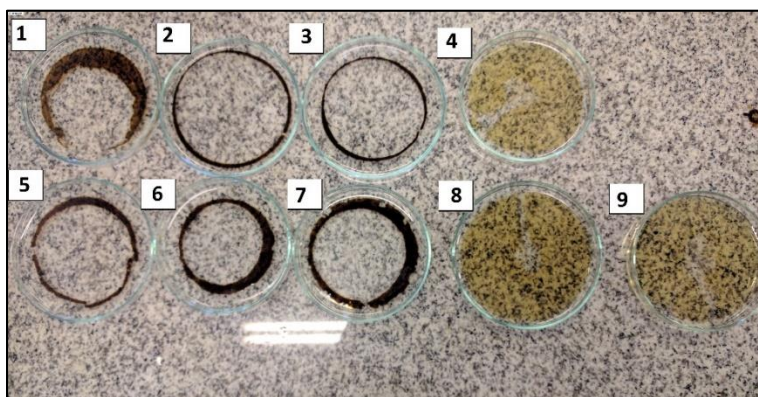
*Tabla 9.*

*Prueba del desplazamiento del contaminante con los biosurfactantes producidos.*

<b>Tratamiento</b>	<b>Control (cm)</b>	<b>Desplazamiento (cm)</b>	<b>Descripción visual</b>
<b>1</b>	1	6,0	desplazamiento Normal
<b>2</b>	1	8,0	desplazamiento Normal
<b>3</b>	1	7,0	desplazamiento Normal
<b>4</b>	1	4,5	desplazamiento Normal
<b>5</b>	1	5,0	desplazamiento Normal

<b>6</b>	1	5,5	desplazamiento Normal
<b>7</b>	1	6,5	desplazamiento Normal
<b>8</b>	1	2,5	desplazamiento Normal
<b>9</b>	1	3,0	desplazamiento Normal

En la figura 9 se visualiza que en ningún tratamiento hubo la formación de agregados, sin embargo, el tratamiento que obtuvo mayor longitud de dispersión fue el tratamiento 2.



*Figura 9.* Prueba de desplazamiento del contaminante de cada tratamiento.

Se observa que la producción de biosurfactantes en los tratamientos no se relaciona directamente con el desplazamiento que producen los mismos en el petróleo. Según Cheng (2013), la producción de biosurfactantes no garantiza una buena calidad en el tensoactivo de la sustancia producida, lo cual podría justificar la deficiencia en el desplazamiento en los tratamientos 4, 8, 9 (pp. 390-396). Una deficiencia en una sustancia tensoactiva se produce debido a un mal control en la temperatura en el momento de realizar los procesos de extracción de los biosurfactantes (Hemlata, Selvin, & Tukaram, 2015b).

## 4.6 Diseño central compuesto utilizando las variables de agitación y pH

### 4.6.1 Producción de biosurfactantes

Se obtuvo la producción de surfactante (figura 10) de cada tratamiento, el surfactante se obtuvo en una concentración de (g/L). Se observa que el tratamiento 1 es el que posee la mayor producción de biosurfactantes con 1,78 g/L, mientras que el tratamiento 9 es el que posee la menor producción de biosurfactantes con 0,4338 g/L.

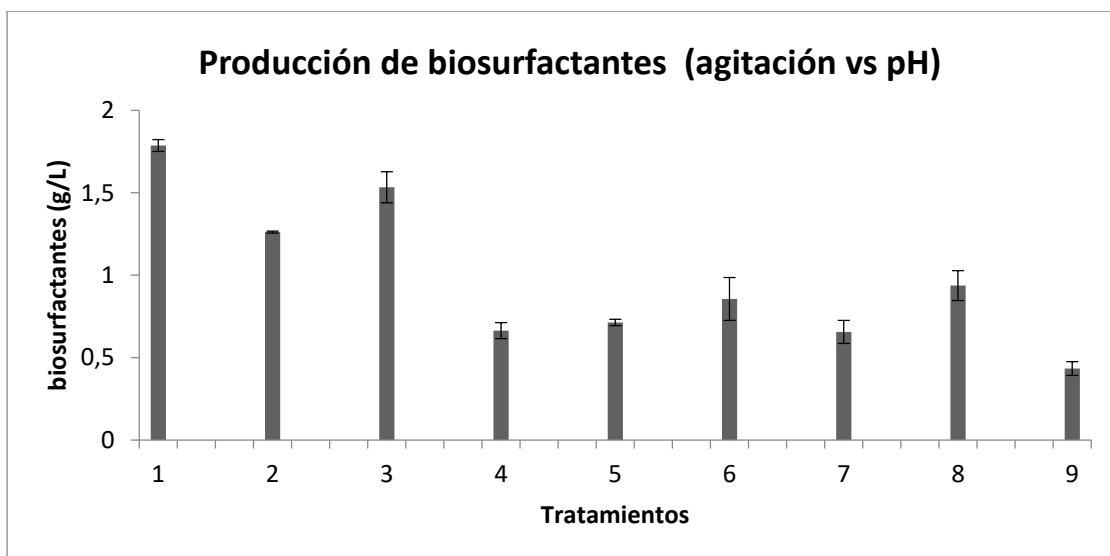


Figura 10. Producción neta de biosurfactantes del diseño experimental.

### 4.6.2 Gráfico de superficie de respuesta

Mediante la aplicación del diseño central compuesto se obtuvo un gráfico de superficie de respuesta, con la finalidad de estudiar la relación entre las variables de agitación, pH y la influencia de estas en la producción de biosurfactantes.

Mediante el análisis de ANOVA del diseño experimental (tabla 10). Se determinó que existe una diferencia significativa para la variación cuadrática (L), entre la variable de agitación y la variable de pH, en relación con la producción de biosurfactantes. Esto debido a que el valor de la probabilidad es menor a 0,05.

Mientras que las variaciones lineales no poseen una diferencia significativa, al tener un valor de probabilidad mayor a 0,005. El error típico del diseño fue 0,0029, valor aceptable para la evaluación de la respuesta de este diseño. Se obtuvo un valor del coeficiente de regresión ( $R^2$ ) de 0,8645 lo que indica que el 86% de los datos están representados en la gráfica de superficie y en la regresión lineal. El valor de F fue 13,6 mientras que el valor de F crítico fue  $1,91E-05$ , por ende, se acepta la hipótesis alternativa y se rechaza la hipótesis nula, lo que indica que al menos un tratamiento es diferente entre los demás tratamientos.

Tabla 10.

*ANOVA de la variación de agitación y pH para la producción de biosurfactante.*

<b>ANOVA</b>					
Var.:Biosurfactantes (g/L); R-sqr=0,8645					
2 factors, 1 Blocks, 10 Runs; MS Residual=0,0748197					
DV: Biosurfactantes (g/L)					
<b>Factor</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
(1) Agitación (rpm)(L)	0,287	1	0,287	3,838	0,121
Agitación (rpm)(Q)	0,702	1	0,702	9,384	0,037
(2) pH (L)	0,049	1	0,049	0,656	0,463
pH (Q)	1,257	1	1,257	16,804	0,014
1L by 2L	0,318	1	0,318	4,251	0,108
Error	0,002	4	0,074		
Total, SS	2,208	9			

En la gráfica de superficie de respuesta (figura 11), las variables independientes son: agitación (eje X), pH (eje Y), mientras que la variable dependiente, la cual corresponde a la producción de biosurfactantes, se presenta en el (eje Z). Mediante este gráfico se determinó la producción máxima del metabolito, la cual va de 1,1 a 1,3 g/L. Esta se muestra en el gráfico en la zona de color rojo oscuro, mientras que la producción mínima del mismo va de 0,35 a 0,04 g/L, esta se muestra en la zona verde oscura del gráfico. Lo descrito anteriormente se detalla de mejor manera en el gráfico de contornos (figura 12).

