



FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE UNA
BACTERIA DEL GÉNERO *Stenotrophomonas* PARA LA PRODUCCIÓN
DE BIOSURFACTANTES



AUTOR

Diego Andrés Valdospinos Benalcázar

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE UNA BACTERIA
DEL GÉNERO *Stenotrophomonas* PARA LA PRODUCCIÓN DE
BIOSURFACTANTES

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

Profesor Guía

Ph.D. Vivian Morera Córdova

Autor

Diego Andrés Valdospinos Benalcázar

Año

2017

DECLARACIÓN DEL DOCENTE GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, 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”.

Vívian Morera Córdova
Doctora en ciencias biológicas
CC: 1756346811

DECLARACIÓN DEL DOCENTE CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

María Alejandra Cruz Salazar
Master en Ingeniería en Bioprocesos y Biotecnología
CC: 171992857-2

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.

Diego Andrés Valdospinos Benalcázar

CC: 172556446-0

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres y mi hermano, que en todo momento han estado presentes brindándome su apoyo y amor.

A Edgar Velasteguí por ser un excelente amigo y brindarme la confianza para el desarrollo de este proyecto.

A Vívian Morera por guiarme en el desarrollo de este proyecto y brindarme su ayuda permanente.

A mis amigos que a lo largo de la carrera han estado siempre en buenos y malos momentos.

DEDICATORIA

Con todo amor a ustedes que a lo largo de mi vida han estado siempre apoyándome para salir adelante, que me han inculcado valores desde pequeño para poder ser mejor persona y mejor hijo, que me han enseñado que todo esfuerzo tiene su recompensa. A mi abuelita que desde el cielo me cuida, protege y me da fuerzas para seguir adelante.

Este trabajo va dedicado a ustedes

Mamá, Papá y hermano.

RESUMEN

Los biosurfactantes son moléculas con propiedades anfifílicas, producidas por plantas y microorganismos. Son moléculas complejas con actividad tensoactiva que reducen la tensión superficial del agua. Se emplean en procesos industriales especializados, en la remediación de ecosistemas contaminados por sustancias recalcitrantes ya que mejoran la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos y facilitan la separación mecánica de los compuestos indeseados en cuerpos de agua contaminados. Actualmente, la producción de surfactantes sintéticos y su aplicación en ambientes contaminados presentan un alto grado de contaminación, debido a que son bioacumulables y de estructura compleja por lo que su descomposición por acción microbiana es deficiente. De ahí la importancia de diseñar un medio de cultivo mediante técnicas biotecnológicas maximice la producción de los biosurfactantes. En este trabajo se realizó el análisis de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno para determinar cuál fue la mejor, con la finalidad de seleccionar una fuente viable para la producción de biosurfactantes. Como resultado el aceite de soya y la peptona fueron las fuentes de carbono y nitrógeno más viables para la producción. Además, se aplicó un diseño experimental Plackett-Burman para identificar las variables más influyentes en la producción de biosurfactantes. El aceite de soya, el sulfato de magnesio y el cloruro de sodio son las variables estadísticamente significativas. Se realizaron tres diseños centrales compuestos y se obtuvieron los valores de concentración óptima de cada variable dando como resultado 2,5 % de aceite de soya, 0,78 g/L de sulfato de magnesio y 0,055 g/L de cloruro de sodio. De acuerdo al modelo matemático la producción teórica de biosurfactantes fue de 1,22 g/L y se obtuvo una producción real de 1,44 g/L. Se demostró que las condiciones de cultivo son esenciales para la producción de los biosurfactantes y que se requiere una optimización del medio de cultivo para la obtención de las concentraciones óptimas de las variables significativas en este estudio, para maximizar la producción de los biosurfactantes.

ABSTRACT

Biosurfactants are molecules with amphiphilic properties, produced by plants and microorganisms. They are complex molecules with surfactant activity that reduce the superficial tension of water. They are used in specialized industrial processes in order to repair ecosystems contaminated by recalcitrant substances since they improve the solubility of the hydrophobic compounds and facilitate the mechanical separation of the unwanted compounds in contaminated water bodies. Currently, the production of synthetic surfactants and their application in contaminated environments produce a high degree of contamination, because they are bioaccumulative and complex in structure. Therefore, its decomposition by microbial action is deficient. Hence the importance of designing a way of cultivating by biotechnology techniques that maximizes the production of biosurfactants. An analysis of different carbon and nitrogen sources was carried out to determine which was the best, with the purpose of select a viable source for biosurfactant production. As a result, soybean oil and peptone were the best. In addition, an experimental Plackett-Burman design was used to identify the most influential variables in the production of biosurfactants. Soybean oil, magnesium sulfate and sodium chloride are the statistically significant variables. Surface response designs were performed and the optimum concentrations of each variable were obtained, resulting in 2.5% of Soybean oil, 0.78 g/L magnesium sulfate and 0.055 g/L sodium chloride. According to the mathematical model the theoretical production of Biosurfactant was 1.22 g/L and a real production of 1.44g/L was obtained. It was demonstrated that the cultivation conditions are important for the production and that an optimization of the way used to cultivate is required to obtain the optimum concentrations of each of the significant variables in this study.

ÍNDICE

1	Introducción.....	1
1.1	Antecedentes.....	1
1.2	Planteamiento del problema	3
1.3	Justificación del problema	4
1.4	Objetivos.....	5
1.4.1	Objetivo General:.....	5
1.4.2	Objetivos específicos:.....	5
2	Marco Teórico	6
2.1	Contaminación ambiental	6
2.2	Métodos físicos-químicos, térmicos y biológicos de remediación	7
2.2.1	Métodos físico-químicos	8
2.2.2	Métodos térmicos de remediación	10
2.2.3	Métodos biológicos de remediación.....	12
2.3	Biosurfactantes	14
2.3.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	18
2.3.2	Sustratos para la producción de biosurfactantes	20
2.3.3	Tipos de Biosurfactantes	21
2.3.4	Aplicaciones.....	26
3	Diseño del plan experimental	28
3.1	Diseños experimentales.....	28
3.2	Procedimientos	31
3.2.1	Muestra.....	31
3.2.2	Materiales y métodos para la obtención de los datos	31
3.2.3	Evaluación estadística de los resultados	35
4	Resultados y Discusión	35
4.1	Confirmación del género <i>Stenotrophomonas</i>	35
4.2	Selección de la mejor fuente de carbono	41
4.3	Selección de la mejor fuente de nitrógeno	47

4.4	Cultivo de <i>Stenotrophomonas</i> y elaboración de la curva de calibrado.....	54
4.5	Determinación de las variables influyentes en la producción de Biosurfactantes para la bacteria del género <i>Stenotrophomonas</i>	57
4.6	Diseños centrales compuestos	61
4.7	Optimización del medio de cultivo a escala de matraz.....	76
4.8	Obtención de rendimiento de los Biosurfactantes en relación a la biomasa.....	77
5	Conclusiones y Recomendaciones.....	81
5.1	Conclusiones	81
5.2	Recomendaciones.....	82
	REFERENCIAS	83
	ANEXOS.....	94

1 Introducción

1.1 Antecedentes

Uno de los principales problemas de contaminación ambiental hoy en día se debe a la presencia de los compuestos recalcitrantes y derrames accidentales de las industrias petroleras. Los compuestos derivados del petróleo son tóxicos para la mayoría de seres vivos y requieren de agentes externos para su eliminación total del ecosistema (Calvo & Fernández, 2016, pp. 1-2). Para la remoción de hidrocarburos se emplean técnicas físicas, químicas y térmicas. Uno de los principales problemas de estas técnicas es el alto costo del proceso. Una alternativa para solucionar este problema es la biorremediación (Patel et al., 2015, pp. 1268-1278).

La biorremediación es un proceso que emplea las propiedades catalíticas de los microorganismos para transformar y degradar los contaminantes en el medio ambiente (Souza, Vessoni-Penna, & de Souza Oliveira, 2014, pp. 88-94). Sin embargo, cuando los contaminantes son recalcitrantes no son biodisponibles para el microorganismo y por ende se requiere de agentes que ayuden a mejorar la biodisponibilidad del contaminante para su posterior degradación. El empleo de surfactantes sintéticos es una de las opciones para incrementar la biodisponibilidad (Mao, Jiang, Xiao & Yu, 2015, pp. 419-435).

Los surfactantes son sustancias compuestas de una parte hidrofílica (polar) y una parte hidrofóbica (no polar). Estas moléculas tienen la capacidad de reducir la tensión superficial entre líquidos, sólidos y gases permitiendo una mejor solubilidad del contaminante en el agua (Freitas de Oliveira et al., 2013, pp. 34-43). Las principales ventajas del uso de surfactantes sintéticos para la remediación de hidrocarburos en la industria petrolera son: el aumento de la biodisponibilidad, el mejoramiento de la degradación del contaminante y la fácil

obtención de los permisos necesarios para su uso (De, Malik, Ghosh, Saha & Saha, 2015, pp. 65757-65767).

Los surfactantes tradicionalmente han sido obtenidos de forma sintética. Sin embargo, la alta demanda en el mercado de esta molécula ha generado la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías que puedan sustituir procesos de producción. Una opción es la producción de biosurfactantes a partir de bacterias, levaduras y hongos (Aparna, Srinikethan, & Hedge, 2011, pp. 116-125), debido a su gran campo de producción los biosurfactantes son empleados en diversos sectores de la industria como la petrolera, alimenticia, cosmética y farmacéutica (Anandaraj & Thivakaran, 2010, pp. 120-126).

Los microorganismos empleados para la producción de Biosurfactantes son muy diversos, los géneros más estudiados son *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Candida* (Accorsini, Mutton, Lemos, & Benincasa, 2012, pp. 116-125). Sin embargo, uno de los microorganismos hoy en día catalogado como productor de Biosurfactantes es la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia*, bacteria Gram negativa, aeróbica, tolerante a temperaturas entre 20-37°C y resistente a rangos extremos de pH (4-9) (Hemlata, Selvin, & Tukaram, 2015, pp. 135-143).

La producción de biosurfactantes empleando sistemas biológicos involucra varios pasos que incluyen el diseño del medio de cultivo, el escalado del cultivo en Biorreactor, la masificación de la bacteria y la purificación del biosurfactante. *Stenotrophomonas maltophilia* ha sido empleada para la remoción de metales pesados por medio de la producción de biosurfactantes (Patil, Aglave, Pethkar, & Gaikwad, 2012, pp. 5173-5178). En estudios recientes, se ha evaluado la influencia de algunos componentes del medio de cultivo para la producción de biosurfactantes a partir de *Stenotrophomonas maltophilia*. Se ha determinado que el magnesio, el zinc, el pH y la fuente de carbono (dextrosa) son los componentes más significativos e influyentes para que la bacteria produzca el

biosurfactante (Hemlata et al., 2015, pp. 135-143). Se conoce además que la bacteria tiene la capacidad de metabolizar sustratos de difícil asimilación como el glicerol y aceites residuales lo que le confiere valor adicional al empleo de esta bacteria al momento de utilizar sustratos como el aceite de soya (Hazra et al., 2011, pp. 185-198).

Los productos derivados de la industria vegetal, han sido muy empleados como fuente de carbono en la producción de biosurfactantes, entre ellos se destacan el aceite de soya, la canola, el maíz, el coco, la palma, la melaza y la oliva (Makkar, Cameotra, & Banat, 2011, pp. 5-6).

La biotecnología nos permite emplear diversos organismos vivos como plantas, animales y microorganismos potenciales para la producción de biosurfactantes. Los microorganismos son los más empleados para la producción de biosurfactantes. La optimización del medio de cultivo de la bacteria del género *Stenotrophomonas* es de gran importancia para poder reducir recursos, para maximizar la producción de biosurfactantes y estudiar la influencia de los componentes del medio de cultivo y su concentración. Se puede elucidar el efecto de cada uno de estos componentes en la producción de biosurfactantes a partir del género *Stenotrophomonas*.

1.2 Planteamiento del problema

La contaminación del suelo por hidrocarburos derivados del petróleo, afecta a plantas, animales y a los seres humanos. Este problema es muy frecuente en países ricos en petróleo donde los derrames son comunes. Las empresas que extraen petróleo son las encargadas de remediar estos ambientes por diversas tecnologías.

El uso de surfactantes sintéticos para la remediación de ecosistemas contaminados con hidrocarburos es una alternativa eficiente y menos costosa que las técnicas convencionales. Este tipo de tecnología es muy empleada por diversas industrias petroleras que requieren de agentes externos para remediar ambientes contaminados. Sin embargo, los surfactantes sintéticos presentan algunas desventajas, una de ellas es su toxicidad que llega a ser mayor que la de los compuestos contaminantes originales. La toxicidad tiene un efecto negativo inhibiendo el proceso de biorremediación. La degradación del surfactante sintético es otro de los problemas que se origina en el sitio contaminado ya que este disminuye la capacidad de degradación del contaminante. La biodisponibilidad del contaminante en cuestión se ve afectada debido a la toxicidad y la poca solubilidad del surfactante sintético. Una alternativa a esto es el uso de biosurfactantes, los cuales tienen la capacidad de biodegradarse por completo en ambientes contaminados con hidrocarburos. En la actualidad la producción de surfactantes sintéticos es de 17 millones de toneladas métricas a nivel mundial, sin embargo no existen biosurfactantes que se produzcan y se comercialicen en el Ecuador.

1.3 Justificación del problema

El uso de biosurfactantes como alternativa de los surfactantes sintéticos, nos ofrece algunas ventajas: el aumento de la biodegradabilidad de la molécula lo que garantiza que no se produzca inhibición del proceso de biorremediación. Por otra parte, los biosurfactantes no son tóxicos, y representan una solución amigable con el medio ambiente y ayudan a un mejor proceso de degradación del contaminante debido a que aumentan la biodisponibilidad y la solubilidad de este.

Mediante la optimización del medio de cultivo se puede determinar que fuentes de carbono y nitrógeno son las óptimas para la producción de los biosurfactantes. De igual manera determinar los respectivos rendimientos de

producción ayudan a determinar si el proceso de producción de biosurfactantes es viable económicamente.

El uso de una bacteria del género *Stenotrophomonas*, es importante ya que es considerada una bacteria nueva en torno a la producción de biosurfactantes. El uso de esta bacteria conjuntamente con fuentes de carbono de origen vegetal hace que su crecimiento sea óptimo y la que la producción de biosurfactantes aumente. Este microorganismo fue obtenido de zonas con alta influencia oleosa, y el aceite de soya es uno de los sustratos que para ser utilizado como fuente de carbono necesita ser metabolizado por el microorganismo.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General:

Optimizar las condiciones de cultivo para la producción del Biosurfactante empleando *Stenotrophomonas* mediante un diseño de superficie de respuesta.

1.4.2 Objetivos específicos:

- Determinar las condiciones óptimas de cultivo para la producción del Biosurfactante mediante un diseño factorial Plackett-Burman.
- Obtener Biosurfactantes a partir de una bacteria del género *Stenotrophomonas*.
- Determinar el rendimiento de los Biosurfactantes en función del crecimiento de *Stenotrophomonas*.

2 Marco Teórico

2.1 Contaminación ambiental

La contaminación ambiental, específicamente en suelo y agua, se ha incrementado con el pasar de los años, esto a causa de la explotación y refinación del petróleo y sus derivados. La refinación del petróleo consiste en el fraccionamiento del petróleo crudo en diferentes grupos de hidrocarburos y estos se convierten posteriormente en productos más utilizables mediante un proceso denominado cracking, por ejemplo, la gasolina siendo este el derivado del petróleo más importante. El petróleo al ser un contaminante recalcitrante requiere de tecnologías costosas para su eliminación. El petróleo crudo es una mezcla de hidrocarburos, compuestos principalmente por carbono e hidrógeno, además está conformado por moléculas de oxígeno, sulfuros, pequeñas cantidades de nitrógeno y algunos metales (Ware, 2005, pp. 2-3 & Becerra, 2013, pp. 102-120).

La mayoría de daños en los ecosistemas se deben a derrames accidentales de petróleo. Se ha estimado que el volumen de derrames de petróleo es de 1.5 toneladas por año en países como México y Colombia. En Ecuador ocurren derrames petroleros semanales siendo un problema para la diversidad biológica de la Amazonía. Estos países son considerados como zonas biológicamente activas debido a la gran cantidad de petróleo en sus franjas amazónicas (Castellanos, Isaza, & Torres, 2016, pp. 11-17).

Los compuestos recalcitrantes son aquellos que por su composición compleja no pueden ser eliminados de forma natural del ambiente y por ende son persistentes en el medio ambiente requiriendo un tratamiento externo para su eliminación parcial o total del ecosistema (Ware, 2005, pp. 2-3 & Becerra, 2013, pp. 102-120).

El petróleo tiene una composición variada y compleja por ende los compuestos presentes en un ambiente contaminado son de diversas características en donde se pueden encontrar compuestos alifáticos y compuestos policíclicos. Los compuestos alifáticos (alcanos, alquenos y alquinos) presentes en un ambiente contaminado con productos derivados del petróleo se eliminan con facilidad por medio de volatilización y solubilización. Estos son mecanismos de carácter abiótico que actúan de forma inicial para la remoción de compuestos polares y de bajo peso molecular. Este proceso de remediación inicial consiste en degradar estos compuestos en presencia de oxígeno por medio de bacterias propias del sitio contaminado (Ware, 2005, pp. 1-4 & McKenna, 2013, pp. 1246–1256).

Los compuestos policíclicos son los de mayor importancia y preocupación al momento de remediar un ambiente contaminado con hidrocarburos debido a que estos compuestos tienen una solubilidad menor a la del agua, tienen mayor peso molecular y una menor densidad, por lo tanto, permanecen en la superficie del ambiente contaminado causando un gran impacto tóxico para los seres vivos. Los hidrocarburos que se encuentran persistentes en ambientes contaminados son el benceno, tolueno, etilbenceno y xileno, los poliaromáticos como el naftaleno, fenantreno, antraceno y fluoreno (Słomińska, Konieczka, & Namieśnik, 2014, pp. 455-472).