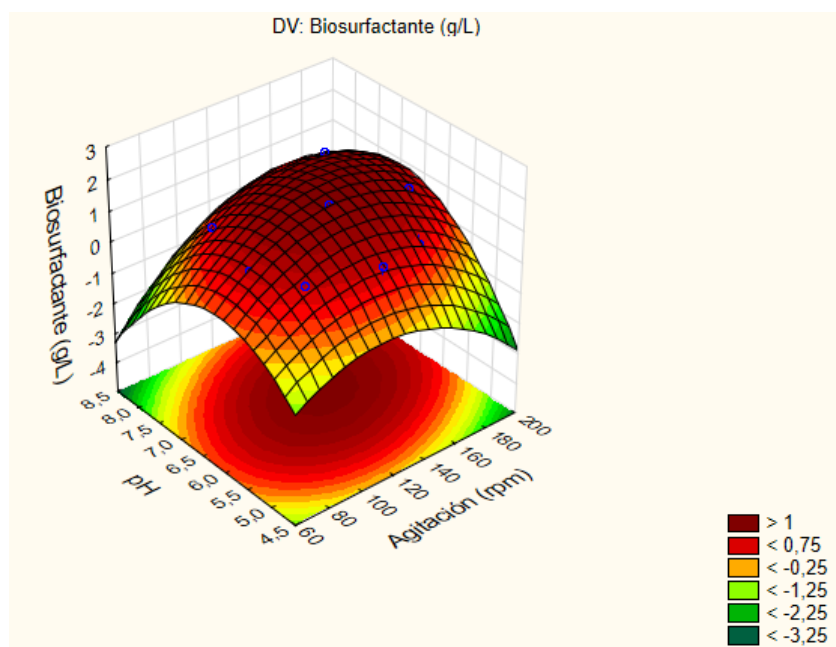


Figura 11. Gráfico de superficie de repuesta de las variables Agitación y pH



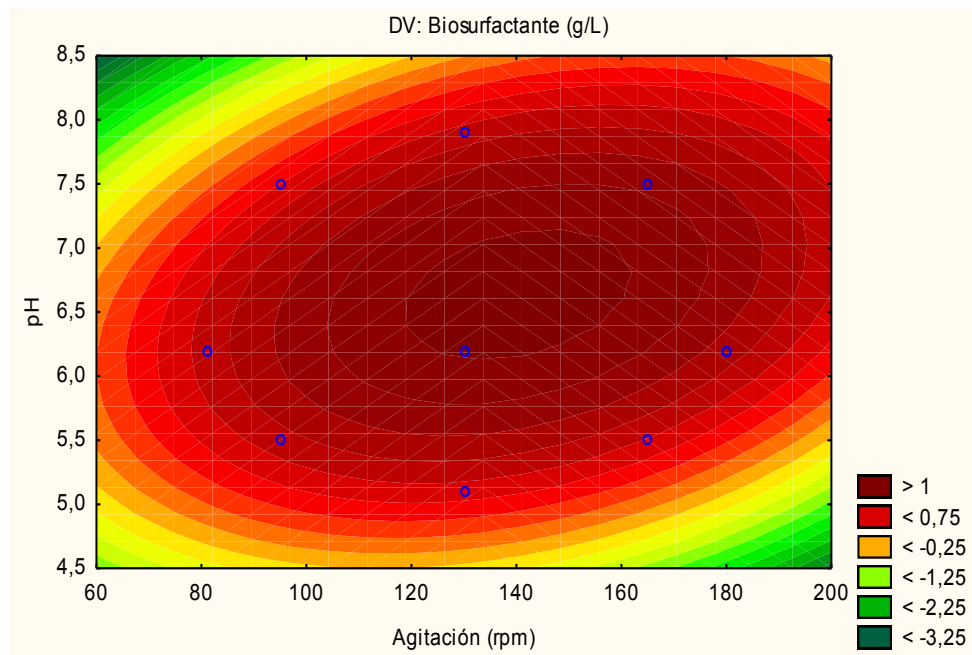


Figura 12. Gráfico de contornos correspondientes a las variables de agitación y pH.

Mediante una regresión multivariable se determinó una ecuación de segundo orden, la cual permite saber la influencia de las variables independientes X y Y sobre la variable dependiente Z.

Donde X corresponde a la agitación, Y corresponde al pH y Z corresponde a la producción de biosurfactantes. La Ecuación fue la siguiente:

$$Z = f + aX_1 + bY + cX^2 + dY^2 + eXY \quad (\text{Ecuación 11})$$

Los coeficientes fueron:  $a = 0,0154$ ,  $b = -0,0054$ ,  $c = 0,0181$ ,  $d = 0,0128$ ,  $e = 0,5933$ , y  $f = 0,0212$ . Se derivó la ecuación 11 en función a cada variable establecida. Luego de la derivación, se obtuvieron las siguientes ecuaciones:

$$\frac{\delta Z}{\delta X} = 0,0395X + 0,0144Y + 0,0075 \quad (\text{Ecuación 12})$$

$$\frac{\delta Z}{\delta Y} = 0,01446X - 0,05528Y + 0,0045 \quad (\text{Ecuación 13})$$

Mediante la resolución las ecuaciones 12 y 13, se obtuvieron los valores codificados tanto para la variable X como para la variable Y,  $X = 0,14$ ;  $Y = -0,42$ . Se descodificó estos valores con el fin de obtener los valores óptimos reales de cada variable independiente con las siguientes ecuaciones:

$$X = (X \text{ Codificado} * 35) + 130 \quad (\text{Ecuación 14})$$

$$Y = (Y \text{ Codificado} * 1) + 6,5 \quad (\text{Ecuación 15})$$

Se obtuvieron valores de agitación óptima de 134,9 rpm y pH de 6,08. La máxima producción de biosurfactantes predicha por el modelo fue 1,1 g/L. Por otro lado, la concentración de producto obtenido utilizando las variables óptimas fue 0,956 g/L.

En el diseño experimental se evidenció que la bacteria produjo la mayor cantidad de biosurfactantes en el tratamiento 1 y 3, estos poseen pH mayores a 6, mientras que los tratamientos que obtuvieron las menores concentraciones del metabolito fueron los que tenían pH menores a 6. En cuanto a la agitación se observa un rango amplio, en los cuales la bacteria tiene la posibilidad de generar biosurfactantes. Mediante la regresión multivariable se obtuvieron los valores óptimos de cada condición de cultivo, siendo estos: una agitación de 134 rpm y un pH de 6,08, con una concentración de biosurfactantes de 0,956 g/L. En un estudio realizado por Hemlata et al., (2015), se optimizaron las condiciones de cultivo y operación de la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* para la degradación de metales pesados, en donde se analizó la producción de biosurfactantes. El pH óptimo resultó ser 7,0. No obstante, en dicha investigación, los autores llegaron a la conclusión de que al disminuir el pH a 6, no había mucha variación en la concentración de biosurfactantes. Sin embargo, al momento en que el pH fue menor a 5,5, la bacteria presentó una deficiencia del 40% en cuanto a la producción de biosurfactantes. Por otro lado Kaskatepe, Yildiz, Gumustas, & Ozkan (2015) realizaron una optimización

del pH para la producción de biosurfactantes mediante el uso de *Pseudomonas* sp. El pH óptimo para la producción de biosurfactantes resultó ser 6,0, con una concentración de biosurfactantes de 2,3 g/L. Los autores Leon et al., (2017), aclaran que la importancia del pH para la producción de metabolitos con bacterias aisladas en ambientes contaminados, radica en la producción de enzimas y proteínas extracelulares, ya que estas se producen en valores de pH entre 4 y 6. Como complemento, se conoce que la producción de biosurfactantes está ligada a la producción de enzimas lipasas, lo que explicaría la dependencia de la bacteria a tener pH ácidos-neutros, con el fin de producir estas enzimas que le permitan metabolizar los compuestos contaminantes (Colla et al., 2010). El pH tiene un efecto primordial en la actividad tensoactiva de los biosurfactantes. Según los enunciados de Burgos, (2012) los biosurfactantes actúan de distinta forma iónica al estar en presencia de distintos rangos de pH; en ambientes alcalinos los biosurfactantes se comportan como tensoactivos aniónicos, en ambientes ácidos se comportan como tensoactivos catiónicos y en ambientes neutros estos se comportan como tensoactivos no iónicos. También es necesario detallar que estos son más estables en ambientes alcalinos y ácidos.

La agitación óptima de este diseño experimental es similar a la agitación que se obtuvo en los resultados del primer diseño, por lo cual la agitación óptima oscila entre 134,7 a 134,9 rpm. Debido a que es una diferencia decimal mínima, el rango óptimo se estableció entre 135 y 134,5 rpm, con una agitación óptima de 135 rpm.