Existen varios métodos de eliminación de estos compuestos recalcitrantes los cuales son perjudiciales tanto para los seres humanos como para la flora y fauna que habitan en lugares contaminados con derivados de petróleo; estos pueden ser tratamientos físicos, químicos, térmicos o biológicos.

2.2 Métodos físicos-químicos, térmicos y biológicos de remediación

Antes de emplear una técnica de remediación es importante determinar las características del contaminante a eliminar. Por ejemplo, la estructura química

del contaminante ya que cada uno posee propiedades únicas las cuales aportan, el movimiento y su degradabilidad. Es fundamental el estudio del contaminante debido a que la polaridad, la solubilidad y la volatilidad del compuesto dependen únicamente de la estructura química y estos son factores esenciales al momento de la remediación. La toxicidad es el aspecto más importante a tomar en cuenta ya que determina si se debe realizar una remediación o no en el lugar. Los compuestos al ser persistentes y altamente tóxicos causan inhibición de los microorganismos presentes en la zona impidiendo la biodegradación. La concentración del contaminante en una zona determinada es clave para definir el tipo de tecnología de remediación a utilizar. La concentración del contaminante se relaciona con la toxicidad ya que varios compuestos al encontrarse en bajas concentraciones son tolerables para los microorganismos, no obstante, cuando la concentración aumenta la toxicidad de igual forma se ve aumentada afectando la remediación del sitio (Su, 2014, pp. 1-24).

2.2.1 Métodos físico-químicos

Son aquellas tecnologías que aprovechan las propiedades físicas y químicas de los contaminantes para controlar la contaminación. Se basan en el principio de destrucción, separación e inmovilización del contaminante. Algunas ventajas del empleo de este tipo de tratamientos es que se realizan en tiempos cortos y no necesitan de equipos complicados de acceder. No obstante, presentan desventajas como el desecho de residuos post remediación causando un aumento de costo y el requerimiento de permisos específicos para su eliminación (Kurniawan, Lo, & Chan, 2006, pp. 80-100).

La remediación electrocinética es una tecnología en desarrollo que se basa en las propiedades eléctricas del suelo para separar compuestos orgánicos e inorgánicos de suelos y lodos, en donde los iones con carga positiva migran al cátodo y los aniones migran al ánodo. Esta tecnología actúa en condiciones

ácidas favoreciendo la liberación de metales pesados. Las principales ventajas de esta tecnología son el bajo costo, y la capacidad de actuar en suelos altamente permeables (Zhang et al., 2014, pp. 3126-3133). La remediación electrocinética es muy empleada para el tratamiento de contaminantes orgánicos y metales pesados como el plomo, níquel, mercurio, cobre, zinc y cromo. Los costos de esta tecnología oscilan entre los 50 dólares por metro cúbico (López, 2013, pp. 18-21).

A diferencia del otro método, el lavado de suelos es una tecnología la cual separa contaminantes orgánicos e inorgánicos mediante líquidos de extracción para destruir y remover el contaminante (Ceschia et al., 2014, pp. 4638-4645). La técnica consiste en lavados con solventes orgánicos con la finalidad de reducir la cantidad de tierra contaminada y lograr la separación de las partículas finas y gruesas del suelo. Este método presenta algunas ventajas como son su funcionamiento en sistemas cerrados lo que facilita el control de factores externos como la temperatura y el pH, es un tratamiento de carácter *in situ* y tiene una amplia tasa de eliminación de contaminantes. Esta tecnología es utilizada para la eliminación de metales derivados del petróleo, pesticidas e hidrocarburos policíclicos (Lau, Gan, Ng, & Poh, 2014, pp. 640-649).

Por otra parte, la extracción de vapores es una técnica de remoción útil únicamente para eliminar compuestos volátiles del suelo mediante la inserción de aire. La eficiencia de esta tecnología depende de las propiedades químicas del contaminante específicamente la permeabilidad del suelo y la homogenización del suelo. Presenta limitaciones: es un proceso deficiente para la eliminación de aceites de alto peso molecular, dioxinas y metales pesados, y los líquidos residuales después del proceso de extracción de vapor deben ser tratados, lo que genera un costo adicional al proceso (Ahmadi et al., 2014, pp. 16091-16106).

La técnica de solidificación y estabilización consiste en la adición de componentes externos para la inmovilización del contaminante. La solidificación se refiere al encapsulamiento del contaminante con la finalidad de limitar su movilidad, mientras que la estabilización limita la solubilidad por medio de polímeros, cal y cemento Portland (Tzanakos, Mimiilidou, Anastasiadou, Stratakis, & Gidaracos, 2014, pp. 1823-1828). Presenta algunas desventajas como la profundidad en la que se encuentre el contaminante lo que afecta la estabilización, además, el uso futuro del sitio puede verse afectado debido al material solidificante ya que puede resultar tóxico (Lara-Díaz & Melgoza-Alemán, 2009, pp. 29-38).

Los surfactantes sintéticos son moléculas anfifílicas empleadas para la movilización de los contaminantes. En la actualidad son muy utilizados en la industria petrolera, específicamente en la remoción de petróleo crudo. Los surfactantes sintéticos actúan incrementando la solubilidad de los componentes derivados del petróleo. Las principales ventajas de los surfactantes sintéticos son la fácil comercialización, la distribución, el bajo costo de producción, la degradación del hidrocarburo y el aumento de la solubilidad. Sin embargo, presentan limitaciones: estas moléculas sintéticas son altamente tóxicas y los residuos suelen ser más tóxicos y peligrosos que el contaminante. Al momento que ocurre la eliminación del surfactante este reduce la biodisponibilidad del contaminante debido a su estructura química compleja causando dificultad en la degradación del contaminante. Por otra parte puede ocurrir la inhibición de la bacteria degradadora de estos compuestos en una futura biorremediación (Tian et al., 2016, pp. 171-179).

2.2.2 Métodos térmicos de remediación

Son técnicas muy rápidas, pero son sumamente costosas, debido al uso de energía que se requiere para alcanzar las temperaturas de eliminación del contaminante. Entre las más utilizadas están: la desorción térmica, la

incineración, la vitrificación y la pirólisis (Volke Sepúlveda & Velasco Trejo, 2004, pp. 27-46).

La desorción térmica es un tratamiento que consiste en alcanzar temperaturas entre 90 y 545°C en el suelo con la finalidad de vaporizar, descomponer o fundir el contaminante (Volke Sepúlveda & Velasco Trejo, 2004, pp. 27-46). El calor desprendido por la técnica libera el contaminante en forma gaseosa. El mecanismo de acción de esta tecnología es mediante la transmisión de calor al suelo mediante la inyección a presión de aire caliente o la inyección de vapor. Esta técnica no es muy utilizada en suelos que no son permeables y el costo del tratamiento es alto en comparación a otras tecnologías (Falciglia, Giustra, & Vagliasindi, 2011, pp. 392-400).

De igual manera, la incineración utiliza el mismo principio que la desorción térmica, la temperatura de acción de esta tecnología oscila entre los 870 a 1200°C, la eficacia de remoción del contaminante alcanza el 99,99% (Volke Sepúlveda & Velasco Trejo, 2004, pp. 27-46). La principal desventaja de la incineración es que se debe tratar los gases de combustión que son producto de las altas temperaturas al reaccionar con el contaminante, ya que estos pueden generar contaminantes más volátiles y tóxicos. Esta técnica es muy utilizada para la remediación de suelos contaminados con residuos de hidrocarburos clorados (Arena, 2012, pp. 625-639).

Por otra parte, la vitrificación es otra técnica de remediación térmica que puede actuar tanto *in situ* como *ex situ* y tiene como principio la eliminación de compuestos orgánicos a temperaturas de 1600 a 2000°C mediante una corriente eléctrica. Esta tecnología busca estabilizar los contaminantes inorgánicos y destruir los contaminantes orgánicos (Mallampati, Mitoma, Okuda, Simion, & Lee, 2015, pp. 118-124). La principal ventaja es que los residuos de vidrio son más estables que los residuos cementados debido a la

resistencia del vidrio, no obstante, una de las limitaciones de esta técnica de remediación es el daño excesivo que generan estas temperaturas al ecosistema (Volke Sepúlveda & Velasco Trejo, 2004, pp. 27-46).

Finalmente, la pirólisis es un tratamiento térmico que permite descomponer los contaminantes orgánicos en ausencia de oxígeno a temperaturas mayores a 430°C, generando gases residuales como el metano, el etano, compuestos condensados e hidrocarburos de bajo peso molecular. Estos residuos son muy utilizados como fuente de combustible. Es una técnica efectiva para el tratamiento de compuestos halogenados, dioxinas, pesticidas y pinturas. El principal problema de la pirólisis es que no tiene la capacidad de separar compuestos inorgánicos del suelo, y la efectividad del proceso disminuye en ambientes con un alto porcentaje de humedad (Volke Sepúlveda & Velasco Trejo, 2004, pp. 27-46).

2.2.3 Métodos biológicos de remediación

Son el conjunto de técnicas que utilizan organismos vivos para degradar compuestos tóxicos y transformarlos en compuestos amigables con el medio ambiente. El microorganismo utiliza al contaminante como fuente de carbono y energía para su crecimiento y su posterior actividad catalítica. Existen diversas tecnologías para bioremediar ambientes contaminados como la bioaumentación, la bioestimulación y el compost (Vila, 2014, pp. 48-57).

La bioaumentación es una tecnología que consiste en adicionar microorganismos externos al sitio contaminado debido que los microorganismos nativos presentes en el sitio no son suficientes y por ende no tienen la capacidad de degradar los contaminantes (Fotidis et al., 2014, pp. 7669-7676). Un factor que se debe tomar en cuenta es la concentración de células que se va adicionar al lugar ya que estas células dependen del tamaño

del sitio contaminado y la velocidad específica de crecimiento de los microorganismos. Este método ha sido utilizado para el tratamiento de ambientes contaminados con herbicidas como el 2,4-D, insecticidas y compuestos clorados. Para que la técnica de bioaumentación sea eficaz es necesario realizar pruebas de adaptación al medio ambiente, donde las condiciones sean similares al sitio contaminando tomando en cuenta el aislamiento de las bacterias y las pruebas de consumo de sustrato (Gómez, Gaviria, & Cardona, 2009, pp. 83-93).

La bioestimulación es un método que necesita las condiciones adecuadas al medio contaminado mediante la adición de nutrientes y el aumento de la humedad para acelerar la degradación de compuestos orgánicos e inmovilizar los compuestos inorgánicos. Los problemas de esta tecnología son el largo tiempo de remediación, el aumento de la movilidad del contaminante y que el suelo no sea apto para el crecimiento microbiano, además, la transferencia de oxígeno puede verse afectada con la inyección de estas soluciones acuosas ricas en nutrientes (Suja et al., 2014, pp. 115-122).

El compost es un proceso biológico que sucede de manera *ex situ*. Consiste en la mezcla de compuestos contaminados con materiales orgánicos como estiércol para la obtención de un balance de nutrientes donde se asegura la difusión correcta de oxígeno y la temperatura adecuada para el proceso (Larreátegui, 2013, pp. 22-27). Esta técnica es muy útil ya que mejora la movilización de nutrientes, reduce el uso de fertilizantes y mejora las propiedades hídricas del suelo en condiciones aerobias. Sin embargo, hay limitaciones como el espacio que se necesita para la creación de sistemas abiertos y sistemas cerrados y la incapacidad de la técnica para el tratamiento de metales pesados (Sadeh, Poulsen, & Bester, 2014, pp. 306-312).

Todas estas tecnologías son eficientes teniendo en cuenta el tipo de contaminante que se va a bioremediar. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, existen contaminantes los cuales inhiben la acción de los microorganismos debido a que son recalcitrantes en el medio ambiente y su porcentaje de toxicidad es bastante alto, por ende, se requiere de agentes externos que actúen conjuntamente con estas tecnologías y ayuden a reducir la toxicidad de estos compuestos o a su vez aumentar la solubilidad para que el contaminante sea más accesible para su posterior degradación, una alternativa eficaz a este problema es el uso de biosurfactantes.

2.3 Biosurfactantes

Los biosurfactantes son moléculas de propiedades anfifílicas y de estructura distinta entre los diferentes tipos de biosurfactantes producidas por microorganismos utilizando una amplia variedad de sustratos como azúcares, aceites, alcanos y residuos de la industria. Estas moléculas han tomado interés comercial en la industria por sus ventajas competitivas frente a los surfactantes sintéticos. Entre las ventajas más importantes tenemos que los biosurfactantes son biodegradables lo que permite su eliminación con facilidad, su biocompatibilidad y la alta especificidad con el contaminante. Además, son moléculas menos tóxicas que los surfactantes sintéticos ya que poseen estructuras ya definidas de acuerdo al tipo de biosurfactante. Entre sus limitaciones se puede mencionar la dificultad de escalar el proceso y el alto costo de producción (Sen, 2010, pp. 262-263).

Estas moléculas son de naturaleza anfifílica esto quiere decir que presentan dominios hidrofílicos (carbohidrato, aminoácido, péptido, fosfato, ácido carboxílico o alcohol) e hidrofóbicos (cadena larga de ácidos grasos) los cuales tienen la función de permanecer en la interfase polar y no polar. Debido a esta propiedad los biosurfactantes tienden acumularse en la interfase sólido-aire y sólido-líquido, así como en la superficie aire-agua y aceite-agua. Esta

acumulación permite al biosurfactante reducir las fuerzas repulsivas y lograr que las dos fases se mezclen e interactúen de mejor forma (Banat et al., 2010, pp. 427-444).

La biodisponibilidad es un parámetro fundamental cuando se habla de biorremediación. Los contaminantes hidrófobos no son biodisponibles debido a su baja solubilidad en agua lo que causa una reducción en el tiempo de degradación del biosurfactante. La biodisponibilidad depende de un conjunto de interacciones entre el suelo, el microorganismo, el contaminante y el biosurfactante. El biosurfactante actúa entre el suelo y el contaminante mediante la estimulación del transporte de masa del contaminante desde el suelo hasta la fase acuosa, ahí es donde se aumenta la biodisponibilidad mediante las interacciones microorganismo-contaminante y superficie-contaminante reduciendo la tensión superficial y la tensión interfacial (Shi, Chen, & Yin, 2013, pp. 694-701).

Otra propiedad que tienen los biosurfactantes es la reducción de la tensión superficial, siendo uno de los factores que indica la eficiencia de esta molécula. La tensión superficial se define como la medida de la energía libre de la superficie por unidad de área requerida para llevar una molécula del fondo hacia la superficie. Las principales características fisicoquímicas de los biosurfactantes son la capacidad de aumentar la solubilidad de compuestos hidrófobos en agua y de esta forma poder formar emulsiones hidrocarburos-agua.

Los biosurfactantes son moléculas producidas por organismos vivos como plantas, animales y bacterias, siendo las bacterias los organismos más empleados en la actualidad para la producción de estas moléculas. Los biosurfactantes presentan importantes actividades biológicas, antibióticas,

antifúngicas, antivirales, antitumorales e inmunomoduladoras (Henkel et al., 2012, pp. 1207-1219).

Los biosurfactantes han sido estudiados desde hace varios años atrás y con el avance de la ciencia y mediante la investigación, la producción de estas moléculas por medio de microorganismos ha tomado relevancia por varios investigadores y empresas. Existen bacterias las cuales tienen la capacidad de producir biosurfactantes con sustratos accesibles. La producción de esta molécula no es económicamente viable debido a la complejidad al momento de escalar un proceso, por lo tanto, lo que se busca en un futuro es lograr que la producción de biosurfactantes sea menos compleja al momento de escalar un proceso.

En la tabla 1 se puede observar las principales bacterias productoras de biosurfactantes, además, el tipo de biosurfactante que produce cada bacteria de acuerdo a la estructura química de esta molécula.

Tabla 1.

Principales tipos de biosurfactantes producidos por bacterias

Bacteria	Biosurfactant Type
<i>Aeromonas</i> sp	Glycolipid ^{13,14}
<i>Bacillus subtilis</i>	Lipopeptide ¹⁵
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332 LB5a	Lipopeptide ¹⁶
<i>Bacillus subtilis</i> A8-8	Lipopeptide ¹⁷
<i>Bacillus subtilis</i>	Lipopeptide ⁴
<i>Bacillus</i> sp	Lipopolysaccharide ¹⁸
<i>Klebsiella oxitoca</i>	Lipopolysaccharide ¹⁹
<i>Pantoea</i> sp	Glycolipid ²⁰
<i>Ps. aeruginosa</i> NCIMB 40044	Rhamnolipid ²¹
<i>Ps. aeruginosa</i> AT10	Rhamnolipid ²²
<i>Ps. aeruginosa</i> strain BS2	Rhamnolipid ²²
<i>Ps. aeruginosa</i> DS10-129	Rhamnolipids ²³
<i>Ps. aeruginosa</i> LB1	Rhamnolipid ²⁴
<i>Ps. aeruginosa</i>	Glycolipid ²⁵
<i>Ps. aeruginosa</i> HR	Glycolipid ²⁶
<i>Ps. fluorescens</i> HW 6	Glycolipid ²⁷
<i>Ps. aeruginosa</i> S2	Rhamnolipid ²⁸
<i>Ps. aeruginosa</i> RB 28	Rhamnolipid ²⁹
<i>Pseudoxanthomonas kaohsiungensis</i> sp nov ³⁰	—
<i>Pseudomonas</i> sp DSM 2874	Rhamnolipids ³¹
<i>Pseudomonas</i> XD-1	Lipopeptide ³² Glycopeptide
<i>Streptococcus thermophilus</i> A	Glycolipid ³³

Tomada de (Sen, 2010).

La bacteria más estudiada es *Pseudomonas aeruginosa* y se ha definido que tiene una alta capacidad para producir rhamnolípidos en diferentes tipos de sustratos, ya sean convencionales como los azúcares simples (Henkel et al., 2012, pp. 1207-1219) o sustratos complejos como aceites, contaminantes o residuos de la industria alimenticia (Sharma et al., 2015, pp. 17636-17643).

Este tipo de biosurfactante es el único que es comercializado en el mundo ya que cuenta con los permisos necesarios para su aplicación en diversos sectores de la industria como la farmacéutica, la cosmética y la petrolera. *Pseudomonas aeruginosa* tiene la capacidad de oxidar productos derivados del petróleo y por ende es un microorganismo altamente productor de biosurfactantes (Aparna, Srinikethan, & Hedge, 2011, pp. 71–75). Se ha determinado que las cepas que son aisladas de ambientes contaminados

tienen un mayor rendimiento de producción de biosurfactantes (Pacwa-Płociniczak, Płaza, Poliwoda, & Piotrowska-Seget, 2014, pp. 9385-9395).

Otra bacteria que tiene una gran importancia en la industria de los biosurfactantes es *Bacillus subtilis* la cual produce surfactina, un tipo de biosurfactante catalogado como un lipopéptido. Según estudios de Ben Ayed *Bacillus subtilis* tiene la capacidad de crecer en diferentes fuentes de carbono como hidrocarburos (Ben Ayed et al., 2015, pp. 8-14), además, puede utilizar sustratos de difícil asimilación como el licor de maíz, sustrato que fue utilizado por Gudiña empleando esta cepa (Gudiña, Fernandes, Rodrigues, Teixeira, & Rodrigues, 2015, pp. 1-7).

En estudios recientes Hemlata y Patil utilizaron bacterias del género *Stenotrophomonas* para la producción de biosurfactantes. Esta bacteria ha sido poco estudiada como microorganismo productor de biosurfactantes, no obstante, esta bacteria gracias a su origen y su similitud con *Pseudomonas* han llegado a la conclusión que este género tiene la capacidad de producir glicoproteínas (Patil et al., 2012a, pp. 5173-5178), (Hemlata et al., 2015, pp. 135-143).

2.3.1 *Stenotrophomonas maltophilia*

Inicialmente la bacteria *Pseudomonas maltophilia* fue estudiada morfológicamente y a partir de esto la bacteria fue reclasificada en *Xanthomonas maltophilia* y posteriormente en *Stenotrophomonas maltophilia*. Su taxonomía consiste en células pequeñas curvas en forma de bacilos, no esporuladoras, son bacterias Gram negativas con una longitud de 0,5 a 1,5µm, son bacterias móviles por medios de flagelos y las colonias son de color blanco. Entre las condiciones de crecimiento de la bacteria se puede mencionar que es aerobia estricta, el crecimiento no ocurre a temperaturas inferiores a los

5°C o superiores a 40°C, la temperatura óptima de crecimiento es 35°C; algunos aminoácidos resultan ser necesarios para el crecimiento como la metionina o la cisteína (Denton & Kerr, 1998, pp. 57-63).

La bacteria tiene la capacidad de metabolizar una amplia gama de sustratos que van desde los más convencionales hasta los más difíciles de asimilar como contaminantes, antibióticos y aceites. Diversas pruebas bioquímicas han sido descritas para la identificación morfológica de la bacteria, así como la identificación de las posibles fuentes de carbono que esta bacteria puede metabolizar. El género *Stenotrophomonas* inicialmente fue reconocido como bacterias nosocomiales, no obstante, ha sido descubierto en los últimos años como productor de biosurfactantes. *Stenotrophomonas maltophilia* es considerada una bacteria prometedora en un futuro y con gran aplicación biotecnológica. Patil en el año 2012 realizó un estudio en donde utilizó *Stenotrophomonas koreensis*, en donde se estudió la tolerancia de metales pesados en esta bacteria y la optimización de la fuente de carbono (glucosa) y la fuente de nitrógeno (nitrato de potasio) (Patil et al., 2012, pp. 5173-5178).

Otro estudio reciente en el año 2015 determina la capacidad de la bacteria de crecer en sustratos de difícil asimilación como el aceite de soya y el glicerol en donde se emplea la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* para la producción de biosurfactantes, en donde se estudió el efecto del hierro y como este se quela durante la producción de biosurfactantes, de igual manera se estudió la dextrosa como fuente de carbono y se determinó que la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* tiene la capacidad de producir ramnolípidos (Hemlata et al., 2015, pp. 135-143).

2.3.2 Sustratos para la producción de biosurfactantes

Para que un proceso tenga ventajas competitivas el tipo de sustrato es fundamental ya que el éxito depende del uso de materias primas de bajo costo, en donde alrededor del 10 al 30% del producto tiene que ver con la fuente de carbono empleada. Los productos agroindustriales son una alternativa debido a la fácil adquisición de estos residuos, sin embargo, esto depende del tipo de microorganismo que se vaya a utilizar ya que no todas las bacterias tienen la capacidad de metabolizar todos los sustratos. Establecer las condiciones óptimas de producción va a depender directamente del tipo de sustrato y el tipo de microorganismo que se vaya a emplear en el proceso (Sen, 2010, pp. 197-198).

Los subproductos de la industria vegetal como por ejemplo los aceites vegetales son una buena alternativa para la producción de Biosurfactantes, son una fuente lipídica compuesta por ácidos grasos. La producción mundial de aceites vegetales oscila entre los 2,5 - 3 millones de toneladas, los aceites sin refinar son un problema en la industria al momento de desechar debido a esto es una buena opción el uso de estos aceites como fuente de carbono (Makkar, Cameotra, & Banat, 2011, pp. 1-5).

Los principales aceites utilizados son de soya, canola, maíz, girasol, cártamo, aceituna, colza, semilla de uva, palma, coco y pescado. La mayoría de estos aceites están compuestos por: Ácidos mono-, di- y triacilglicéridos, pigmentos, esteroides, tocoferoles, glicerina, vitaminas, fragmentos de proteína y Glicolípidos (Makkar et al., 2011, pp. 1-5).

Los subproductos de la industria agrícola son muy utilizados para la producción de Biosurfactantes en donde existen algunos tipos de sustratos como residuos de la papa, la cual tiene altos contenidos de carbohidratos, proteínas y almidón

y es utilizado como fuente de carbono para la producción de Biosurfactantes. La melaza, es un residuo de la industria azucarera que sirve para la elaboración de varios metabolitos como aminoácidos, ácido cítrico y acetona. El empleo de melaza como fuente de energía ha tenido buenos resultados en la producción de Biosurfactantes, debido a que es un sustrato de bajo costo y altamente nutritivo, su composición generalmente está compuesta por un 50% de azúcares disponibles los cuales son metabolizados por la bacteria (Cameotra, 2002, pp. 428-434).

Los materiales de lignocelulosa son una fuente de carbono orgánico, la lignocelulosa consta de tres tipos de polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina. Estos polímeros se encuentran unidos por fuerzas covalentes y por ende las bacterias necesitan de enzimas hidrolíticas para degradar estas macromoléculas. Existen algunos estudios en los cuales utilizan lignocelulosa para la producción de Biosurfactantes a partir de *Lactobacillus* en un medio sintético. El empleo de sustratos hemicelulósicos son una buena alternativa para competir económicamente en la producción de Biosurfactantes (Makkar et al., 2011, pp. 1-5).

2.3.3 Tipos de Biosurfactantes

Los biosurfactantes se clasifican de acuerdo a su composición química y tipo de microorganismo productor y se encuentran divididos en 5 grupos generales (Figura 1): glicolípidos, lipopéptidos o lipoproteínas, fosfolípidos, hidroxilados o ácidos grasos y surfactantes poliméricos (Sen, 2010, pp. 268-269).

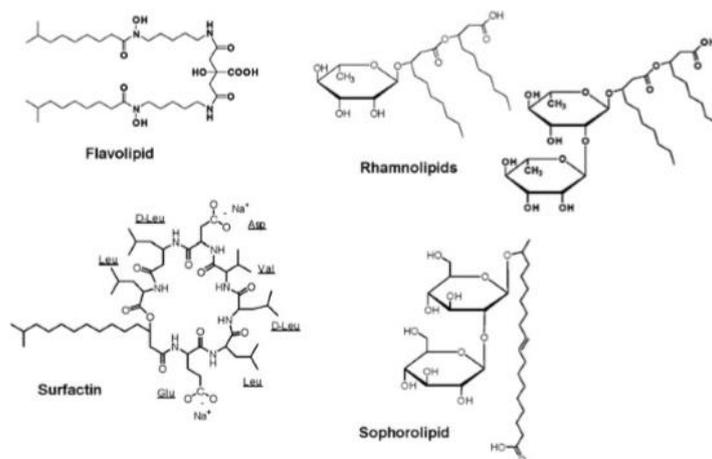


Figura 1. Estructura de los principales tipos de biosurfactantes.

Tomado de (Soberón-Chávez, 2011).

2.3.3.1 Glicolípidos

Los Glicolípidos son carbohidratos de tipo mono-, di-, tri- y tetrasacáridos los cuales incluyen glucosa, manosa, galactosa, ramnosa, ácido glucurónico los cuales se encuentran unidos a cadenas largas de ácidos alifáticos o hidroxialifáticos. Entre los más conocidos están los ramnolípidos, los soforolípidos y los trehalolípidos (Sen, 2010, pp. 268-269). Los ramnolípidos son catalogados como el tipo de biosurfactante más común en la industria, el cual contiene una o dos moléculas de ramnosa unidas a una o dos moléculas de B- ácido hidroxidecanónico, son los más estudiados hasta la actualidad, donde se han descubierto 4 tipos de ramnolípidos los cuales varían en la cantidad de ramnosa (Figura 2). Este tipo de biosurfactantes ha sido considerado como el mejor en la remoción de compuestos hidrofóbicos en suelos contaminados debido a su alta actividad emulsificante y su afinidad a compuestos hidrofóbicos (Soberón-Chávez, 2011, pp. 13-56).

En los ramnolípidos su estructura está conformada por una parte hidrofóbica compuesta por un grupo hidroxilo o un grupo B-hidroxilo ácido graso de

diferente cantidad de carbono, mientras que la parte hidrofílica consta de manosileritriol como su parte polar (Soberón-Chávez, 2011, pp. 13-56).

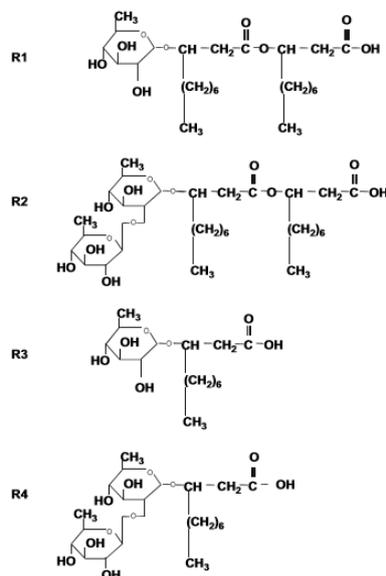


Figura 2. Estructura química de los 4 tipos de ramnolípidos existentes en la industria.

Tomado de (Soberón-Chávez, 2011).

La bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* es considerado uno de los microorganismos nuevos en torno a la producción de biosurfactantes, por lo tanto, no hay investigaciones las cuales determinen la biosíntesis a partir de la bacteria. La ruta biosintética para la producción de biosurfactantes a partir de *Stenotrophomonas maltophilia* no está definida, sin embargo, gracias a su pasado filogenético con *Pseudomonas aeruginosa* se puede determinar el tipo de biosurfactante que produce. La bacteria *Stenotrophomonas* tiene la capacidad de producir Glicolípidos, específicamente ramnolípidos.

Stenotrophomonas y *Pseudomonas* tienen la opción de producir dos tipos de ramnolípidos: mono-ramnolípidos y di-ramnolípidos mediante dos rutas biosintéticas en donde participan una serie de enzimas (AlgC) y genes (*rm*) para transformar D-glucosa 6 fosfato en L-ramnosa. La ruta biosintética a partir de ácidos grasos utiliza otras enzimas (RhIG) para transformar el ácido graso

en β -hidroxydecanoil CoA para finalmente producir los dos tipos de ramnolípidos (Dobler, Vilela, Almeida, & Neves, 2016, pp. 123-135) (Figura 3).

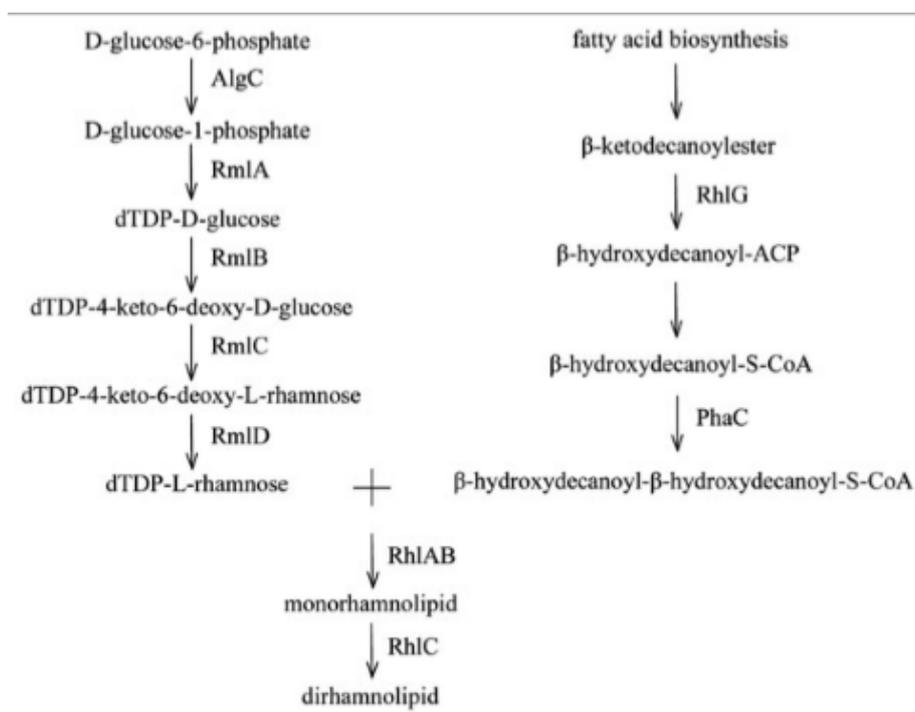


Figura 3. Ruta biosintética de ramnolípidos a partir de glucosa y ácidos grasos donde intervienen enzimas y genes importantes para la producción de biosurfactantes.

Tomado de (Sen, 2010).

Los soforolípidos son otro tipo de biosurfactantes los cuales tienen en su estructura una azúcar dimérica, en este caso la soforosa y un hidroxiaácido graso. Estos compuestos se encuentran unidos mediante un enlace β -glicosídico. Algunas características de estas moléculas son la excelente compatibilidad que poseen, siendo importante para la industria cosmética, además, de presentar actividad emulsificante y antimicrobiana (Van Bogaert et al., 2007, pp. 23-34). Este tipo de biosurfactantes al contrario de los ramnolípidos es sintetizado principalmente por levaduras. Se han descubierto dos tipos de soforolípidos, los ácidos y los lactónicos, estos últimos presentan mayor interés económico e investigativo que los soforolípidos ácidos (Sen, 2010, pp. 268-269). Finalmente, los trehalolípidos son aquellos biosurfactantes que tienen en su estructura trehalosa unidos al ácido micólico, estos

biosurfactantes son generados a partir de diversos microorganismos especialmente *Rhodococcus* sp. (White, Hird, & Ali, 2013, pp. 744-755). Estos biosurfactantes son compuestos altamente emulsificantes y muy empleados en la recuperación de aceites, una particularidad de este tipo de biosurfactantes es que son producidos mediante el metabolismo de sustratos hidrofóbicos en su mayoría. Los tipos de trehalolípidos pueden ser monomicolato, dimicolato y trimicolato estos causan cambios en la estructura y tamaño del ácido micólico (Rahman & Gakpe, 2008, pp. 360-370).

2.3.3.2 Lipoproteínas y Lipopéptidos

La surfactina es un tipo de biosurfactante producido por el género *Bacillus*, el cual en su estructura contiene 7 aminoácidos unidos a grupos carboxilos e hidroxilos con una longitud de 14 carbonos. Estos tipos de biosurfactantes son moléculas consideradas con mayor actividad de superficie sobre el contaminante (Liu, Lin, Wang, Huang, & Li, 2015, pp. 31-37). Los tipos de surfactina varían de acuerdo a la longitud de las cadenas de los grupos carboxilos e hidroxilos. Una de las principales características de la surfactina es la habilidad que posee para lisar eritrocitos de mamíferos para formar esferoplastos, siendo útil para la identificación de esta molécula por medio de hemólisis en agar sangre (Sen, 2010, pp. 268-269).

Además, existen otros tipos de lipoproteínas como los ácidos grasos y los fosfolípidos, sin embargo, no son muy empleados en la industria debido a sus propiedades emulsificantes las cuales no son óptimas para un proceso de remediación. Estos tipos de biosurfactantes son conocidos por formar componentes de la membrana microbiana, por lo general su producción se ve aumentada cuando los microorganismos crecen en sustratos difíciles como alcanos, por ejemplo, el hexadecano (Sen, 2010, pp. 268-269).

2.3.3.3 Biosurfactantes poliméricos

Estos tipos de biosurfactantes son polímeros de alto peso molecular los cuales presentan características como: la alta viscosidad, la resistencia a la tracción y la resistencia al corte. Se dividen en dos tipos: emulsano y liposano (Rahman & Gakpe, 2008, pp. 360-370). El emulsano es un bioemulsificante producido a partir de la bacteria *Acinetobacter calcoaceticus*, un polianiónico heteropolisacárido, el cual es efectivo como emulsificante en hidrocarburos presentes en agua siendo uno de los estabilizadores emulsificantes más potentes en la industria. Además, tiene gran importancia debido a sus propiedades de limpieza ya que tiene la capacidad de formar emulsiones estables entre hidrocarburos y agua (Amani & Kariminezhad, 2016, pp. 216-222). El liposano es un bioemulsificante extracelular el cual es soluble en agua a partir del microorganismo *Candida lipolytica*, está compuesto por 83% de carbohidratos (glucosa, galactosa y ácido galacturónico) y 17% de proteínas (Rahman & Gakpe, 2008, pp. 360-370).