#### **4.6.3 Test del desplazamiento del contaminante**

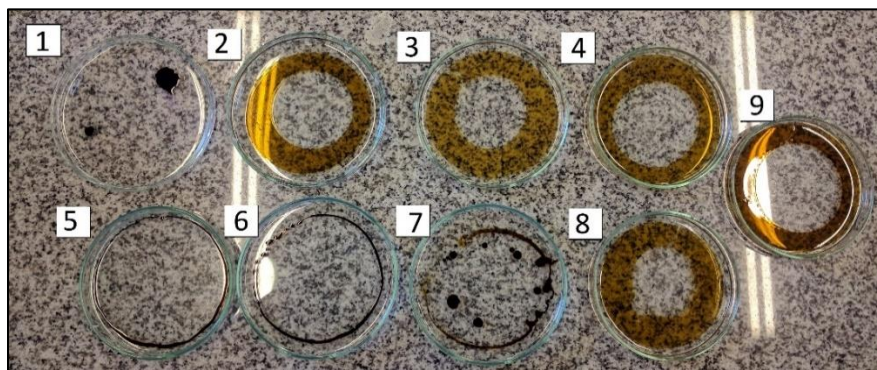
En la tabla 11, se observa la longitud de desplazamiento del contaminante mediante el uso de los biosurfactantes producidos en el diseño experimental, utilizando como variables independientes a la agitación y el pH. El tratamiento que obtuvo mayor longitud de dispersión fue el 1, mientras que el tratamiento que obtuvo menor desplazamiento fue el 8. El grupo control es la misma prueba utilizando como muestra medio de cultivo no inoculado.

Tabla 11.

*Prueba del desplazamiento utilizando los biosurfactantes producidos.*

Tratamiento	Control (cm)	Desplazamiento (cm)	Descripción visual
1	1	9,0	Formación de agregados
2	1	4,5	desplazamiento Normal
3	1	4,5	desplazamiento Normal
4	1	5,3	desplazamiento Normal
5	1	8,0	desplazamiento Normal
6	1	8,0	desplazamiento Normal
7	1	7,5	Formación de agregados
8	1	4,0	desplazamiento Normal
9	1	5,5	desplazamiento Normal

Se visualiza que en los tratamientos 1 y 7, hubo la formación de agregados. Mientras que en los tratamientos 5 y 6 hubo un desplazamiento total (figura 13).



*Figura 13.* Prueba de desplazamiento del contaminante de cada tratamiento.

En los test de desplazamiento del contaminante (figura 13), se observa que en 2 tratamientos el 1 y 7 se aconteció la formación de agregados. Sin embargo los tratamientos que obtuvieron mayor desplazamiento del contaminante fueron los tratamientos 1, 6, 5. Siguiendo los enunciados de Cheng (2013), la producción de biosurfactantes no está ligada a la calidad del biotensoactivo. (pp. 390-396) Sin embargo, como lo recalca Burgos (2012), el pH influye mucho en el comportamiento del tensoactivo, pues los biosurfactantes a pH neutros no son muy estables. Esto se comprueba en el presente estudio, ya que los tratamientos que obtuvieron el mayor desplazamiento corresponden a aquellos con pH menores o iguales a 6,5, mientras que los tratamientos con pH neutros no poseen un rango de desplazamiento establecido.

#### **4.7 Diseño central compuesto utilizando las variables de pH y temperatura**

##### **4.7.1 Producción de biosurfactantes**

Se obtuvo la producción neta de biosurfactantes de cada tratamiento (figura 14), los biosurfactantes se obtuvieron en una concentración de g/L. Se observa que el tratamiento 5 es el que posee la mayor producción de biosurfactantes con 1,53 g/L, mientras que el tratamiento 9 es el que posee la menor producción de biosurfactantes con 0,75 g/L.

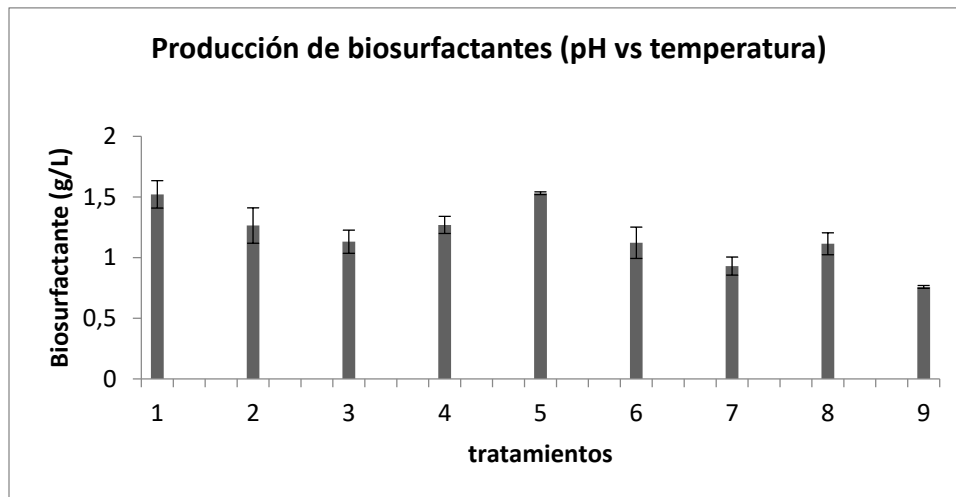


Figura 14. Producción neta de biosurfactantes del diseño experimental

#### 4.7.2 Gráfico de superficie de respuesta

Mediante la aplicación del diseño central compuesto, se obtuvo un gráfico de superficie de respuesta con la finalidad de estudiar la relación entre las variables de temperatura, agitación y la influencia de estas en la producción de biosurfactantes.

Mediante el análisis de ANOVA del diseño experimental (tabla 12), se determinó que existe una diferencia significativa para la variación lineal (L), entre la variable de temperatura en relación con la producción de biosurfactantes. Esto debido a que el valor de la probabilidad es menor a 0,05. Mientras que las variaciones cuadráticas (Q) no poseen una diferencia significativa al tener un valor de probabilidad mayor a 0,005. El error típico del diseño fue 0,0069, valor aceptable para la evaluación de la respuesta de este diseño. Se obtuvo un valor del coeficiente de regresión ( $R^2$ ) de 0,805, lo que significa que el 80% de los datos se representan de manera efectiva en la regresión y en la gráfica de superficie. El valor de F fue 13,9, mientras que el valor de F crítico fue 0,0003, lo que indica que acepta la hipótesis alternativa y se rechaza la hipótesis nula, por ende, al menos un tratamiento es diferente entre los demás tratamientos

Tabla 12.

*ANOVA de las variables de pH y temperatura para la producción de biosurfactantes.*

<b>ANOVA</b>					
Var: Biosurfactantes (g/L); $R^2 = 0,805$					
2 factors, 1 Blocks, 10 Runs; MS Residual=0,1649386					
DV: Biosurfactantes (g/L)					
<b>Factor</b>	<b>SS</b>	<b>Df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
(1) pH (L)	0,102	1	0,102	0,620	0,474
pH (Q)	0,341	1	0,341	2,072	0,223
(2) Temperatura (C°) (L)	0,187	1	0,187	11,135	0,0034
Temperatura (C°) (Q)	0,378	1	0,378	2,292	0,204
1L by 2L	0,028	1	0,028	0,175	0,697
Error	0,659	4	0,164		
Total, SS	1,485	9			

En la gráfica de superficie de respuesta (figura 15), las variables independientes son: pH (eje X), Temperatura (eje Y) mientras que la variable dependiente, la cual corresponde a la producción de biosurfactantes, se presenta en el eje Z. Mediante este gráfico de superficie de respuesta se determinó la producción máxima de biosurfactantes la cual fue 1,5 g/L, esta se observa en el gráfico en la zona de color rojo oscuro, mientras que la producción mínima del mismo fue -1,1 g/L, la cual se detalla en la zona verde oscura del gráfico. Para obtener esta concentración máxima

de biosurfactantes, los rangos óptimos de las variables estudiadas fueron: pH 6,5 a 6,7 y temperatura 33 a 33,5 C°. Lo descrito anteriormente se observa en detalle en el gráfico de contornos (figura 16)