2.3.4 Aplicaciones

Los biosurfactantes en la actualidad tienen una gran importancia biotecnológica en diversos sectores industriales, esto debido a sus propiedades las cuales pueden ser aprovechadas en las industrias, entre los más importantes se encuentran los sectores farmacéuticos, alimenticios, petroleros, agroquímicos y cosméticos (Sen, 2010, pp. 54-60).

Los biosurfactantes en la industria petroquímica es utilizado en diversas aplicaciones, una de ellas es para la limpieza de petróleo en los tanques de almacenamiento, esto debido a las propiedades emulsificantes del biosurfactante, obteniendo una recuperación del 91% del petróleo crudo total (Sen, 2010, pp. 54-60). Además, son muy utilizados en la recuperación de petróleo mediante diversas técnicas, una de ellas es la adición de

microrganismos productores de biosurfactantes para que actúen en los pozos de yacimiento de petróleo, otra alternativa es la adición de nutrientes que favorezcan el crecimiento y la producción de biosurfactantes por los microrganismos presentes en el sitio, finalmente, la última alternativa es la producción de biosurfactantes de forma *ex situ* en biorreactores para luego adicionar estos compuestos en el sitio contaminado. El uso de esta molécula resulta una fuente económicamente viable y amigable con el medio ambiente (Silva et al., 2014, pp. 12523-12542).

Los biosurfactantes en la industria alimenticia han tomado importancia en la actualidad mediante diferentes aplicaciones como el control de aglomerados de grasa, estabilización de los sistemas de aireación, el mejoramiento de la textura, la modificación de las propiedades reológicas de la masa del trigo y la vida útil del producto (Nitschke & Silva, 2016, pp. 2-35). En la industria alimenticia se adicionan biosurfactantes como emulsionantes en el procesamiento de materias primas. Por otra parte, se adicionan estas moléculas para modificar las propiedades reológicas. Se ha identificado que la bacteria *Enterobacter cloacae* tiene la capacidad de producir biosurfactantes capaces de ser utilizados en la industria alimenticia como un agente estimulador de la viscosidad (Campos et al., 2013, pp. 1097-1108).

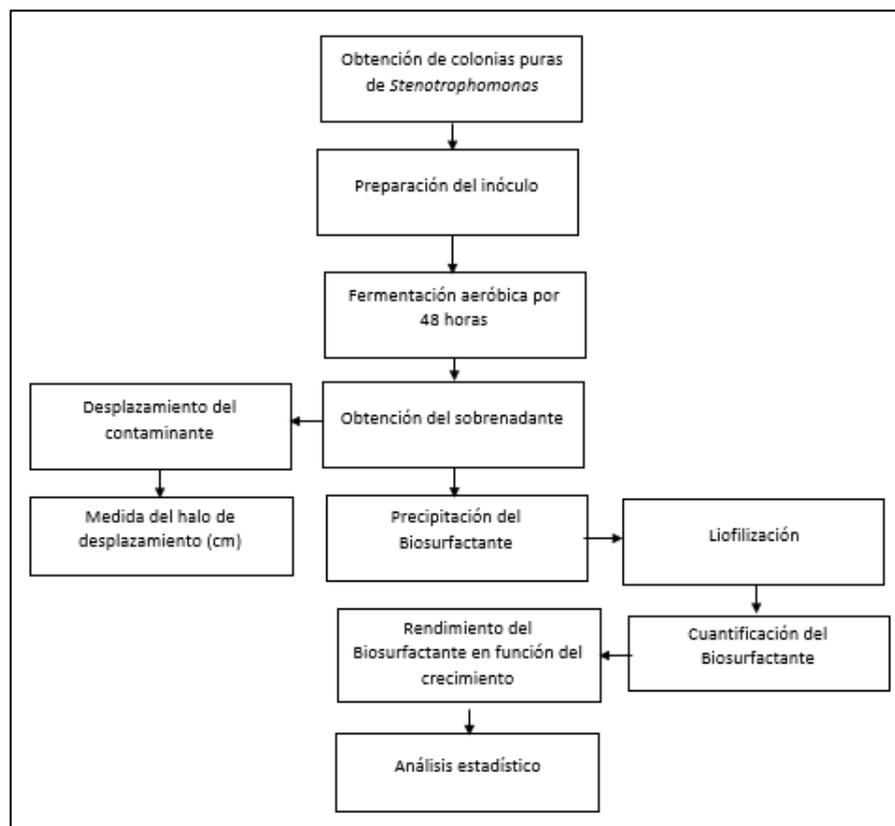
Los biosurfactantes también poseen aplicaciones dentro de la industria agrícola por medio de la buena humectación del suelo esto mediante la unión de los emulsionantes con el agua. La aplicación más importante de los biosurfactantes dentro de la industria agrícola es sin duda la eliminación de compuestos clorados y pesticidas ya que los biosurfactantes eliminan este contaminante en un 40%. Las propiedades antimicrobianas que poseen los biosurfactantes en especial los ramnolípidos ayudan en el control biológico de las enfermedades de las plantas (Ramarathnam et al., 2007, pp. 901-911). En la industria farmacéutica los biosurfactantes también son considerados moléculas importantes, específicamente los ramnolípidos y algunos

lipopéptidos debido a las actividades antimicrobianas que poseen (Shoeb, Akhlaq, Badar, Akhter, & Imtiaz, 2013, pp. 243-252). La surfactina sin duda es el tipo de biosurfactante más utilizado en la industria farmacéutica debido a las propiedades de hemólisis que posee inhibiendo la formación de coágulos y en el desarrollo de medicamentos contra el virus de inmunodeficiencia humana (Fathabad, 2010, pp. 1-11). La iturina, un análogo de la surfactina ha sido aplicado en el desarrollo de fármacos ya que entre sus propiedades tiene la capacidad de inhibir el virus del herpes y la ulcera gástrica.

3 Diseño del plan experimental

3.1 Diseños experimentales

Diagrama de flujo del proceso de producción de biosurfactantes a partir de una bacteria del género *Stenotrophomonas*.



En el presente estudio las variables independientes son: la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el sulfato de magnesio, el sulfato de manganeso, el sulfato de hierro, el cloruro de sodio y el cloruro de calcio; la variable dependiente es la producción de Biosurfactantes.

El control de los experimentos se realizó manteniendo estable la temperatura, el pH y la agitación; se realizaron tres repeticiones por cada uno de los tratamientos del diseño experimental. Se evaluaron dos fuentes de carbono: melaza y aceite de soya. Las fuentes de nitrógeno estudiadas son: sulfato de amonio, peptona y nitrato de potasio.

Se analizaron dos fuentes de carbono (melaza y aceite de soya) y tres fuentes de nitrógeno (sulfato de amonio, nitrato de potasio y peptona) con el empleo de un diseño factorial completamente al azar. Se utilizaron distintas concentraciones de cada fuente de carbono y nitrógeno para la evaluación de la producción de biosurfactantes (Ver anexo 1).

Con la mejor fuente de carbono y la mejor fuente de nitrógeno se aplicó un diseño factorial Plackett-Burman para determinar las variables significativas para la mayor producción de Biosurfactantes. Con las variables significativas se realizaron los diferentes diseños de superficies de respuesta para la optimización de las condiciones de cultivo.

El diseño de Plackett-Burman consistió en 12 tratamientos variando las concentraciones de las 11 variables estudiadas; cada tratamiento se realizó por triplicado para garantizar la reproducibilidad del diseño experimental (Tabla 2 y 3)

Tabla 2.

Variables para el diseño de Plackett-Burman

Variables	Valor máximo	Valor mínimo
X1: Aceite de soya	3,50%	1,50%
X2: Peptona	2,5 g/L	1 g/L
X3: NaCl	0,8 g/L	0,1 g/L
X4: MgSO ₄	0,8 g/L	0,07 g/L
X5: MnSO ₄	0,0060 g/L	0,0030 g/L
X6: FeSO ₄	0,02 g/L	0,008 g/L
X7: CaCl ₂	0,1 g/L	0,03 g/L
X8: ZnSO ₄	0,3 g/L	0,05 g/L
X9: Temperatura	37°C	28°C
X10: Agitación	160 rpm	100 rpm
X11: pH	7	4

Tabla 3.

Matriz del diseño experimental de Plackett-Burman.

Tabla de experimentos. Diseño de Plackett-Burman											
Corridos/Factores	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
T1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
T2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1
T3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
T4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1
T5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1
T6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1
T7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1
T8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
T9	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1
T10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1
T11	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1
T12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Con las variables más significativas que se obtuvieron en el diseño experimental Plackett-Burman se procedió a realizar tres diseños centrales compuestos con sus respectivos gráficos de superficie de respuesta con la finalidad de obtener las concentraciones óptimas de cada una de las variables estadísticamente significativas. Estos diseños consistieron de dos variables: aceite de soya y sulfato de magnesio (Ver anexo 2.1), aceite de soya y cloruro

de sodio (Ver anexo 2.2) y sulfato de magnesio y cloruro de sodio (Ver anexo 2.3).

3.2 Procedimientos

3.2.1 Muestra

En este trabajo se empleó una bacteria del género *Stenotrophomonas* obtenida del stock de cepas del laboratorio de Biotecnología industrial de la Universidad de las Américas, Quito. Para la obtención de la muestra se utilizó el sobrenadante de los medios de cultivo a las cuarenta y ocho horas de incubación.

3.2.2 Materiales y métodos para la obtención de los datos

En el desarrollo del trabajo los equipos principales empleados fueron: incubadora (Biobase, Alemania), balanza analítica (Radwag, Polonia), centrífuga refrigerada (Sigma, E.E.U.U), espectrofotómetro (Thermo Scientific, E.E.U.U) liofilizador (SP Scientific, Inglaterra) y cabina de flujo laminar (Biobase, Alemania). Como fuente de carbono se utilizó aceite de soya (comercial) y melaza (Agrocalidad).

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

Pruebas bioquímicas

Se realizaron diferentes pruebas bioquímicas para la confirmación de la bacteria del género *Stenotrophomonas*. Las principales pruebas fueron: catalasa, oxidasa, prueba de citrato, prueba de almidón, prueba de indol, prueba de rojo metilo, prueba del ácido sulfhídrico y una tinción Gram para observar la morfología de la bacteria. Estas pruebas se realizaron en un volumen de 15 mL en tubos de ensayo.

Obtención de colonias puras de *Stenotrophomonas*

Se realizaron los cultivos de *Stenotrophomonas* en agar nutriente mediante diluciones seriadas en agua autoclavada (1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000) para obtener colonias puras. Además, se reprodujo la bacteria en diferentes cajas Petri mediante un estriado para su uso posterior a lo largo del trabajo.

Curva de crecimiento de la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia*

Se preparó un medio de cultivo (100 mL) en un matraz de 250mL y un medio estándar (250 mL) en un matraz de 500mL y se inoculó el 10% de células en el medio estándar a partir del medio inicial. Se midió la absorbancia a cada hora para obtener una curva de crecimiento y poder obtener los parámetros cinéticos en matraz. Estos datos se transformaron a concentración mediante una curva de calibrado.

Formulación del medio de cultivo

El medio de cultivo para el experimento fue elaborado en base a (Hemlata et al., 2015, pp. 135-143), (Patil et al., 2012, pp. 5173-5178) & (Belcher, Huynh, Hoang, & Crowley, 2012, pp. 3261-3267). Se realizaron pequeñas modificaciones a la concentración de algunos reactivos. Este medio de cultivo

fue constante para la evaluación de las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, y se modificó en los diseños experimentales en los que se evaluó la influencia de los nutrientes suplementados al medio de cultivo; los compuestos utilizados fueron los siguientes: K_2HPO_4 1 g/L, KH_2PO_4 0,5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g/L, NaCl 0,1 g/L, $CaCl_2$ 0,1 g/L, $ZnSO_4$ 0,05 g/L, Peptona 1g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,008 g/L y $MnSO_4$ 0,0030 g/L.

Preparación del inóculo inicial

Se prepararon 300 mL de un medio de cultivo en matraz de 500 mL el cual contenía los nutrientes mencionados anteriormente, la bacteria creció en condiciones estables de temperatura (35°C), pH (7) y agitación (160 rpm). Es importante destacar que este medio de cultivo se modificó de acuerdo al diseño experimental mencionado previamente; este medio se incubó por 72 horas, tiempo en el cual el microorganismo debe producir gran cantidad de biomasa. Se prepararon los medios de acuerdo a los diferentes tratamientos del diseño de forma aleatoria y con sus respectivas réplicas. Se colocó el 10% de inóculo bacteriano en el medio de cultivo para su posterior fermentación.

Precipitación de los Biosurfactantes.

Se tomaron 60 mL del medio de cultivo de *Stenotrophomonas* después de las 48 horas de crecimiento y se centrifugó a 10000 rpm por 20 minutos y 4°C. Una vez que se obtuvo el sobrenadante se procedió a bajar el pH a 2 con la adición de ácido clorhídrico al 37%, y se guardaron las muestras en refrigeración a 4°C por 24 horas. Después de este tiempo se realizó otra centrifugación con los mismos parámetros y se recuperaron los Biosurfactantes. Los Biosurfactantes se resuspendieron en 3 mL de agua destilada. Este tratamiento se empleó para todos los tratamientos de los diseños experimentales con sus respectivas réplicas.

Obtención de los Biosurfactantes

Se tomó la muestra resuspendida en agua destilada y se procedió a congelar dicha muestra en un ultra congelador a -80°C . Posteriormente se liofilizó con la finalidad de eliminar el agua. A continuación, se pesó la cantidad de Biosurfactantes obtenida a partir de este proceso y se realizó la extracción cruda de los Biosurfactantes mediante la adición de solventes orgánicos como metanol y cloroformo en una relación 2:1 dependiendo del volumen final obtenido.

Prueba de desplazamiento del contaminante

Para demostrar la presencia del Biosurfactante a partir del género *Stenotrophomonas*, se prepararon placas Petri a las cuales se adicionaron 20 mL de agua destilada y 100 μL de petróleo. Se agregó a las placas la muestra de Biosurfactantes correspondiente a cada tratamiento en una cantidad de 10 μL para medir el halo de limpieza.

Evaluación del rendimiento del Biosurfactante en función del crecimiento

Se preparó un inóculo inicial optimizado para evaluar el crecimiento de la bacteria mediante espectrofotometría a 600nm. Para esto fue necesario la elaboración de una curva de calibrado, mediante diluciones del medio de cultivo y el inóculo preparado, esto con la finalidad de transformar los datos de absorbancia a concentración. Se efectuó el mismo proceso de precipitación de los Biosurfactantes a cada hora para llegar a la obtención de la curva de crecimiento en función del producto.

Escalado del medio optimizado

Una vez obtenido el medio de cultivo optimizado a partir del diseño de superficie de respuesta, el siguiente paso fue escalar el tratamiento optimizado a un Biorreactor de 7 litros en condiciones de cultivo tipo batch; en donde se controló de forma específica la aireación, la temperatura (35°C) y el pH (7). Se

realizó una curva de crecimiento y una curva de producto durante 48 horas para comparar con los parámetros cinéticos obtenidos en matraz.

3.2.3 Evaluación estadística de los resultados

En el análisis inicial de las fuentes de carbono y de nitrógeno se realizaron gráficos de barras y mediante un ANOVA se identificó cual fue la mejor fuente de carbono y de nitrógeno para posteriormente proceder a la corrida del diseño experimental Plackett-Burman. En el diseño factorial de Plackett-Burman se realizaron los respectivos tratamientos de acuerdo a la matriz experimental y se procedió a realizar un diagrama de Pareto para identificar qué variables son significativas e influyentes en la producción de los Biosurfactantes.

Se realizaron diseños de superficie de respuesta, utilizando las variables más significativas del experimento tomando en cuenta el diseño de Plackett-Burman y se realizó una regresión multivariable para obtener el mejor tratamiento y un medio optimizado de acuerdo a las variables planteadas.

Todos estos análisis estadísticos se realizarán con la ayuda de software estadísticos como SigmaPlot (<https://sigmaplot.softonic.com/>) y Minitab 17 (<http://www.minitab.com/es-mx/products/minitab/>).

4 Resultados y Discusión

4.1 Confirmación del género *Stenotrophomonas*

Para la confirmación del género se realizaron un total de 7 pruebas bioquímicas, las cuales son pruebas necesarias para identificar un género bacteriano. Se aplicó la prueba del indol, ensayo bioquímico que se realiza con bacterias para determinar la capacidad de la bacteria en producir la enzima

triptofanasa. Esta enzima rompe el anillo de indol del aminoácido triptófano mediante una hidrólisis dando como resultado alanina e indol (McFaddin, 2013, pp. 206-217). Como resultado la prueba fue negativa para la bacteria empleada ya que no hubo coloración rojiza en el medio de cultivo (Figura 4a).

La prueba de citrato, tiene como fundamento identificar si la bacteria utiliza el citrato como fuente de carbono y sales amónicas como fuente de nitrógeno, lo que provoca la alcalinización del medio. Las bacterias metabolizan el citrato y liberan iones amonio generando un cambio en la coloración del medio de cultivo de verde a un tono azul (McFaddin, 2013, pp. 92-98). En este trabajo la bacteria empleada si metabolizó el citrato y por lo tanto si existió un cambio de coloración en el medio empleado (Figura 4b).