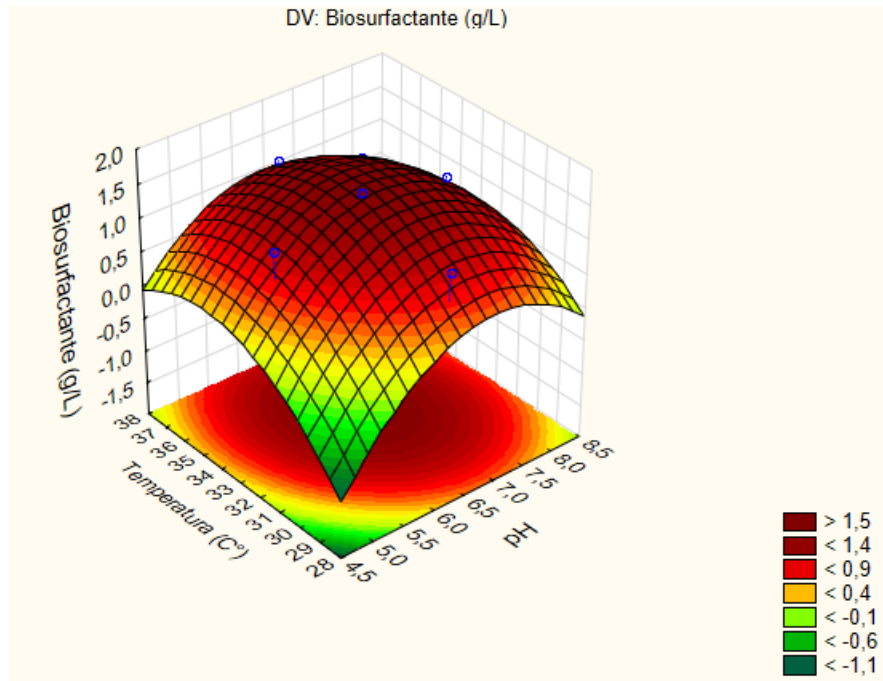


Figura 15. Gráfico de superficie de repuesta de las variables pH y Temperatura

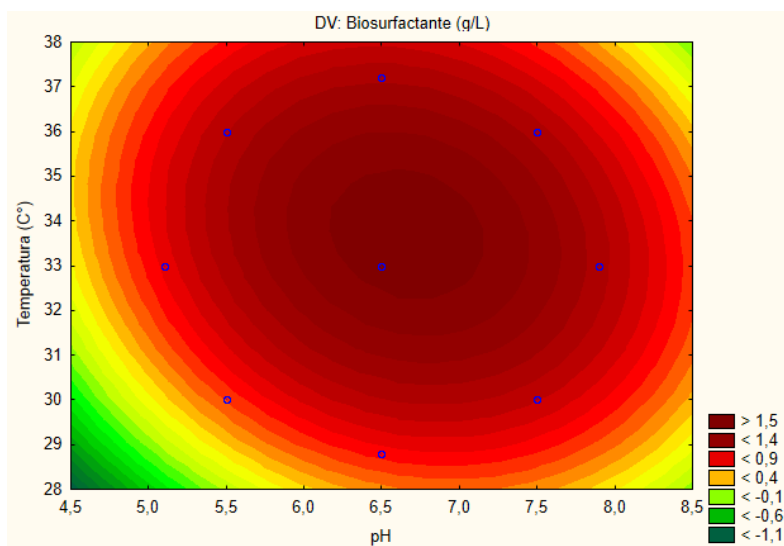


Figura 16. Gráfico de contornos correspondientes a las variables de pH y Temperatura.



Mediante una regresión multivariable se determinó una ecuación de segundo orden, la cual permite saber la influencia de las variables independientes X y Y sobre la variable dependiente Z.

Donde X corresponde al pH, Y corresponde a la agitación y Z corresponde a la producción de biosurfactantes. La Ecuación fue la siguiente:

$$Z = f + aX_1 + bY + cX^2 + dY^2 + eXY \quad (\text{Ecuación 16})$$

Los coeficientes fueron:  $a = -0,0032$ ,  $b = -0,0003$ ,  $c = -0,0098$ ,  $d = -0,0089$ ,  $e = -0,0143$ , y  $f = 0,0762$ . Se derivó la ecuación 16 en función a cada variable establecida.

Luego de la derivación se obtuvieron las siguientes ecuaciones:

$$\frac{\delta Z}{\delta X} = -0,0196X + 0,0143Y - 0,0032 \quad (\text{Ecuación 17})$$

$$\frac{\delta Z}{\delta Y} = 0,0143X - 0,0179Y + 0,0028 \quad (\text{Ecuación 18})$$

Mediante la resolución de las ecuaciones 17 y 18 se obtuvieron los valores codificados, tanto para la variable X como para la variable Y:  $X = -0,44$ ;  $Y = -0,37$ . Se descodificaron estos valores, con el fin de obtener los rangos óptimos reales de cada variable independiente con las siguientes ecuaciones:

$$X = (X \text{ Codificado} * 1) + 6,5 \quad (\text{Ecuación 19})$$

$$Y = (Y \text{ Codificado} * 3) + 33 \quad (\text{Ecuación 20})$$

Se obtuvieron valores de pH óptimo de 6,06 y Temperatura de 31,89°C. La máxima producción de biosurfactantes predicha por el modelo fue 1,652g/L. Por otro lado, la concentración de producto obtenido utilizando las variables óptimas fue 1,369 g/L.

En el diseño experimental se observó que los tratamientos que obtuvieron mayor producción de biosurfactantes fueron los tratamientos 1 y 5, que poseen pH menores a 6,5 y temperaturas entre 30 y 33 °C, mientras que los tratamientos que obtuvieron menor producción de biosurfactantes fueron los tratamientos con pH superiores a 7, este comportamiento se apega a los enunciados de León et al., (2017) que recalcan la importancia de un ambiente ácido-neutro para la producción de enzimas y proteínas extracelulares. En los resultados de este diseño experimental la temperatura y el pH tuvieron un valor similar al del segundo diseño, con una diferencia decimal mínima. El pH óptimo se estableció en 6,1, mientras que la temperatura óptima que se obtuvo en este diseño experimental fue 32 °C, dos grados menos que la obtenida en el primer diseño experimental, sin embargo, ambas temperaturas coinciden con las temperaturas óptimas de otros autores citados anteriormente. Al ser una diferencia significativa se realizó pruebas a nivel de laboratorio utilizando las dos temperaturas obtenidas.

#### 4.7.3 Test del desplazamiento del contaminante

En la tabla 13, se observa la longitud de desplazamiento del contaminante utilizando los biosurfactantes producidos en el diseño experimental. El tratamiento que obtuvo una mayor longitud de desplazamiento fue el 1, mientras que el tratamiento con menor longitud de desplazamiento fue el 8. El grupo control es la misma prueba utilizando como muestra medio de cultivo no inoculado.

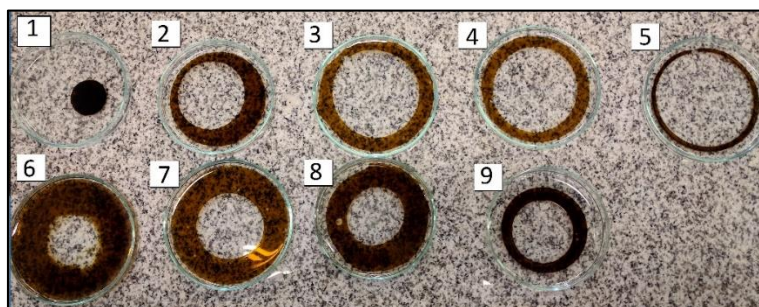
Tabla 13.

*Desplazamiento del contaminante utilizando los biosurfactantes producidos.*

Tratamiento	Control (cm)	Desplazamiento (cm)	Descripción visual
-------------	--------------	---------------------	--------------------

1	1	9,0	Formación de agregados
2	1	6,5	desplazamiento Normal
3	1	6,8	desplazamiento Normal
4	1	7,5	desplazamiento Normal
5	1	8,0	desplazamiento Normal
6	1	4,5	desplazamiento Normal
7	1	5,0	desplazamiento Normal
8	1	4,4	desplazamiento Normal
9	1	4,5	desplazamiento Normal

Se visualiza que en el tratamiento 1 hubo la formación de agregados, el mismo que obtuvo mayor longitud de dispersión, mientras que el tratamiento 5 fue el único en lograr una dispersión completa. (figura 17).



*Figura 17.* Prueba de desplazamiento del contaminante de cada tratamiento.