La prueba de rojo metilo es una prueba bioquímica utilizada para la identificación de enterobacterias. Esta prueba detecta la fermentación acida, por lo general ácidos de carácter fuerte. El pH del medio de cultivo se reduce a 4 y se necesita de un indicador para observar el resultado de la prueba de rojo metilo (McFaddin, 2013, pp. 301-306). La interpretación del resultado se da mediante la coloración del medio de cultivo al momento de añadir un agente externo como el reactivo de Kovacks. La bacteria en el medio de cultivo no presento cambio de coloración al colocar el reactivo de Kovacks por lo tanto el resultado de esta prueba fue negativo (Figura 4c).

Se buscó comprobar si la bacteria tiene la capacidad de producir ácido sulfhídrico mediante el uso de tiosulfato de sodio como fuente de carbono. Las bacterias tienen la capacidad de producir enzimas como la desulfhidrasa y el tiosulfato reductasa, enzimas responsables de la producción de ácido sulfhídrico (McFaddin, 2013, pp. 192-206). El resultado de esta prueba se observa mediante la coloración de un anillo de color negro siendo positivo e indicando la presencia de estas enzimas. Se observó el crecimiento de la

bacteria y se presenci  una coloración negra en el medio de cultivo indicando que es positivo para la prueba de ácido sulfhídrico (Figura 4d).

El almidón es un carbohidrato el cual es degradado por medio de enzimas, específicamente las amilasas. Se realizó la prueba del almidón con la finalidad de presenciar la capacidad de la bacteria para hidrolizar el almidón mediante la producción de amilasas (McFaddin, 2013, pp. 385-397). En la bacteria estudiada se observó un resultado negativo ya que no hubo formación de halos por lo tanto el medio de cultivo se tornó de color verde. Al no existir halos en el medio de cultivo se determinó que la bacteria no posee las enzimas necesarias para descomponer el almidón (Figura 5a).

Además, se realizaron pruebas más generales para la identificación de la bacteria como son las pruebas de catalasa, oxidasa y una tinción Gram. La catalasa es una enzima que generalmente poseen las bacterias de carácter aeróbicas. En la prueba de catalasa el resultado se interpreta por medio de la formación de burbujas al colocar peróxido de hidrógeno, esto indica que la bacteria produce catalasa internamente (McFaddin, 2013, pp. 72-94). La bacteria empleada dió como resultado positivo ya que se pudo presenciar burbujas al momento de colocar peróxido de hidrógeno. La presencia de esta enzima cataliza la reacción enzimática de la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Figura 5b).

La prueba de oxidasa tiene como finalidad identificar la presencia de enzimas de tipo oxidasas en bacterias. La enzima citocromo C cuando se encuentra en presencia de oxígeno oxida el agente externo que se añade, el cual es el oxalato de dimetil-para-fenilendiamina formando un compuesto coloreado denominado indofenol (McFaddin, 2013, pp. 72-94). La bacteria empleada no tiene la capacidad de oxidar este compuesto ya que no hubo cambio de

coloración, indicando que la bacteria no produce citocromo C oxidasa (Figura 5c).

Se realizó una tinción Gram de la bacteria, es una técnica que permite la identificación morfológica de la bacteria empleada mediante un cambio de coloración. Se considera bacterias Gram negativas a bacterias que presenten coloración rosada mientras que se toma como bacterias Gram positivas las que presenten una coloración morada. Se añaden compuestos específicos para esta coloración, el cristal violeta se añade al frotis bacteriano con la finalidad de colorear las células bacterianas, el lugol ayuda a que el cristal violeta se fije en la muestra de células y formar un complejo soluble entre iodo y el colorante, el alcohol cetona decolora las bacterias Gram negativas no obstante esto no ocurre con las células Gram positivas. Finalmente se añade safranina para colorear las células ya sean de color rosado o morado. La bacteria objeto de estudio fue Gram negativa y se pudo observar la morfología de la bacteria dando como resultado bacilos pequeños (Rodríguez, Gamboa, Hernández & García, 1994, pp. 55-63) (Figura 5d).

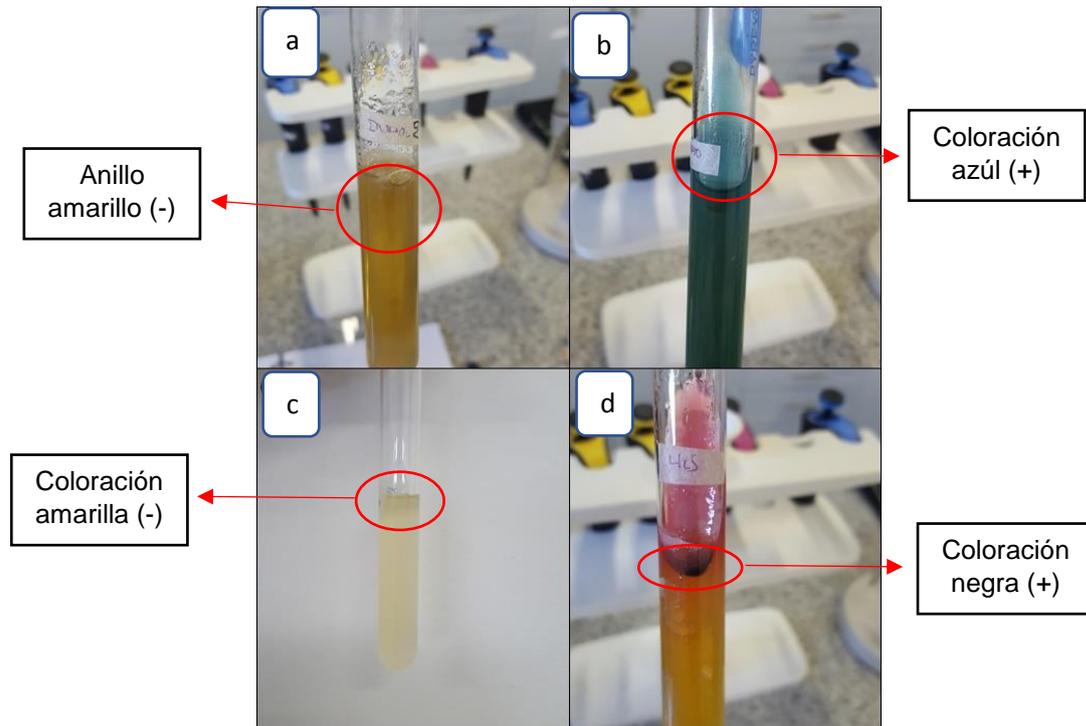


Figura 4. Pruebas bioquímicas para la identificación de una bacteria productora de Biosurfactantes.

- a) Prueba del indol: Anillo rojo (+); anillo amarillo o incoloro (-)
- b) Prueba de citrato Simmon´s: Azul (+); Verde (-)
- c) Prueba rojo de metilo: Rojo (+); Amarillo (-)
- d) Prueba de producción de H₂S: Coloración negra (+); Incoloro (-)

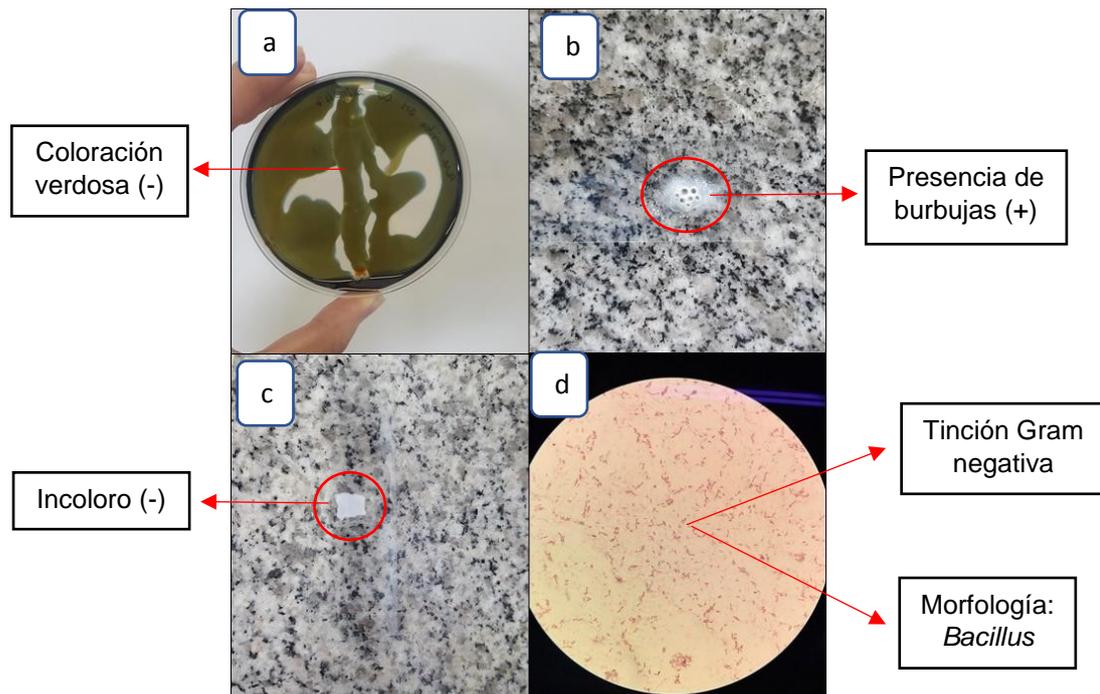


Figura 5. Pruebas bioquímicas y tinción Gram de la bacteria productora de Biosurfactantes.

- a) Prueba de almidón: Coloración verdosa (-), Presencia de halos (+)
- b) Prueba de catalasa: Formación de burbujas (+)
- c) Prueba de oxidasa: Coloración morada (+); incoloro (-)
- d) Tinción Gram (100X)

De acuerdo a las pruebas bioquímicas realizadas se pudo determinar que la bacteria empleada corresponde al género *Stenotrophomonas*. Se pudo corroborar estos resultados con otros estudios que han realizado diversas pruebas bioquímicas para la identificación de la bacteria *Stenotrophomonas*, en donde se demuestra la similitud en todas las pruebas bioquímicas aplicadas en este trabajo (Tabla 4).

Tabla 4.

Pruebas bioquímicas y tipos de fuentes de carbono para la bacteria Stenotrophomonas maltophilia.

Test	Result	Test	Result
Grams character	-ve short rods	Utilization of carbon sources	
Endospore formation	- ^a	Galactose	-
Oxidase	-	Mannitol	+
Catalase	+ ^b	Mannose	-
Growth at		Rhamnose	+
5 °C	-	Salicin	+
20 °C	+	Sorbitol	-
37 °C	+	Trehalose	+
Lysine decarboxylase	+	Dextrose	+
Indole	-	Inositol	+
Methyl red	-	Inulin	-
H ₂ S	+	Xylose	-
Nitrate reduction	+	Lactose	-
Citrate	+	Maltose	+
Phenyl alanine deaminase	-	Fructose	+
Hydrolysis of,		Dulcitol	-
Esculin	+	Cellobiose	+
Gelatin	+	Arabinose	-
Starch	-	Adonitol	-
Urea	-	Sucrose	+

^a Negative.
^b Positive.

Tomado de (Hemlata, 2015).

4.2 Selección de la mejor fuente de carbono

La fuente de carbono es uno de los elementos esenciales en torno a la producción de Biosurfactantes. Es importante determinar que fuente de carbono es la ideal para que la producción de Biosurfactantes se maximice. Se realizó un análisis de las dos fuentes de carbono para la producción de Biosurfactantes: melaza y aceite de soya.

En el medio de cultivo donde se usó melaza se observó que el tratamiento 2, correspondiente a una concentración de 0,5% (v/v) tuvo la mayor producción de Biosurfactantes con un total de 0,0563 g/mL y se obtuvo una probabilidad de $9,43E^{-06}$ entre los diversos experimentos. Se utilizó un intervalo de confianza del 95% por lo tanto al ser el valor p un valor menor a 0,05 se acepta la hipótesis alternativa y se rechaza la hipótesis nula. Si existió una diferencia significativa entre tratamientos (Figura 6a).

En el medio de cultivo donde se evaluó el aceite de soya como fuente de carbono se determinó que el tratamiento 3 correspondiente a 3,5% (v/v) de aceite de soya fue el mejor para la producción de los Biosurfactantes, con un valor de 0,0679 g/mL y se obtuvo una probabilidad de $3,73E^{-05}$ entre tratamientos. Se utilizó un intervalo de confianza del 95% por lo tanto al ser el valor p un valor menor a 0,05 se acepta la hipótesis alternativa y se rechaza la hipótesis nula. Si existió una diferencia significativa entre los diversos tratamientos (Figura 6b).

Se determinó que la mejor fuente de carbono para la producción de los Biosurfactantes es el aceite de soya.

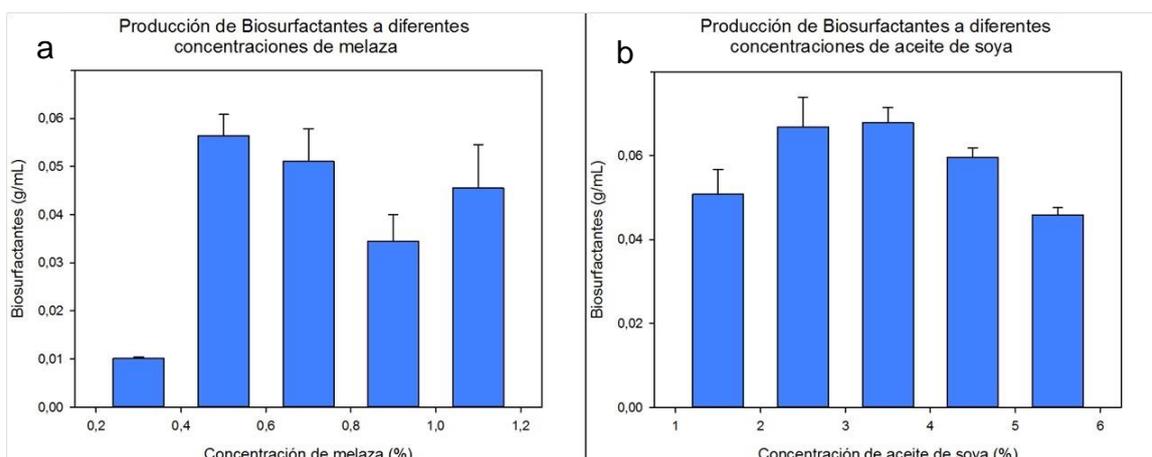


Figura 6. Evaluación de melaza y aceite de soya como fuentes de carbono en el crecimiento de *Stenotrophomonas* para la producción de Biosurfactantes.

a) Melaza: concentraciones de melaza al 0,3 %, 0,5%, 0,7%, 0,9% y 1,1 % del volumen total del medio de cultivo. Probabilidad: $9,43E-06$

b) Aceite de soya: concentraciones de aceite de soya al 1,5%, 2,5%, 3,5%, 4,5% y 5,5% del volumen total del medio de cultivo. Probabilidad: $3,73E-05$

Se colocó una muestra de 100 μ L de los Biosurfactantes para cada tratamiento y se obtuvo la medida del halo de dispersión para la evaluación de la melaza como fuente de carbono. El tratamiento 2, correspondiente a 0,5% (v/v) de

melaza generó mayor longitud de dispersión con un total de 3,5 cm (Tabla 5 y Figura 7).

Igualmente, el medio de cultivo que contenía aceite de soya como fuente de carbono se realizó la técnica de comprobación para la obtención de Biosurfactantes. Se observó que el tratamiento 4, con una concentración correspondiente a 4,5% (v/v) de aceite de soya, generó mayor longitud de dispersión del petróleo. Sin embargo, los tratamientos 2 y 3 con una concentración de 2,5 % y 3,5% de aceite de soya respectivamente presentaron una cantidad de dispersión similar al tratamiento 4 y ocurrió la formación de agregados lo que indica que el Biosurfactante tiene la capacidad de volver al petróleo más biodisponible para su posterior degradación (Tabla 5 y Figura 8).

Tabla 5.

Desplazamiento del contaminante utilizando Biosurfactantes proveniente de la bacteria Stenotrophomonas cuando se emplea melaza y aceite de soya como fuente de carbono.

Concentración de melaza (v/v)	Melaza			Concentración de aceite de soya (v/v)	Aceite de soya		
	Control (cm)	Halo de desplazamiento (cm)	Diferencia (cm)		Control (cm)	Halo de desplazamiento (cm)	Diferencia (cm)
0,30%	1,5	2,5	1,0	1,50%	4,0	8,0	4,0
0,50%	1,5	5,0	3,5	2,50%	2,0	9,0	7,0
0,70%	2,5	5,0	2,5	3,50%	2,0	9,3	7,3
0,90%	2,0	3,5	1,5	4,50%	1,0	9,0	8,0
1,10%	1,5	3,0	1,5	5,50%	1,0	8,5	7,5

Nota: Grupo control, muestra aplicada antes de la producción de Biosurfactantes

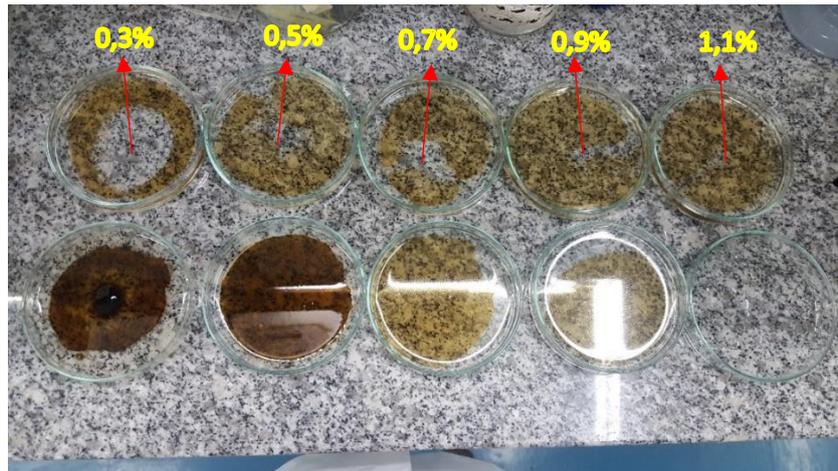


Figura 7. Test de desplazamiento del contaminante mediante la aplicación de los Biosurfactantes de *Stenotrophomonas* empleando melaza como fuente de carbono.