En la prueba de desplazamiento de contaminante los tratamientos que poseen pH superiores a 6,5 obtuvieron las menores longitudes de dispersión del contaminante, mientras que los tratamientos que obtuvieron la mayor longitud de desplazamiento fueron los tratamientos 1 y 5, lo cuales corresponden a temperaturas de 33 y 30 °C respectivamente. Esto concuerda con los enunciados de Sousa et al (2014) quienes afirman que a temperaturas mayores a 30°C, existe una estabilización de los

compuestos emulsionantes. El pH de 6,5 y 5,5 valores que corresponden a los obtenidos en la prueba de desplazamiento del anterior diseño experimental.

#### 4.8 Determinación de las condiciones óptimas de operación

Para la determinación de las condiciones de operación óptimas, se agruparon los resultados obtenidos de los 3 diseños experimentales (tabla 14). Se observó que tanto los valores de pH como de agitación son valores muy próximos y su diferencia es despreciable, por ende, se los estableció como valor óptimo de pH de 6,1; y valor óptimo de agitación 135 rpm. Sin embargo, los valores de temperatura son valores distantes, por lo cual se realizó un diseño simple con el fin de determinar que temperatura genera una producción mayor de biosurfactantes.

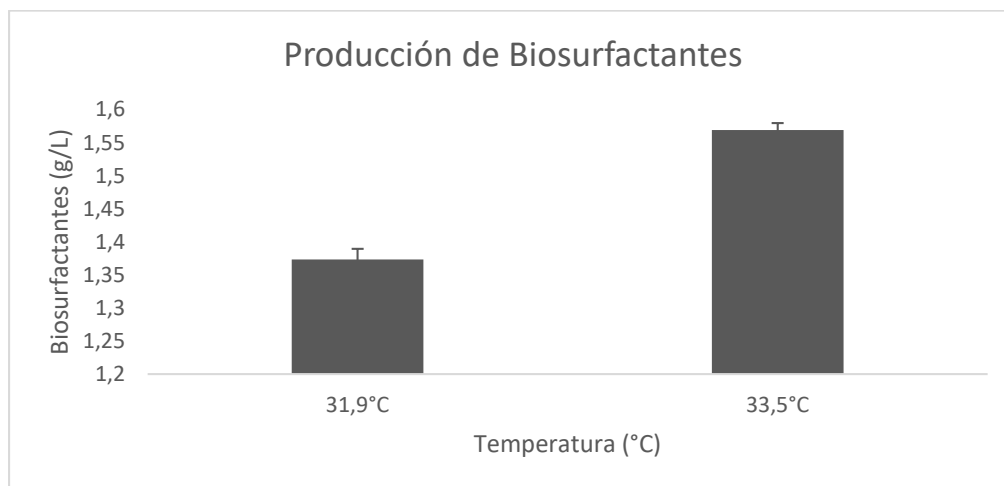
Tabla 14.

*Variables óptimas obtenidas de la regresión multivariable.*

	<b>Diseño 1</b>	<b>Diseño 2</b>	<b>Diseño 3</b>
<b>Agitación (rpm)</b>	134,74	134,90	
<b>Temperatura (C°)</b>	33,40		31,89
<b>pH</b>		6,09	6,06

Utilizando las condiciones óptimas de operación en este estudio se obtuvo una producción máxima de biosurfactantes de 1,55 g/L. En un estudio realizado por Valdospinos (2017) se optimizó únicamente las condiciones de cultivo de la misma bacteria, *Stenotrophomonas* sp., con una temperatura de 37°C y una agitación de 150 rpm, y se obtuvo una concentración máxima de biosurfactantes de 1,3 g/L. En el presente estudio, se optimizaron las condiciones de operación, con esto se logró aumentar la concentración del metabolito a 1,55 g/L, lo que indica que al optimizar las condiciones de operación se ve beneficiada la producción de este producto.

Se realizaron 2 tratamientos utilizando los valores óptimos de pH y agitación establecidos, pero variando la temperatura. Al tratamiento 1 le corresponde una temperatura de 32 C° y al tratamiento 2 una temperatura de 34 °C, como se observa en la figura 18. El tratamiento que obtuvo la mayor concentración de biosurfactantes fue el tratamiento 2, con una producción de 1,56 g/L, mientras que el tratamiento 1 obtuvo una menor producción la cual fue 1,37g/L. Con esto se establece que la temperatura óptima es 34C°.



*Figura 18.* Producción de biosurfactantes utilizando como variable a la temperatura.

Mediante la revisión bibliográfica, la temperatura óptima para la producción de biosurfactantes oscila entre los 30 a 37 °C dependiendo del microorganismo. Sin embargo, todos los autores coinciden que la temperatura óptima no debe ser menor a 30°C y no debe superar los 40°C, por lo cual se afirma que la temperatura óptima establecida en este estudio tiene concordancia con las referencias bibliográficas. (Sousa et al., 2014; Zambrano, 2012; Hernandez, 2016; Cervantez, 2014).

#### 4.9 Curva de producción de biosurfactantes a escala banco por *Stenotrophomonas* sp. utilizando las condiciones de operación optimizadas

Se determinó la concentración de biosurfactantes a lo largo del crecimiento de la bacteria *Stenotrophomonas* sp. en donde se observa que la producción máxima de biosurfactantes se da a las 39 horas con una concentración de 1,55 g/L. Se visualizó que la producción de biosurfactantes posee un comportamiento exponencial.

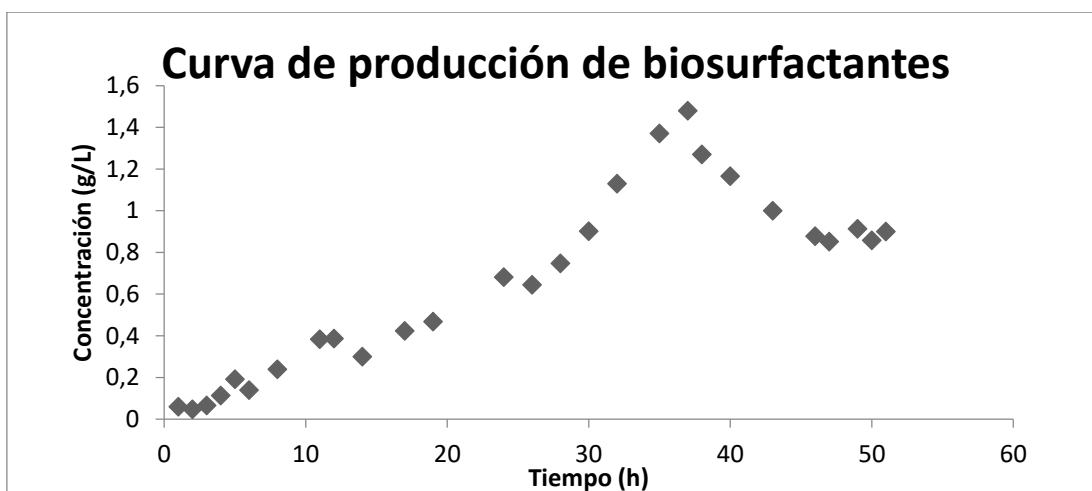


Figura 19. Curva de producción en condiciones de operación optimizadas.

Tabla 15.

Parámetros cinéticos de producción de biosurfactantes de *Stenotrophomonas* sp.

Parámetros Cinéticos	Fórmula	Escala banco
Rendimiento de producto con respecto a la biomasa	$y \frac{p}{x} = \frac{dp}{dx}$	0,980
Productividad global de		0,039 $\frac{g}{Lh}$

---

<b>biosurfactantes</b>	$\gamma_p = \frac{P_f - P_o}{T_f - T_o}$
( $\gamma_x$ )	

---

En la curva de producción de biosurfactantes (figura 19) se observó que este tiene una similitud a la curva de crecimiento (figura 5), y que la producción de biosurfactantes aumentó cuando la bacteria se encontraba en la fase estacionaria de crecimiento. La producción máxima de biosurfactantes en los tratamientos a escala de laboratorio fue 1,36 g/L, mientras que la producción máxima de biosurfactantes a escala banco fue 1,55 g/L, esto indica que la producción de este metabolito se ve favorecida cuando la bacteria se fermenta en condiciones controladas, lo que coincide con los enunciados de Sousa et al (2014) quienes afirman que al realizar una fermentación con las condiciones controladas, empleando el uso de un biorreactor, las cinéticas de crecimiento y las cinéticas de formación de producto se ven favorecidas. En cuanto al rendimiento de producción de biosurfactantes con respecto a la biomasa ( $Y_{p/x}$ ), este fue 98%, lo que indica que la producción de este metabolito está influenciada por el crecimiento de la bacteria, sin embargo, al observar las gráficas de producción de biosurfactantes (figura 19) se determinó que existió una mayor concentración de producto en la fase estacionaria de crecimiento, lo que establece a los biosurfactantes producidos con esta bacteria como metabolitos secundarios. Esto concuerda con lo enunciado por Vera-Núñez et al (2010) quienes catalogaron a estas moléculas como metabolitos secundarios, es decir, que no utilizan la energía del metabolismo celular para ser producidos (Doran, 2013).