Fila superior: tratamientos de acuerdo a la tabla 5

Fila inferior: Grupo control

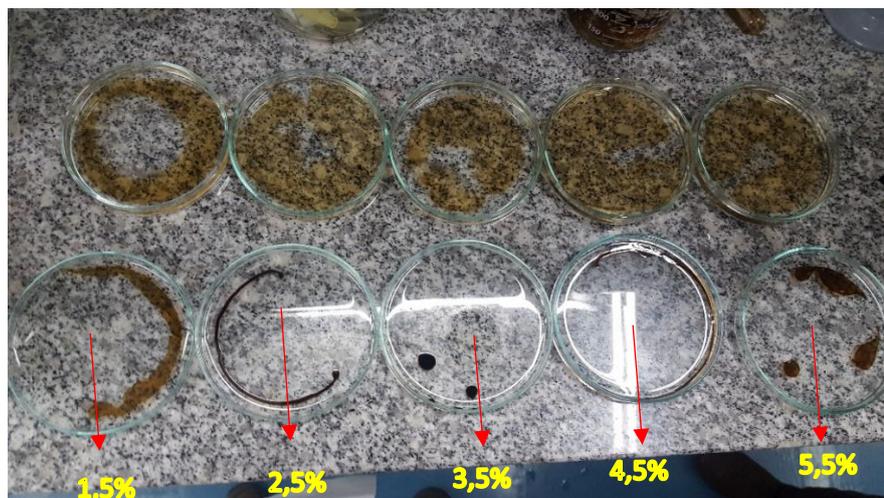


Figura 8. Test de desplazamiento del contaminante mediante la aplicación de los Biosurfactantes de *Stenotrophomonas* empleando aceite de soya como fuente de carbono

Fila superior: grupo control

Fila inferior: tratamientos 1 - 5 de acuerdo a la tabla 5.

Tratamiento 2 (2,5% v/v) y 3 (3,5% v/v): formación de agregados en superficie con petróleo

La melaza es un residuo de la industria azucarera, con alto contenido de carbohidratos, lípidos y azúcares los cuales son fundamentales para la producción de los Biosurfactantes (Cameotra, 2002, pp. 428-434). Según Joshi et al. (2008, pp. 195-199) el uso de altas concentraciones de melaza inhibe la producción de Biosurfactantes, debido a que la composición de la melaza contiene diversas fuentes de azúcares en distinta concentración causando una saturación en el crecimiento bacteriano. Las concentraciones empleadas fueron bajas, para evitar la inhibición en la producción. Se obtuvo una alta producción de Biosurfactantes y se evaluó la presencia de los Biosurfactantes mediante el test de desplazamiento del contaminante empleando melaza como única fuente de carbono. Sin embargo, el halo de desplazamiento del petróleo empleando melaza fue inferior al halo de desplazamiento utilizando aceite de soya, debido a la hidrofobicidad del aceite en agua. La bacteria *Stenotrophomonas* posee la habilidad de producir Biosurfactantes empleando melaza como fuente de energía.

Por otra parte, se conoce que la composición de la melaza es altamente enriquecida con nutrientes, nitrógeno y azúcares lo que permite que el microorganismo metabolice estos compuestos y produzca Biosurfactantes. En otros estudios donde se utilizó melaza como fuente de carbono para la producción de Biosurfactantes, la cepa empleada fue *Bacillus subtilis*. En estos estudios determinaron que la melaza es un residuo muy útil para la producción y obtuvieron resultados que indican que *Bacillus subtilis* puede tener afinidad a bajas concentraciones de melaza o a su vez verse inhibida en altas concentraciones por la cantidad de azúcares disponibles. Cuando se emplea la bacteria del género *Stenotrophomonas*, la concentración de melaza debe ser baja para que la bacteria tenga la capacidad metabólica de utilizar este sustrato. El metabolismo de este sustrato puede variar en función al microorganismo empleado para la producción de los Biosurfactantes.

Los aceites son muy utilizados como sustratos para la producción de Biosurfactantes. Así lo describe Haba, Espuny, Busquets, & Manresa (2000, pp. 379–387). Este tipo de sustrato ha sido empleado por varios microorganismos para la producción de Biosurfactantes debido a la fácil adquisición del sustrato y el aprovechamiento de residuos oleicos que existen en la industria.

Abouseoud, Maachi, Amrane, Boudergua, & Nabi (2008, pp. 143-151) utilizaron 3 fuentes de carbono: el aceite de oliva, el hexadecano y la glucosa en *Pseudomonas fluorescens* y determinaron que la mejor fuente de carbono para este microorganismo fue el aceite de oliva. Filogenéticamente los géneros *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* tienen características similares, por lo tanto, en este trabajo la bacteria del género *Stenotrophomonas* utilizó aceite de soya como fuente de carbono. Ambas bacterias son capaces de metabolizar sustratos de difícil asimilación como aceites y contaminantes. Se ha determinado que cuando se utiliza fuentes de carbono de carácter hidrofóbico la producción de Biosurfactantes se ve aumentada, ya que la bacteria se ve obligada a realizar su crecimiento en un medio de cultivo similar al ambiente contaminado (Gargouri, Contreras, Ammar, Segura-Carretero, & Bouaziz, 2017, pp. 3769-3779).

Singh et al. (2015, pp. 42-47) estudiaron la producción de Biosurfactantes a partir de *Stenotrophomonas maltophilia* utilizando pireno como fuente de carbono. La producción de Biosurfactantes fue de 2.2 g/L. Patil, Aglave, Pethkar, & Gaikwad (2012, pp. 5173–5178) utilizaron dos fuentes de carbono (glucosa y manitol), siendo la glucosa el mejor sustrato para la producción de Biosurfactantes a partir de *Stenotrophomonas koorensis*. En este trabajo se utilizó aceite de soya como fuente de carbono para el género *Stenotrophomonas* y se obtuvo una producción de 1,13 g/L. Existe una diferencia significativa en torno a la producción de Biosurfactantes debido a las siguientes razones: el tipo de bacteria que se emplea, ya que cada una es

diferente tanto en especie como en el tipo de cepa, la procedencia de la bacteria y el tipo de aceite utilizado. En estudios de Singh y Patil la bacteria empleada es originaria de sitios con gran cantidad de contaminantes, por lo tanto, la adaptación de la bacteria a sustratos de difícil asimilación como el aceite es más fácil y su metabolismo interno induce a una producción mayor de Biosurfactantes.

4.3 Selección de la mejor fuente de nitrógeno

La fuente de nitrógeno es otro de los componentes del medio que necesita ser estudiado. Existen un sin número de fuentes de nitrógeno que en algunos casos los microorganismos no los pueden sintetizar. De ahí la importancia de seleccionar una fuente idónea para la producción de Biosurfactantes.

Para determinar la mejor fuente de nitrógeno en el crecimiento de *Stenotrophomonas* y la posterior producción de Biosurfactantes, se estudiaron 3 fuentes diferentes de nitrógeno. Estas son: sulfato de amonio, nitrato de potasio y peptona.

En este experimento se mantuvo constante la concentración de aceite de soya como fuente de carbono, la misma que se obtuvo del experimento anterior. La concentración de aceite de soya en el medio de cultivo fue de 3,5 % (v/v). En el experimento donde se utilizó sulfato de amonio en concentración de 1 g/L dio como resultado una producción máxima de Biosurfactantes con un total de 0,55 g/L y se obtuvo una probabilidad de $4,96E^{-07}$ entre los diferentes tratamientos. Se utilizó un intervalo de confianza del 95% y al ser el valor p un valor menor a 0,05 se acepta la hipótesis alternativa y se rechaza la hipótesis nula. Si existió una diferencia significativa entre tratamientos (Figura 9a).

En el medio de cultivo con nitrato de potasio en una concentración de 1 g/L se observó que la producción de Biosurfactantes alcanzó un valor de 1,37 g/L y se obtuvo una probabilidad entre tratamientos de 0,000166 lo que indica una diferencia significativa entre cada una de las concentraciones evaluadas en este experimento. El intervalo de confianza fue del 95%, y se utilizó el valor p para identificar que hipótesis se acepta. Se aceptó la hipótesis alternativa, lo que indica que efectivamente si hay diferencias entre cada uno de los tratamientos estudiados (Figura 9b).

Finalmente se realizó un experimento en donde se varió las concentraciones de peptona en el medio de cultivo y se determinó que la concentración de 1 g/L correspondiente al tratamiento 2 fue el mejor. La producción de Biosurfactantes fue de 1,4 g/L y se obtuvo una probabilidad entre tratamientos del experimento de 0,000430. Este valor indica que si existió una diferencia significativa en el empleo de diversas concentraciones de peptona. Además, la desviación estándar de cada uno de los tratamientos fue baja asegurando la reproducibilidad de los resultados obtenidos (Figura 9c).

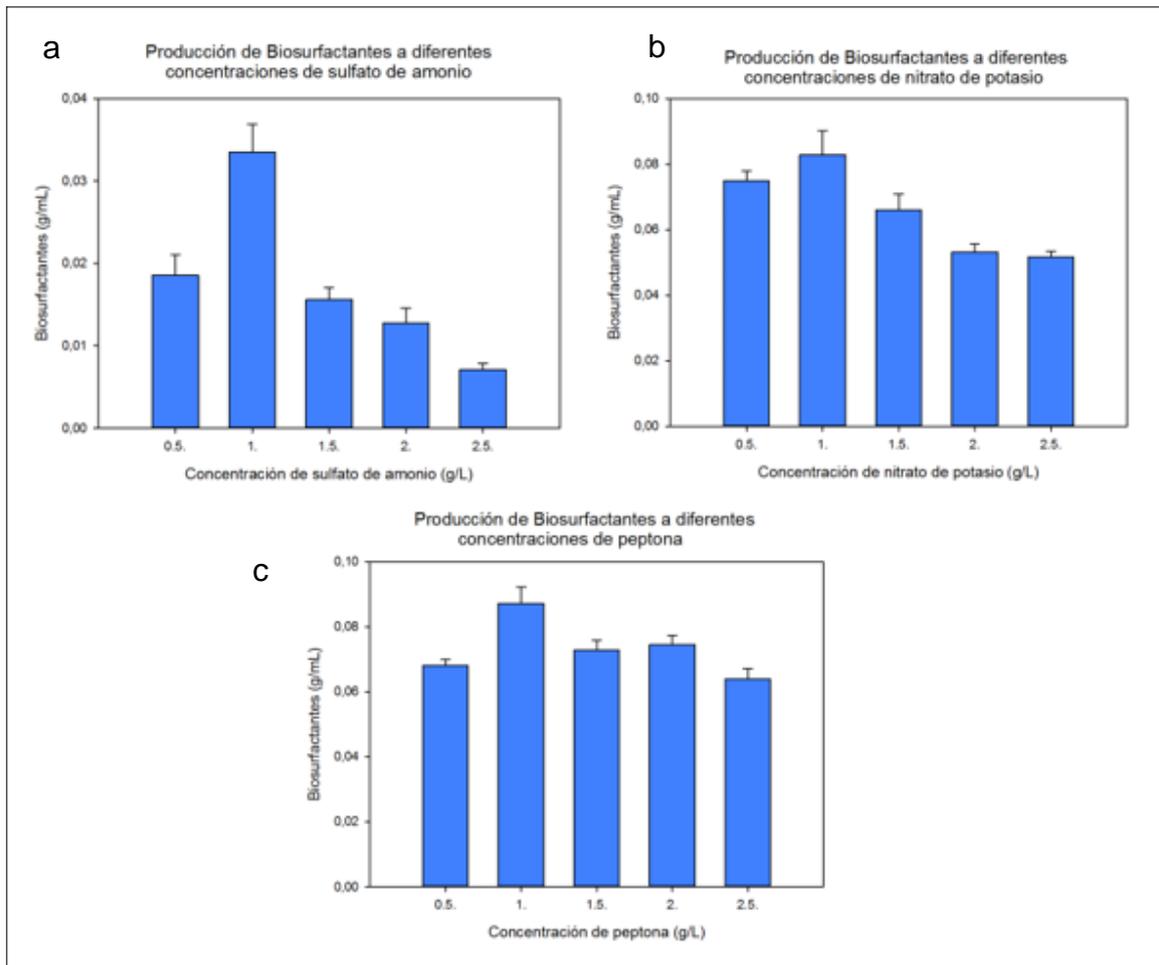


Figura 9. Evaluación de fuentes de nitrógeno en la producción de Biosurfactantes a partir de una bacteria del género *Stenotrophomonas*

a) Sulfato de amonio: Concentraciones de sulfato de amonio de 0,5 g/L, 1 g/L, 1,5 g/L, 2 g/L y 2,5 g/L. Volumen total del medio 60 ml. Valor p: 4,96E-07

b) Nitrato de potasio: Concentraciones de nitrato de potasio de 0,5 g/L, 1 g/L, 1,5 g/L, 2 g/L y 2,5 g/L. Volumen total del medio 60 ml. Valor p: 0,000166

c) Peptona: Concentraciones de peptona de 0,5 g/L, 1 g/L, 1,5 g/L, 2 g/L y 2,5 g/L. Volumen total del medio 60 ml. Valor p: 0,000430

Para la fuente de nitrógeno se realizó el mismo test de desplazamiento del contaminante para el sulfato de amonio, el nitrato de potasio y la peptona. En los medios de cultivo donde se evaluó diferentes concentraciones de sulfato de amonio se observó que la dispersión del petróleo fue mayor en el tratamiento 1 correspondiente a una concentración de 0,5 g/L. La longitud del halo de desplazamiento del petróleo fue de 3,2 cm (Tabla 6 y Figura 10).

Para la evaluación del nitrato de potasio como fuente de nitrógeno se evidenció que el tratamiento 1 correspondiente a una concentración de 0,5 g/L fue el mejor. Se observó mayor dispersión del petróleo al colocar los Biosurfactantes y se obtuvo un total de 5,1 cm de dispersión. Existió formación de agregados en el mismo tratamiento tal como se muestra en la figura 11, indicando que los Biosurfactantes efectivamente vuelven al contaminante más biodisponible (Tabla 6).

Para comprobar la producción de Biosurfactantes en el medio de cultivo que contenía peptona como fuente de nitrógeno se aplicó la prueba de desplazamiento del contaminante en donde dio como resultado que en los tratamientos 1 y 2 correspondientes a concentraciones de 0,5 y 1 g/L respectivamente formaron agregados en la superficie contaminada. Esto indica el efecto del Biosurfactante en presencia de una superficie contaminada con petróleo (Tabla 6 y Figura 12).

Tabla 6.

Desplazamiento del contaminante utilizando Biosurfactantes proveniente de la bacteria Stenotrophomonas cuando se emplea sulfato de amonio, nitrato de potasio y peptona como fuente de nitrógeno.

Sulfato de amonio				Nitrato de potasio			
Concentración de sulfato de amonio (g/L)	Control (cm)	Halo de desplazamiento (cm)	Diferencia (cm)	Concentración de nitrato de potasio (g/L)	Control (cm)	Halo de desplazamiento (cm)	Diferencia (cm)
0,5	4,0	7,2	3,2	1,0	3,0	8,1	5,1
1,0	6,0	7,0	1,0	2,0	3,5	8,0	4,6
1,5	6,0	8,0	2,0	3,0	3,0	8,0	5,0
2,0	6,0	8,5	2,5	4,0	2,0	6,0	4,0
2,5	5,0	8,0	3,0	5,0	1,0	6,0	5,0
Peptona							
Concentración de peptona (g/L)	Control (cm)	Halo de desplazamiento (cm)	Diferencia (cm)				
1,0	2,0	7,5	5,5				
2,0	2,0	7,0	5,0				
3,0	2,0	7,5	5,5				
4,0	3,0	7,0	4,0				
5,0	4,5	8,0	3,5				

Nota: Grupo control, muestra aplicada antes de la producción de Biosurfactantes

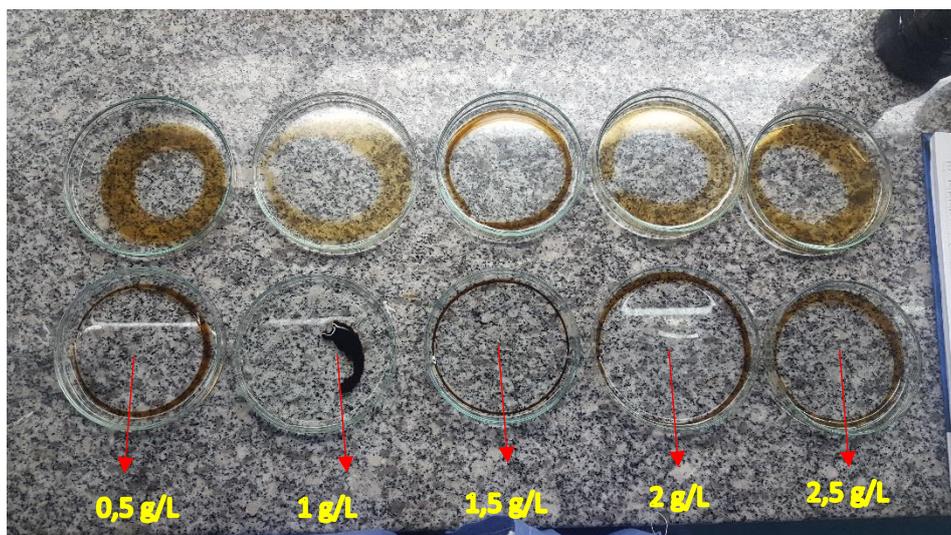


Figura 10. Test de desplazamiento del contaminante mediante la aplicación de los Biosurfactantes de *Stenotrophomonas* empleando aceite de soya como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

Fila superior: Grupo control

Fila inferior: Tratamientos 1-5 de acuerdo a la tabla 7

Tratamiento 2 (1 g/L): Formación de agregados en superficie con petróleo

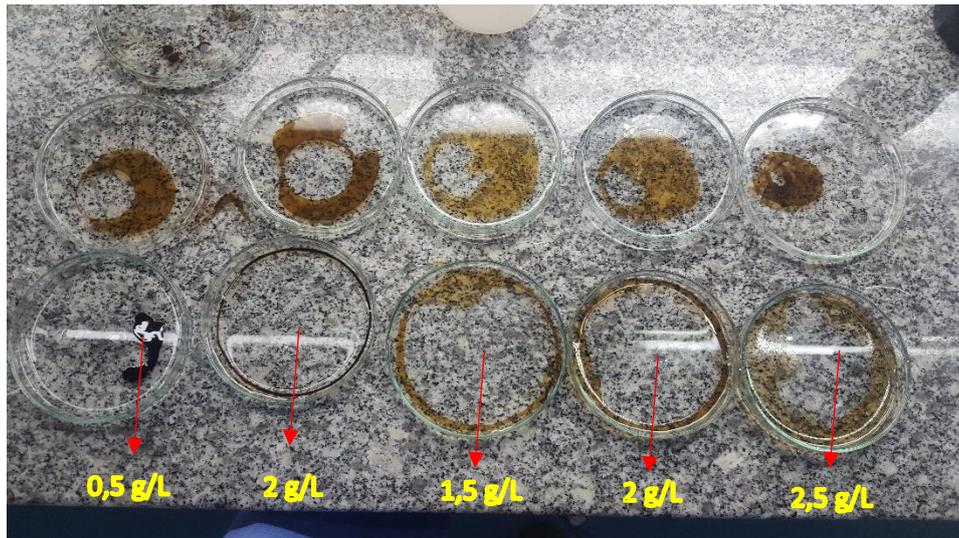


Figura 11. Test de desplazamiento del contaminante mediante la aplicación de los Biosurfactantes de *Stenotrophomonas* empleando aceite de soja como fuente de carbono y nitrato de potasio como fuente de nitrógeno.

Fila superior: Grupo control

Fila inferior: Tratamientos 1-5 de acuerdo a la tabla 7

Tratamiento 1 (0,5 g/L): Formación de agregados en superficie con petróleo

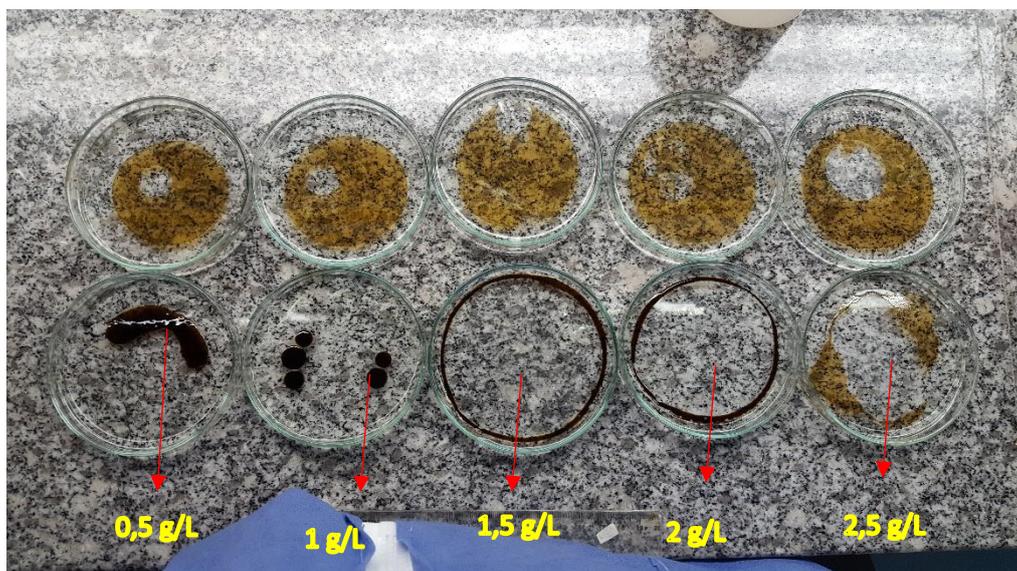


Figura 12. Test de desplazamiento del contaminante mediante la aplicación de los Biosurfactantes de *Stenotrophomonas* empleando aceite de soja como fuente de carbono y peptona como fuente de nitrógeno.

Fila superior: Grupo control

Fila inferior: Tratamientos 1 -5 de acuerdo a la tabla 5 (izq. a der.)

Tratamiento 1 (0,5 g/L) y tratamiento 2 (1 g/L): Formación de agregados en superficie con petróleo

El empleo de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno no fue el ideal tanto para la masificación del medio de cultivo como para la producción de Biosurfactantes esto se debe a que el sulfato de amonio hace que el medio cambie su pH a 4 y por ende se de una menor producción de los Biosurfactantes a pH ácido, considerando que el pH óptimo de producción es de 7 (Abouseoud, Maachi, Amrane, Boudergua, & Nabi, 2008, pp. 143-151).

Al emplear nitrato de potasio como fuente de nitrógeno, sucedió lo contrario que al usar sulfato de amonio, la producción de Biosurfactantes aumentó notablemente ya que el pH se mantuvo en 7. Según Makkar et al. (2011, pp. 1-5) la adición de nitrógeno en forma de nitratos es una buena alternativa para la asimilación de nitrógeno en el metabolismo de bacterias productoras de Biosurfactantes. Se ha registrado un valor de 1,45 g/L de Biosurfactantes utilizando nitrato de sodio y nitrato de amonio, similar al obtenido en este trabajo (1,37 g/L) cuando se empleó nitrato de potasio.

Según Hemlata et al. (2015, pp. 135-143) y Korayem, Abdelhafez, Zaki, & Saleh (2015, pp. 209-217) el uso de peptona como fuente de nitrógeno dio buenos resultados en la producción de Biosurfactantes en una concentración de 1 g/L. En todas las fuentes de nitrógeno estudiadas en este trabajo se observó un incremento en la producción de Biosurfactantes cuando se utilizaron concentraciones bajas de nitrógeno, lo que indica que la limitación de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo favorece a la producción de Biosurfactantes.

En la prueba cualitativa para la identificación del Biosurfactante y su modo de acción en una superficie contaminada se pudo observar que tanto en el uso de sulfato de amonio, el nitrato de potasio y la peptona a bajas concentraciones produjo un halo de desplazamiento mucho mayor que en los tratamientos que contenían altas concentraciones de nitrógeno.

La producción de Biosurfactantes en la prueba cuantitativa en concentraciones altas de nitrógeno disminuyó en los tres experimentos planteados. Esta disminución en la producción de Biosurfactantes se debe a que durante la biosíntesis de los Biosurfactantes ocurre la síntesis de lípidos mas no la síntesis de azúcares, siendo este el factor limitante de la velocidad. La limitación de nitrógeno puede estimular la acumulación de lípidos y por lo tanto la producción de Biosurfactantes (Hemlata et al., 2015, pp. 135-143).

4.4 Cultivo de *Stenotrophomonas* y elaboración de la curva de calibrado

Se realizó una curva de calibrado con la finalidad de obtener una curva que relacione la concentración de una muestra y transformar los datos de absorbancia a concentración celular. La curva de calibrado se elaboró mediante diluciones tomando en cuenta el inóculo, el cual se incubó por 24 horas y el medio estéril (Anexo 3). Se relacionó la absorbancia y la concentración celular de la bacteria para la elaboración de la curva de calibrado. Se obtuvo un R^2 de 0,9887 que indica que el 98% de mis datos se ajustan a la regresión lineal y la ecuación de la recta que describe la relación lineal entre ambos parámetros fue $y= 548,35x + 0,0366$ (Figura 13).

La curva de crecimiento se realizó con la finalidad de conocer la cinética del microorganismo y calcular los parámetros cinéticos de la bacteria del género *Stenotrophomonas*. La curva de crecimiento se realizó en un lapso de 32 horas para identificar las diferentes etapas de crecimiento: fase lag, fase exponencial y fase estacionaria y se calcularon los parámetros cinéticos: velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación. El medio de cultivo empleado fue utilizando aceite de soya como fuente de carbono en una concentración de 2,5 % (v/v) (Figura 14).

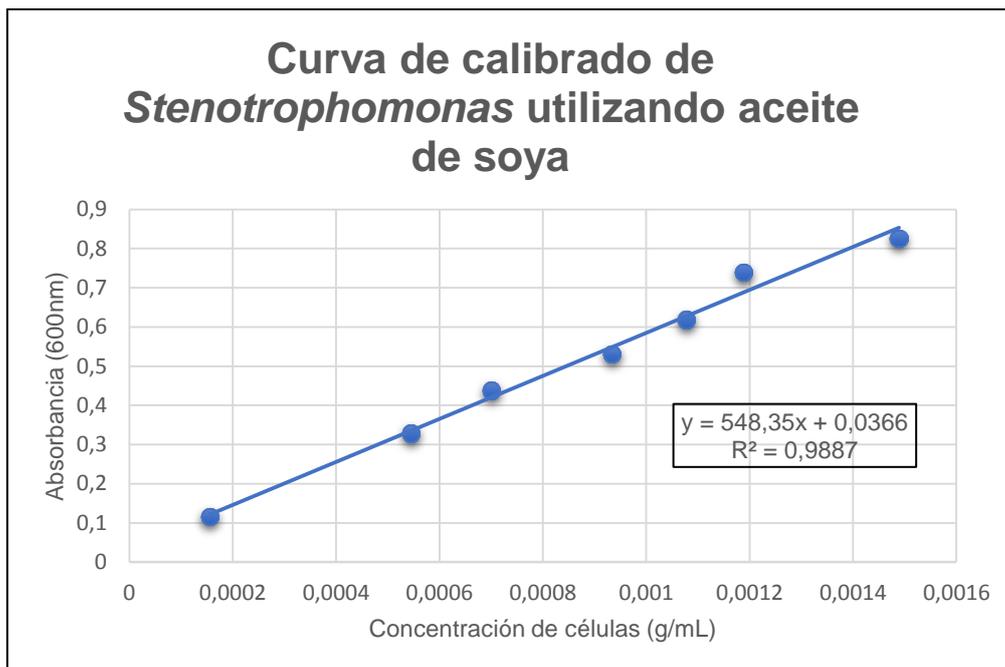


Figura 13. Curva de calibrado del género *Stenotrophomonas* utilizando aceite de soya.

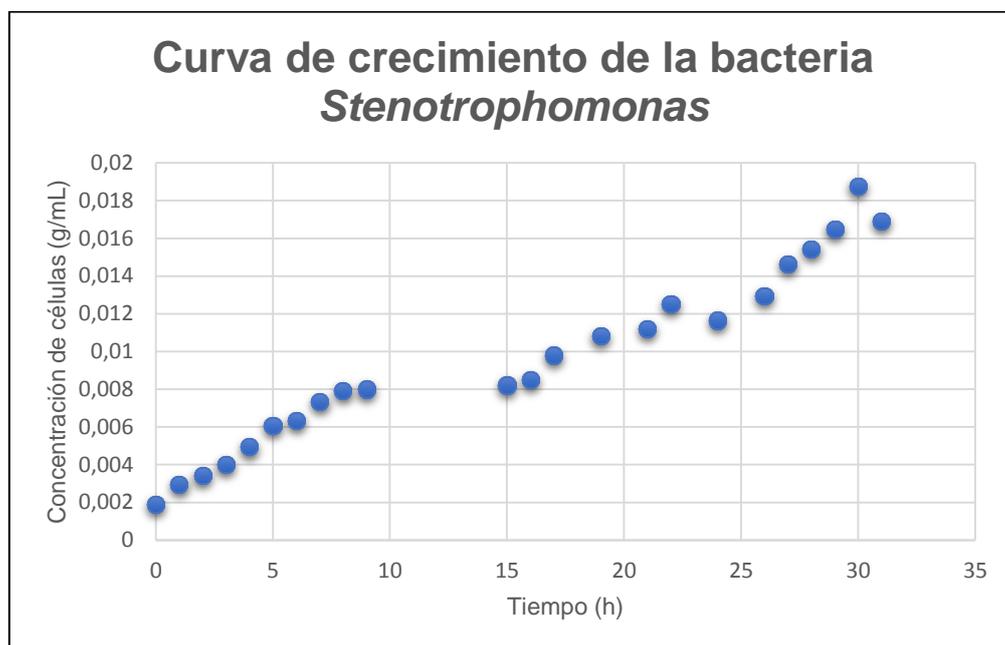


Figura 14. Curva de crecimiento de la bacteria del género *Stenotrophomonas* en aceite de soya como fuente de carbono

Los parámetros cinéticos fueron calculados mediante una linealización de los datos de la fase exponencial de crecimiento en donde se obtuvo una velocidad

específica de crecimiento de $0,0424 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo de duplicación de 16 horas aproximadamente. Estos valores se calcularon mediante las expresiones matemáticas que describen la velocidad específica de crecimiento del microorganismo (Ecuación 1) y el tiempo de duplicación (Ecuación 2); el cual define el tiempo en que la bacteria se duplica:

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

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

Según estudios de Jiménez (2013, pp. 1-11) la velocidad específica de crecimiento de la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* es de $0,069 \text{ h}^{-1}$ cuando se emplea residuos de biodiesel como fuente de carbono, lo que indica que el biodiesel al ser un contaminante recalcitrante retrasa el crecimiento de la bacteria.

Según estudios de Cervantes (2014, pp. 33-67) cuando la bacteria crece en contaminantes difíciles de metabolizar como la atrazina, la bacteria se demora más en crecer. No obstante, cuando el microorganismo es adaptado y aislado de zonas contaminadas el crecimiento se reduce a una velocidad específica de crecimiento de $0,31 \text{ h}^{-1}$. En el caso del aceite de soya la bacteria se demoró en metabolizar el sustrato y por ende se obtuvo una velocidad específica de crecimiento de $0,0424 \text{ h}^{-1}$ lo que nos indica que la bacteria se duplica en un tiempo de 16 horas. Un estudio realizado por Becerra nos lleva a la conclusión que estos sustratos no convencionales como el aceite y residuos de biodiesel son persistentes y por lo tanto retrasan el crecimiento de la bacteria. Sin embargo, cuando la bacteria se adapta al medio de cultivo la producción de Biosurfactantes aumenta.

4.5 Determinación de las variables influyentes en la producción de Biosurfactantes para la bacteria del género *Stenotrophomonas*

Para la identificación de las variables más influyentes en la producción de los Biosurfactantes se realizó un diseño factorial Plackett-Burman en el cual se evaluaron 11 factores. Estos factores se codificaron con valores máximos y mínimos (Ver metodología, epígrafe 3).

Para establecer las diferentes combinaciones de los tratamientos del diseño factorial, se utilizó una matriz con valores codificados. Estos tratamientos se realizaron por triplicado y completamente al azar (Ver metodología, epígrafe 3).

La evaluación de las variables relacionadas con las condiciones de cultivo del microorganismo para la producción de los Biosurfactantes se realizó de acuerdo al diseño factorial. Se evidenció una diferencia significativa entre los tratamientos, el valor F fue de 2,178 mientras que el valor f crítico del experimento fue de 0,864, por lo tanto, la hipótesis alternativa se acepta indicando que al menos un tratamiento es diferente. En el tratamiento 7 se obtuvo la mayor cantidad de los Biosurfactantes: 0,0980 g/mL, esto se debe a que este medio de cultivo está conformado por valores altos de aceite de soya 3,5 % (v/v), valores bajos de peptona (1g/L) y pH neutro (Figura 15).

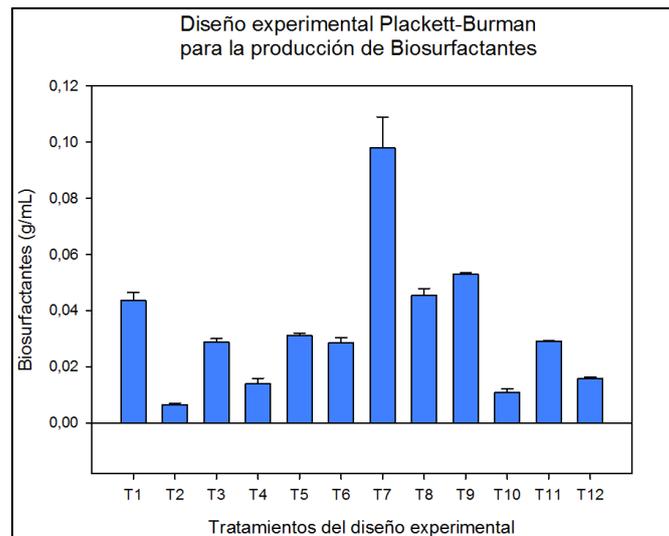


Figura 15. Producción de Biosurfactantes en cada uno de los tratamientos del diseño factorial Plackett-Burman.

T1-T12: Tratamientos elaborados de acuerdo a la matriz de combinaciones detallada en la metodología (Epígrafe 3).

Las variables con mayor influencia en la producción de Biosurfactantes se identificaron mediante un gráfico de Pareto. Estas fueron: la fuente de carbono, el sulfato de magnesio, el cloruro de sodio, el pH y la agitación (Figura 16).