#### **4.10 Determinación del coeficiente volumétrico de consumo de oxígeno (K<sub>la</sub>)**

La determinación del coeficiente volumétrico de consumo de oxígeno se realizó utilizando el método dinámico experimental en el cual se linealiza la concentración de oxígeno disuelto de la bacteria *Stenotrophomonas* sp (figura 20). después de el

reabastecimiento (figura 21) y el valor de la pendiente de los datos linealizados equivale al valor de la constante de consumo de oxígeno, en este caso es 0,1756.

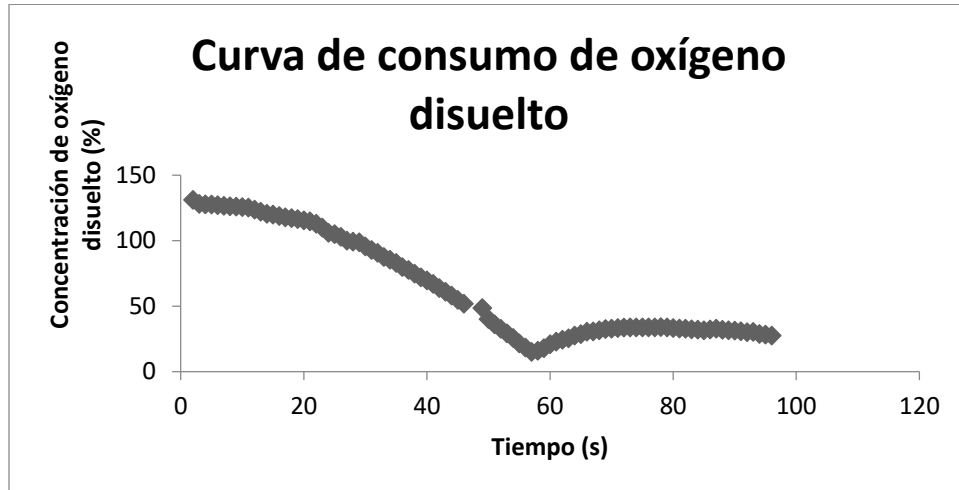


Figura 20. Curva de consumo de oxígeno de la bacteria *Stenotrophomonas* sp.

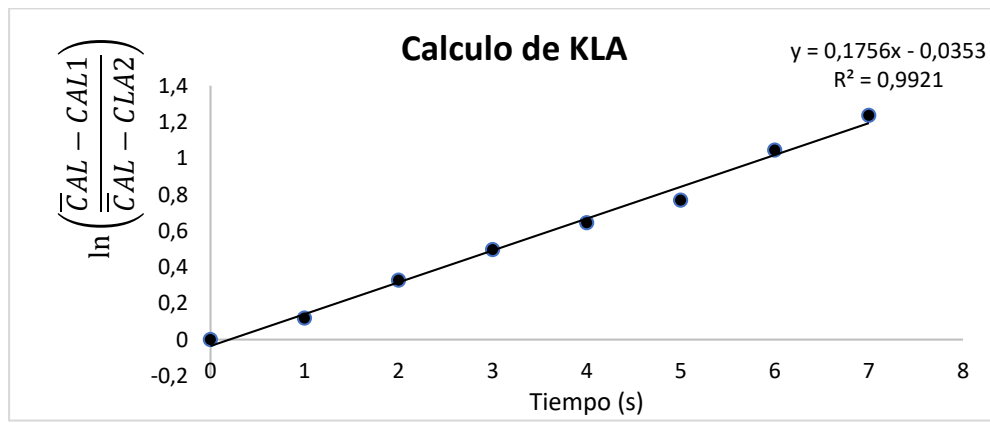


Figura 21. determinación del coeficiente volumétrico de consumo de oxígeno (KLa)

En la gráfica de consumo de oxígeno (figura 20) se detalló que después del reabastecimiento de oxígeno no existe una pendiente pronunciada como ocurre normalmente. Según Soler & Buitrago (2010) esto sucede cuando la bacteria posee una velocidad de crecimiento alta, o tiene una capacidad de adaptación eficiente,



esto último se corrobora con las curvas de crecimiento (figuras 4, 5) en donde se observa que la bacteria carece de fase lag en el crecimiento.

En cuanto al coeficiente volumétrico de consumo de oxígeno se obtuvo un valor neto de  $0,1756 \text{ h}^{-1}$ . No existen datos bibliográficos sobre este coeficiente para *Stenotrophomonas* sp., sin embargo, en una investigación realizada por Buitrago, Otálvaro, & Duarte (2013). Se obtuvieron valores de esta constante en diferentes modelos biológicos, en gran mayoría bacterias aerobias, los autores obtuvieron valores entre  $0,99 \text{ h}^{-1}$  y  $0,3 \text{ h}^{-1}$ , sin embargo, resaltan que en bacterias aerobias facultativas estos valores pueden llegar a disminuir considerablemente. Para obtener valores más específicos de este coeficiente es necesario realizar una investigación detallada sobre las variables que afectan al coeficiente volumétrico de consumo de oxígeno.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

A pH menores de 5,5 y mayores a 7,5 la producción de biosurfactantes se ve afectada negativamente, debido a la influencia que tiene el mismo en la producción de coenzimas y proteínas.

Las condiciones óptimas de operación obtenidas fueron: pH de 6,1, Temperatura de 34°C y agitación de 135 rpm. Estas fueron determinadas mediante las gráficas de superficie de respuesta.

La producción de biosurfactantes disminuye notablemente en condiciones de agitación y temperatura menores a 100 rpm y 30°C respectivamente, debido a que, en agitaciones bajas existe una acumulación de biomasa, y no existe una homogeneización correcta de los nutrientes; mientras que a temperaturas menores a 30°C el crecimiento celular se ve afectado negativamente.

Mediante la prueba de desplazamiento del contaminante se determinó que los biosurfactantes producidos por la bacteria *Stenotrophomonas* sp. tiene la capacidad de desplazar de manera significativa en petróleo, principalmente con valores de pH neutros.

A escala banco se obtuvieron valores de velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación de 0,120 h<sup>-1</sup>; 3,00 h respectivamente. Se determinó que el tiempo de duplicación de la bacteria y la velocidad específica de crecimiento se ven afectados positivamente cuando se realiza un escalado de matraz a biorreactor. Esto ocurre debido en un biorreactor se puede controlar las condiciones de cultivo y la oxigenación del medio.

La producción de biosurfactantes no está asociada al crecimiento microbiano puesto que es un metabolito secundario al ser producido en la fase estacionaria de crecimiento.

El valor del coeficiente volumétrico de consumo de oxígeno ( $K_{La}$ ) obtenido fue  $0,1756 \text{ h}^{-1}$ , lo cual indica que la bacteria no dependencia al oxígeno para tener un crecimiento óptimo.

## **5.2 Recomendaciones**

Se recomienda utilizar rangos de agitación más cercanos, con revoluciones entre 120 rpm y 140 rpm, para obtener estudios más detallados acerca de la influencia de esta condición de operación en la producción de biosurfactantes.

Se sugiere mantener temperaturas constantes en los procesos de obtención de los biosurfactantes para que no se vea afectada su capacidad tensoactiva.

Se recomienda realizar análisis de caracterización a los biosurfactantes producidos con el fin de determinar qué tipo de biotensoactivos son, y además conocer las propiedades de los mismos para futuras aplicaciones.

## REFERENCIAS

- Aronstein, B. N., & Alexander, M. (1993). *Effect of a non-ionic surfactant added to the soil surface on the biodegradation of aromatic hydrocarbons within the soil. Applied microbiology and biotechnology*, 39(3), 386–390. Recuperado el 12 de julio del 2017 de: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00192098>
- Balasubramaniam, A., & Harvey, P. J. (2014). *Scanning electron microscopic investigations of root structural modifications arising from growth in crude oil-contaminated sand. Environmental Science and Pollution Research*, 21(22), 12651-12661. Recuperado el 17 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3138-7>
- Bastida, F., Jehmlich, N., Lima, K., Morris, B. E. L., Richnow, H. H., Hernández, T., ... García, C. (2016). *The ecological and physiological responses of the microbial community from a semiarid soil to hydrocarbon contamination and its bioremediation using compost amendment. Journal of Proteomics*, 135, 162-169. Recuperado el 17 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.07.023>
- Bedoya Pérez, J. C., & Hoyos Sánchez, R. A. (2010). Agitation-aeration relation effects on cell culture of *Azadirachta indica* and Juss neem on azadirachtin production in a stirred tank bioreactor. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 63(1), 5293–5305. Recuperado el 10 de noviembre del 2017 de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v63n1/a08v63n01.pdf>
- Buitrago, G., Otálvaro, Á. M., & Duarte, P. G. (2013). Evaluación de la transferencia de oxígeno en un biorreactor convencional con aireador externo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2). Recuperado el 23 de agosto del 2017 de: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.41272>

- Burgos, C. (2012). Biotensoactivos producidos por *Sphingobacterium detergens* sp, producción caracterización y propiedades. Universidad de Barcelona. Recuperado el 18 de noviembre del 2017 de: [http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/42438/3/CBD\\_TESIS.pdf](http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/42438/3/CBD_TESIS.pdf)
- Campos, J. M., Montenegro Stamford, T. L., Sarubbo, L. A., de Luna, J. M., Rufino, R. D., & Banat, I. M. (2013). *Microbial biosurfactants as additives for food industries. Biotechnology Progress*, 29(5), 1097-1108. Recuperado el 19 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1002/btpr.1796>
- Casalta, E., Aguera, E., Picou, C., Rodriguez-Bencomo, J.-J., Salmon, J.-M., & Sablayrolles, J.-M. (2010). *A comparison of laboratory and pilot-scale fermentations in winemaking conditions. Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(5), 1665-1673. Recuperado el 12 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2652-x>
- Cervantez, M. (2014). Caracterización molecular y evaluación de la capacidad degradativa de la atrazina por bacterias aisladas de suelos. Lima Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Recuperado el 28 de mayo del 2017 de: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4019/Cervantes\\_sw.pdf?sequence=3](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4019/Cervantes_sw.pdf?sequence=3)
- Cheng, F. (2013). *Characterization of a Blend-Biosurfactant of Glycolipid and Lipopeptide Produced by Bacillus subtilis TU2 Isolated from Underground Oil-Extraction Wastewater. Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(3), 390-396. Recuperado el 17 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.4014/jmb.1207.09020>
- Chu, W. (2003). *Remediation of contaminated soils by surfactant-aided soil washing. Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, 7(1), 19–24. Recuperado el 12 de diciembre del 2017 de: [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)1090-025X\(2003\)7:1\(19\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)1090-025X(2003)7:1(19))

- Colla, L. M., Rizzardi, J., Pinto, M. H., Reinehr, C. O., Bertolin, T. E., & Costa, J. A. V. (2010). *Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses*. *Bioresource Technology*, 101(21), 8308-8314. Recuperado el 19 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.086>
- Collins, L. M., Dziak, J. J., & Li, R. (2009). *Design of experiments with multiple independent variables: A resource management perspective on complete and reduced factorial designs*. *Psychological Methods*, 14(3), 202-224. Recuperado el 17 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1037/a0015826>
- Doran, P. (2013). *Bioprocess Engineering Principles* (Segunda). Academic Press.
- Dzionic, A., Wojcieszńska, D., & Guzik, U. (2016). *Natural carriers in bioremediation: A review*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 23, 28–36. Recuperado el 18 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.07.003>
- Elliot, R., Singhal, N., & Swift, S. (2010). *Surfactants and Bacterial Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Contaminated Soil—Unlocking the Targets*. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41(1), 78-124. Recuperado el 19 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1080/00102200802641798>
- Elmer, K., & Stephen, A. (2008). *Diagnostico Microbiologico* (6ta ed.). España: Médica Panamericana. Recuperado el 20 de junio del 2017 de: [https://books.google.com.ec/books/about/Koneman\\_Diagnostico\\_Microbiologico\\_Micro.html?hl=es&id=jyVQueKro88C&redir\\_esc=y](https://books.google.com.ec/books/about/Koneman_Diagnostico_Microbiologico_Micro.html?hl=es&id=jyVQueKro88C&redir_esc=y)
- Giraldo Zambrano, J. D. (2012). *Producción de ramnolípidos por Pseudomonas aeruginosa Pb 25: evaluación de su actividad emulsificante y de remoción de metales pesados*. Recuperado el 28 de noviembre del 2017 de: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1413>

- Han, Y., Wen, Q., Chen, Z., & Li, P. (2011). *Review of Methods Used for Microalgal Lipid-Content Analysis*. *Energy Procedia*, 12, 944-950. Recuperado el 17 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2011.10.124>
- Hemlata, B., Selvin, J., & Tukaram, K. (2015a). *Optimization of iron chelating biosurfactant production by Stenotrophomonas maltophilia NBS-11*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(2), 135-143. Recuperado el 1 de diciembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.02.002>
- Hemlata, B., Selvin, J., & Tukaram, K. (2015b). *Optimization of iron chelating biosurfactant production by Stenotrophomonas maltophilia NBS-11*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(2), 135-143. Recuperado el 1 de diciembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.02.002>
- Hernandez, N. (2016). Establecimiento de un proceso de biorremediación usando *Stenotrophomonas maltophilia*. Universidad Veracruzana. Recuperado el 24 de mayo del 2017 de: <https://www.uv.mx/pozarica/mca/files/2012/10/Hernandez-Castellanos.pdf>
- Kaskatepe, B., Yildiz, S., Gumustas, M., & Ozkan, S. A. (2015). *Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosain kefir and fish meal*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3), 855-859. Recuperado el 17 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140727>
- Lang, S., & Wullbrandt, D. (1999). *Rhamnose lipids–biosynthesis, microbial production and application potential*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(1), 22–32. Recuperado el 11 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1007/s002530051358>
- Leon-Revelo, G., Cujilema-Quitio, M. C., Baryolo González, L., Rosero Delgado, E., Córdova, J., & Ramos-Sánchez, L. B. (2017). Efecto del ph en la producción de celulasas de *Aspergillus nigger* en fermentación sólida.

*Centro Azúcar*, 44(2), 27–38. Recuperado el 7 de diciembre del 2017 de: <http://scielo.sld.cu/pdf/caz/v44n2/caz04217.pdf>

Lim, M. W., Lau, E. V., & Poh, P. E. (2016). *A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil — Present works and future directions*. *Marine Pollution Bulletin*, 109(1), 14-45. Recuperado el 19 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.023>

Makkar, R. S., Cameotra, S. S., & Banat, I. M. (2011). *Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production*. *AMB express*, 1(1), 5. Recuperado el 7 de julio del 2017 de: <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-5>

Martínez, C. A. G., García, E. R., & Jiménez, F. C. (2007). *Stenotrophomona maltophilia*, una bacteria multirresistente. *Rev Asoc Mex Med Crit y Ter Int*, 21(2), 91–94. Recuperado el 9 de diciembre del 2017 de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medcri/ti-2007/ti072f.pdf>

Mena-Giraldo, P., Pérez-Buitrago, S., Pinal, R., & Hoyos, L. (2016). Síntesis de N-succinil-quitosano y formación de nanomicelas para transporte de fármacos hidrófobos. *Revista Investigaciones Aplicadas*, 9(2), 125–131. Recuperado el 20 de agosto del 2017 de: <http://dx.doi.org/10.18566/ria.v09n02.a07>

Montagnolli, R. N., Lopes, P. R. M., & Bidoia, E. D. (2015). *Assessing Bacillus subtilis biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(1). Recuperado el 20 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1007/s10661-014-4116-8>

Montoya, M., & Loredó, A. (2012). Modelo físico de la reducción de aceite remanente por desplazamiento con surfactantes. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado el 2 de agosto del 2017 de <http://www.ptolomeo.unam.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/132.248.52.100/2223/Tesis.pdf?sequence=1>



- Moussa, T. A. A., Mohamed, M. S., & Samak, N. (2014). *Production and characterization of di-rhamnolipid produced by Pseudomonas aeruginosa TMN. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 31(4), 867-880.* Recuperado el 23 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20140314s00002473>
- Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2006). *Towards commercial production of microbial surfactants. Trends in Biotechnology, 24(11), 509-515.* Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.09.005>
- Mulligan, C. N. (2005). *Environmental applications for biosurfactants. Environmental Pollution, 133(2), 183-198.* Recuperado el 17 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>
- Palleroni, N. J., & Bradbury, J. F. (1993). *Stenotrophomonas, a new bacterial genus for Xanthomonas maltophilia (Hugh 1980) Swings et al. 1983. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 43(3), 606-609.* Recuperado el 1 de diciembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1099/00207713-43-3-606>
- Patil, S. N., Aglave, B. A., Pethkar, A. V., & Gaikwad, V. B. (2012). *Stenotrophomonas koreensis a novel biosurfactant producer for abatement of heavy metals from the environment. African Journal of Microbiology Research, 6(24), 5173-5178.* Recuperado el 11 de junio del 2017 de: <http://pubs.sciepub.com/ijebb/5/2/5/index.html>
- Peng, M., Zi, X., & Wang, Q. (2015). *Bacterial Community Diversity of Oil-Contaminated Soils Assessed by High Throughput Sequencing of 16S rRNA Genes. International Journal of Environmental Research and Public Health, 12(10), 12002-12015.* Recuperado el 26 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.3390/ijerph121012002>

- Perfumo, A., Banat, I. M., Canganella, F., & Marchant, R. (2006). *Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading Pseudomonas aeruginosa AP02-1*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(1), 132-138. Recuperado el 24 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0234-0>
- Plohl, K., Leskovsek, H., & Bricelj, M. (2002). *Biological degradation of motor oil in water*. *Acta Chimica Slovenica*, 49(2), 279–290. Recuperado el 24 de noviembre del 2017 de: <http://pubs.sciepub.com/ijebb/5/2/5/index.html>
- Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A. D. S., ... Hinton, J. C. D. (2012). *Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation*. *Journal of Bacteriology*, 194(3), 686-701. Recuperado el 23 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1128/JB.06112-11>
- Romero, S. E. G., & others. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *Nova*, 6(9). Recuperado el 25 de noviembre del 2017 de: <http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/108>
- Rondón-Barragán, I. S., Ramírez-Duarte, W. F., & Eslava-Mocha, P. R. (2007). Evaluación de los efectos tóxicos y concentración letal 50 del surfactante Cosmoflux® 411F sobre juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Recuperado 30 de mayo de 2017 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=295023020003>
- Scow, K., & Jhonson, C. (1996). *Effect of Sorption on Biodegradation of Soil Pollutants*. Elsevier. Recuperado 3 de julio de 2017 de [https://books.google.com.ec/books?id=-6zaOYfUKEUC&dq=Scow,+K.,+%26+Jhonson,+C.+\(1996\).+Effect+of+Sorption+on+Biodegradation+of+Soil+Pollutants.+Elsevier.&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.ec/books?id=-6zaOYfUKEUC&dq=Scow,+K.,+%26+Jhonson,+C.+(1996).+Effect+of+Sorption+on+Biodegradation+of+Soil+Pollutants.+Elsevier.&source=gbs_navlinks_s)

- Shen, W., Zhu, N., Cui, J., Wang, H., Dang, Z., Wu, P., ... Shi, C. (2016). *Ecotoxicity monitoring and bioindicator screening of oil-contaminated soil during bioremediation. Ecotoxicology and Environmental Safety, 124*, 120-128. Recuperado el 23 de octubre del 2017 de: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.10.005>
- Silva, R., Almeida, D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., & Sarubbo, L. (2014). *Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills. International Journal of Molecular Sciences, 15(7)*, 12523-12542. Recuperado el 27 de octubre del 2017 de: <https://doi.org/10.3390/ijms150712523>
- Singh, A., Kumar, K., Pandey, A. K., Sharma, A., Singh, S. B., Kumar, K., ... Nain, L. (2015). *Pyrene Degradation by Biosurfactant Producing Bacterium Stenotrophomonas maltophilia. Agricultural Research, 4(1)*, 42-47. Recuperado el 18 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1007/s40003-014-0144-4>
- Soler, A., & Buitrago, G. (2010). Evaluación de la transferencia de oxígeno en cultivos con lactococcus lactis empleando un sistema de fermentación con aireación externa. Universidad Nacional de Colombia. Recuperado el 8 de diciembre del 2017 de: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/18554/38207>
- Sousa, M., Dantas, I. T., Feitosa, F. X., Alencar, A. E. V., Soares, S. A., Melo, V. M. M., ... Sant'ana, H. B. (2014). *Performance of a biosurfactant produced by Bacillus subtilis LAMI005 on the formation of oil / biosurfactant / water emulsion: study of the phase behaviour of emulsified systems. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 31(3)*, 613-623. Recuperado el 23 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20140313s00002766>

- Supaphol, S., Jenkins, S. N., Intomo, P., Waite, I. S., & O'Donnell, A. G. (2011). *Microbial community dynamics in mesophilic anaerobic co-digestion of mixed waste*. *Bioresource Technology*, 102(5), 4021-4027. Recuperado el 28 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.124>
- Sutton, N. B., Grotenhuis, T., & Rijnaarts, H. H. M. (2014). *Impact of organic carbon and nutrients mobilized during chemical oxidation on subsequent bioremediation of a diesel-contaminated soil*. *Chemosphere*, 97, 64-70. Recuperado el 17 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.005>
- Szulc, A., Ambrożewicz, D., Sydow, M., Ławniczak, Ł., Piotrowska-Cyplik, A., Marecik, R., & Chrzanowski, Ł. (2014). *The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies*. *Journal of Environmental Management*, 132, 121-128. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.11.006>
- Valdospinos, D. (2017). Optimización de las condiciones de cultivo de una bacteria del género *Stenotrophomonas* para la producción de biosurfactantes. Universidad de Las Americas. Recuperado el 12 de noviembre del 2017 de: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/7900/6/UDLA-EC-TIB-2017-29.pdf>
- Vera-Núñez, J. A., Grageda-Cabrera, O. A., Altamirano Hernández, J., & Peña-Cabriales, J. J. (2010). Efecto de los surfactantes sobre la absorción de agroquímicos en plantas. *Nova scientia*, 2(3), 14–36. Recuperado el 2 de noviembre del 2017 de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/ns/v2n3/v2n3a3.pdf>
- Victoria, Vallejo, Laura, Salgado, & Fabio, Roldan. (2005). Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7, 86-87.

Recuperado el 1 de agosto del 2017 de:  
<http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote>

Winters, R., Winters, A., & Amedee, R. G. (2010). Statistics: a brief overview. *The Ochsner Journal*, 10(3), 213–216. Recuperado el 22 de noviembre del 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3096219/pdf/i1524-5012-10-3-213.pdf>

Xia, W., Du, Z., Cui, Q., Dong, H., Wang, F., He, P., & Tang, Y. (2014). *Biosurfactant produced by novel Pseudomonas sp. WJ6 with biodegradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons*. *Journal of Hazardous Materials*, 276, 489-498. Recuperado el 17 de diciembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.062>

Yañez-Ocampo, G., Somoza-Coutiño, G., Blanco-González, C., & Wong-Villarreal, A. (2017). *Utilization of agroindustrial waste for biosurfactant production by native bacteria from chiapas*. *Open Agriculture*, 2(1). Recuperado el 17 de agosto del 2017 de: <https://doi.org/10.1515/opag-2017-0038>

Zheng, H., Singh, N., Shetye, G. S., Jin, Y., Li, D., & Luk, Y.-Y. (2017). *Synthetic analogs of rhamnolipids modulate structured biofilms formed by rhamnolipid-nonproducing mutant of Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(6), 1830-1838. Recuperado el 17 de noviembre del 2017 de: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.01.042>

Zissi, U. S., & Lyberatos, G. C. (1999). *Kinetics of growth and aniline degradation by Stenotrophomonas maltophilia*. *Water environment research*, 71(1), 43–49. Recuperado el 6 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.2175/106143099X121553>