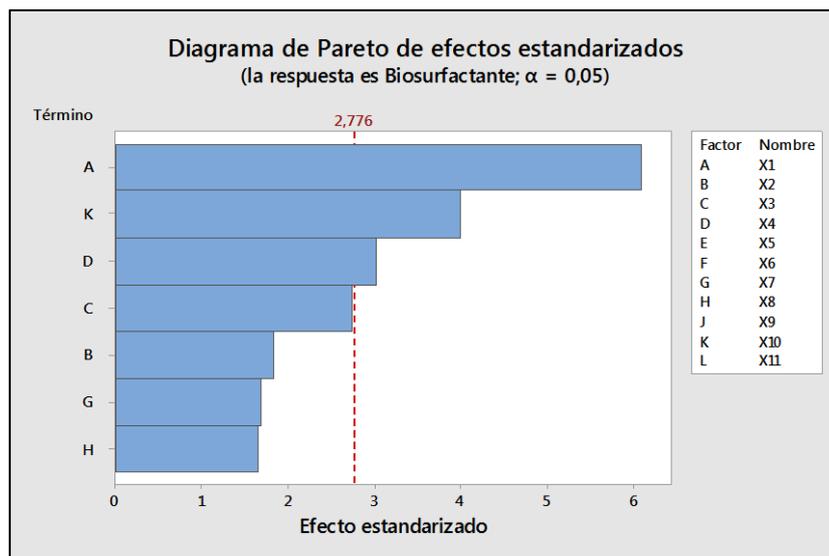


Figura 16. Diagrama de Pareto de efectos significativos de cada una de las variables planteadas por el diseño factorial Plackett-Burman.

Variables: A-Aceite de soya, B- Peptona, C-cloruro de sodio, D-sulfato de magnesio, E-sulfato de manganeso, F-sulfato de hierro, G-cloruro de calcio, H-sulfato de zinc, J-Temperatura, K-Agitación, L-pH

El aceite de soya resultó la variable con mayor influencia en la producción de Biosurfactantes (significancia de $p < 0,05$ y valor t de 2,776). Esto se debe a que el aceite de soya fue utilizado como única fuente de carbono y energía. Por lo tanto, la producción de los Biosurfactantes y crecimiento de la bacteria *Stenotrophomonas* dependen en alto porcentaje de este tipo de sustrato.

En estudios de otros autores (Mukherjee, Das, Sivapathasekaran, & Sen, 2008, pp. 254-260) y (Hassan, Essam, Yassin, & Salama, 2016, pp. 573-579) se ha determinado la producción de Biosurfactantes empleando diversos aceites como el de coco, el de soya y el de maíz. Moya Ramírez et al. (2015, pp. 231-236) lograron producir 0,878 g/L de Biosurfactantes a partir de *Pseudomonas* sp. en un medio de cultivo suplementado con aceites residuales en una concentración de 2% (v/v). En este estudio se empleó altas concentraciones de aceite 3,5 % (v/v) y se obtuvo una producción de 1,5 g/L de Biosurfactantes.

La fuente de carbono es el componente más importante y crítico en la producción de un metabolito, ya que este funciona como fuente de energía para el microorganismo (Doran, 1998, pp. 349-363).

El empleo de un sustrato hidrofóbico brinda una mayor producción de Biosurfactantes ya que la bacteria tiene la capacidad de adaptarse a un ambiente similar al contaminante. La fuente de carbono es el componente esencial para la producción de Biosurfactantes, y al usar aceite de soya esta producción se maximiza (Moya Ramírez et al., 2015, pp. 231-236).

El sulfato de magnesio es un macronutriente importante para la estabilidad de los ribosomas. En la producción de Biosurfactantes actúa como cofactor en algunas reacciones del metabolismo de la bacteria como es el caso de la glucólisis y el ciclo de Krebs; estos procesos son esenciales para la producción de Biosurfactantes dependiendo del tipo de sustrato que se emplee.

Según Mukherjee et al. (2008, pp. 254-260) y Pruthi & Cameotra (2003, pp. 65-68) en estudios realizados con *Bacillus subtilis*, el sulfato de magnesio resultó ser la segunda variable más influyente para la producción de Biosurfactantes, este componente aporta iones Mg^{+2} los cuales son cofactores enzimáticos para la producción de proteínas que inducen a la formación de Biosurfactantes. En este trabajo, al igual que en trabajos anteriores, la segunda variable más influyente fue el sulfato de magnesio lo que indica que este componente resultó ser esencial para la producción de Biosurfactantes.

Otra variable influyente fue el cloruro de sodio, esta sal es importante para la recuperación de los Biosurfactantes. Mediante la adición de este compuesto se puede elucidar la capacidad del tensoactivo para actuar en concentraciones altas o bajas de salinidad. Según Ikhwan et al. (2017, pp. 12-56) la producción

de ramnolípidos se maximiza en presencia de altas concentraciones de sal hasta un 10% de saturación. La bacteria empleada tiene la capacidad de tolerar ambientes extremos como el pH, la salinidad y la temperatura. Al no colocar en altas concentraciones una fuente de iones de K^+ el microorganismo se ve obligado a utilizar los iones de Na^+ para su metabolismo, por ende, en el diseño experimental se puede observar una influencia mínima en relación a otros compuestos que resultaron más significativos como el aceite de soya y el sulfato de magnesio en la producción de Biosurfactantes.

4.6 Diseño central compuesto utilizando aceite de soya y sulfato de magnesio

El diseño de superficie de respuesta se realizó con la finalidad de observar la relación entre el aceite de soya y el sulfato de magnesio para la producción de Biosurfactantes. Mediante este diseño se pudo determinar las concentraciones óptimas de cada una de las variables por medio de una regresión multivariable.

Una vez que se obtuvieron las variables influyentes para la producción de Biosurfactantes a partir de la bacteria *Stenotrophomonas* se procedió a realizar un diseño de superficie de respuesta con las variables significativas empleando todas las combinaciones posibles, tomando en cuenta únicamente las condiciones de cultivo; es decir el aceite de soya, el sulfato de magnesio y el cloruro de sodio.

Para el primer diseño de superficie de respuesta se tomaron como variables la fuente de carbono (aceite de soya) y el sulfato de magnesio y se se planteó el diseño como se indica en la Tabla 7. Estos valores codificados se obtuvieron mediante expresiones matemáticas del mismo diseño experimental las cuales se explicarán más adelante.

Tabla 7.

Concentraciones de aceite de soya y sulfato de magnesio empleadas para la optimización del medio de cultivo en el diseño de superficie de respuesta.

Valor codificado	Valores decodificados	
	Aceite de soya	Sulfato de magnesio
1.4	3.2%	0.92 g/L
1	3,0%	0.8 g/L
0	2.5%	0.5 g/L
-1	2,0%	0.2 g/L
-1.4	1.8%	0.08 g/L

Se realizó el diseño por triplicado y se aplicó una regresión multivariable de ambas variables y se elaboró un gráfico de superficie de respuesta que nos indica el valor máximo de producción cuando se toma en cuenta el aceite de soya y el sulfato de magnesio. Como resultado el valor óptimo de carbono fue 2.50 % del volumen total del medio de cultivo y de sulfato de magnesio fue 0.78 g/L (Figura 17).

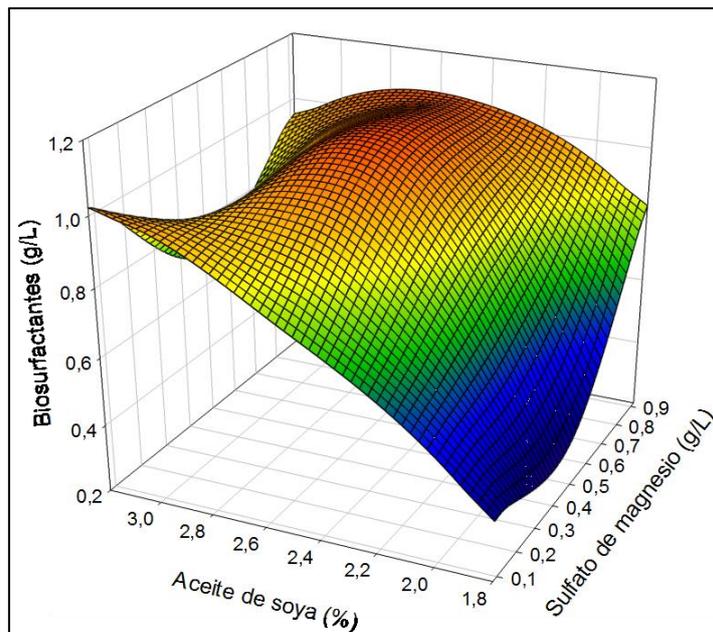


Figura 17. Diseño de superficie de respuesta de dos variables (aceite de soya y sulfato de magnesio) para la producción de los Biosurfactantes.

Máxima producción de Biosurfactantes expresado en color naranja con un promedio de 1-1.2 g/L.

Mínima producción de Biosurfactantes expresado en color azul con un promedio de 0-0.2 g/L.

Se realizó una regresión multivariable en la cual se obtuvo una ecuación de segundo orden que detalla la influencia de las variables X_1 y X_2 sobre la producción de Biosurfactantes. La ecuación fue la siguiente:

$$y = f + aX_1 + bX_2 + cX_1^2 + dX_2^2 + eX_1X_2 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde $f = 1.07$, $a = 0.13$, $b = 0.09$, $c = -0.254$, $d = -0.04$, $e = -0.06$, dichos coeficientes fueron obtenidos por medio de una regresión multivariable para la producción de los Biosurfactantes (g/L). Estos valores fueron determinados mediante la derivación parcial de la ecuación anterior en función de cada una de las variables estudiadas. Se obtuvo las siguientes ecuaciones después de la derivación:

$$\frac{\delta y}{\delta X_1} = 0,13 + 2 (0,254) X_1 + (-0,06) X_2 \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$\frac{\delta y}{\delta X_2} = 0,09 + 2 (-0,04) X_2 + (-0,06) X_1 \quad (\text{Ecuación 5})$$

Mediante las ecuaciones de cada una de las variables se obtuvieron valores codificados tanto para la variable X_1 como para la variable X_2 . Para obtener los valores óptimos reales fue necesario descodificar estos valores mediante las siguientes ecuaciones:

$$X_1 \text{ real} = (X_1 \text{ Codificado} * 0,5) + 2,5 \quad (\text{Ecuación 6})$$

$$X_2 \text{ real} = (X_2 \text{ Codificado} * 0,3) + 0,5 \quad (\text{Ecuación 7})$$

Una vez empleadas las fórmulas anteriores se obtuvo una concentración óptima de 2,5 % de aceite de soya como fuente de carbono y 0,78 g/L de sulfato de magnesio, donde la producción máxima de Biosurfactantes descrita por el modelo fue de 1,12 g/L. Experimentalmente el valor obtenido fue de 1,55 g/L. Este valor demuestra que la ecuación, efectivamente si describe la influencia de ambas variables sobre la producción de los Biosurfactantes.

En el diseño de superficie se evidenció que en los tratamientos correspondientes a los niveles 0 y +1 se obtuvo la mayor cantidad de Biosurfactantes. Esto indica que la bacteria produce una mayor cantidad de Biosurfactantes a concentraciones altas de aceite. Cuando se emplean concentraciones menores al 2% de aceite de soya conjuntamente con concentraciones inferiores al 0,5 g/L de sulfato de magnesio, la producción de Biosurfactantes es nula. Esto puede deberse a que la fuente de carbono se encuentra de manera insuficiente en el medio de cultivo por lo tanto la bacteria no posee la fuente de energía para continuar con su crecimiento y con su posterior producción de los Biosurfactantes.

Según Moya Ramírez et al. (2015, pp. 231-236) la concentración óptima de carbono utilizando aceite de oliva es 2% cuando se emplea una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* lo que indica una máxima producción de Biosurfactantes. En otros estudios Rita Cassia & Rufino (2013, pp. 137-141) utilizaron *Pseudomonas cepacia* y optimizaron las concentraciones de aceite residual donde se obtuvo una concentración óptima de 2,3%. Thaniyavarn et al.

(2006, pp. 215–222) utilizaron de igual manera una concentración de 2% de aceite vegetal utilizando *Pseudomonas aeruginosa*. En este trabajo utilizando aceite de soya como única fuente de carbono se obtuvo un valor óptimo de aceite de 2,5%. Cabe recalcar que en otros estudios no se ha utilizado aceite vegetal como fuente de carbono como variable de estudio cuando se emplea una cepa de *Stenotrophomonas maltophilia*. Hemlata et al. (2015, pp. 135-143) utilizaron aceite de soya como medio inductor para el medio de cultivo inicial para posteriormente evaluar la dextrosa como única fuente de carbono.

En estudios de (Makkar et al., 2011, pp. 1-5) la producción de Biosurfactantes se maximizó en concentraciones bajas de sulfato de magnesio (2,43mM) y se observó que a mayor cantidad de sulfato de magnesio en el medio de cultivo este inhibe la producción de los Biosurfactantes. En este estudio se identificó que en concentraciones de sulfato de magnesio extremadamente bajas (<0,2 g/L) y concentraciones muy altas (>0,9 g/L), la producción disminuye. La concentración óptima de sulfato de magnesio en la producción de Biosurfactantes fue de 0,78 g/L.

En los datos estadísticos del diseño de superficie de respuesta empleado en este trabajo se utilizaron 23 datos de un total de 27 con la finalidad de aumentar la confiabilidad de los datos del diseño experimental. Se obtuvo un r^2 de 0,8910. Este valor es aceptable para la elaboración del diseño de superficie de respuesta de segundo orden. El error del experimento fue 0,08 siendo un valor bajo para la evaluación de la respuesta de estudio. El valor f crítico de Fisher fue de $1,49E^{-08}$ y el valor de Fisher fue de 36,9710 lo que nos permite concluir que al ser menor el valor f crítico que el valor F se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa la que indica que al menos un tratamiento es diferente entre los demás.

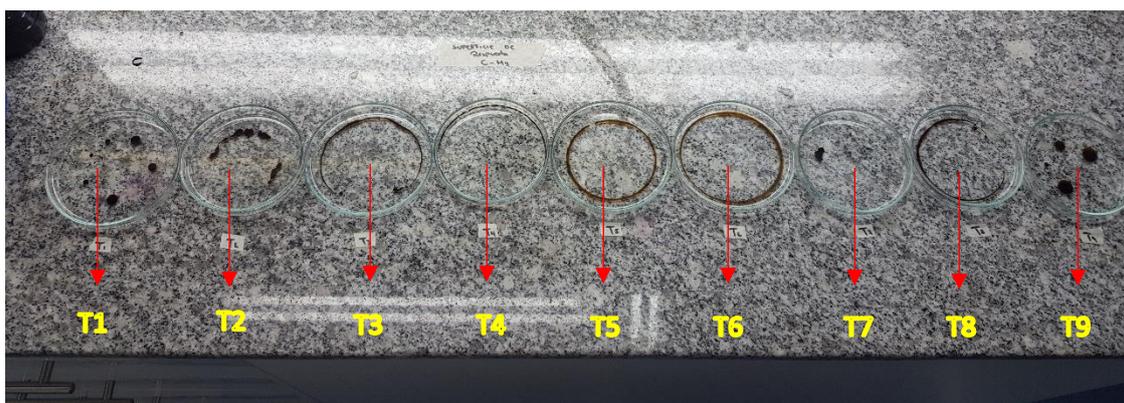
En este diseño de superficie de respuesta, utilizando dos variables: aceite de soya y sulfato de magnesio, se realizó la técnica de desplazamiento del contaminante colocando 100 μ L de Biosurfactantes en una superficie de petróleo y como resultado se observó una dispersión mayor del contaminante en los tratamientos 1, 2, 7 y 9 en los cuales se formó agregados de petróleo. Estos tratamientos corresponden a concentraciones altas de aceite (Tabla 8 y Figura 18).

Tabla 8.

*Desplazamiento del contaminante utilizando Biosurfactantes provenientes de la bacteria *Stenotrophomonas* en el diseño de superficie de respuesta utilizando aceite de soya y sulfato de magnesio como variables.*

Tratamiento	Control (cm)	Halo de desplazamiento (cm)	Total (cm)
1	2	Formación de agregados	-
2	2	Formación de agregados	-
3	2	7,5	5,5
4	2	9	7
5	2	7	5
6	2	8	6
7	2	Formación de agregados	-
8	2	7	5
9	2	Formación de agregados	-

Nota: grupo control se refiere a la muestra aplicada antes de la producción de los Biosurfactantes.



*Figura 18. Test de desplazamiento del contaminante mediante la aplicación de los Biosurfactantes de *Stenotrophomonas* en el diseño de superficie de respuesta empleando aceite de soya y sulfato de magnesio*

Tratamientos: 1-9 de acuerdo al diseño experimental (Anexo 2)

Tratamiento 1, 2, 7 y 9: formación de agregados en superficie con petróleo

Diseño central compuesto utilizando aceite de soya y cloruro de sodio.

El siguiente diseño de superficie de respuesta se realizó empleando dos variables significativas: la fuente de carbono y el cloruro de sodio. Se buscó las concentraciones óptimas para cada variable. Los valores utilizados fueron codificados tal y como se muestra en la Tabla 9. Se consideraron valores centrales para la fuente de carbono de 2,5 % del volumen total del medio y para el cloruro de sodio de 0,05 g/L.

Tabla 9.

Concentraciones de aceite de soya y cloruro de sodio empleadas para la optimización del medio de cultivo en el diseño de superficie de respuesta.

Valor codificado	Valores decodificados	
	Aceite de soya	Cloruro de sodio
1.4	3.9%	0.078 g/L
1	3.5%	0.070 g/L
0	2.5%	0.05g/L
-1	1.5%	0.03 g/L
-1.4	1.1%	0.022 g/L

Se aplicó una regresión multivariable con los datos correspondientes a la producción de los Biosurfactantes con todas las réplicas de cada uno de los tratamientos. Se elaboró un gráfico de superficie tomando en cuenta las dos variables de estudio: el aceite de soya y el cloruro de sodio. Se determinó que la concentración óptima de aceite de soya para la producción de los Biosurfactantes es de 2,48 % del volumen total del medio de cultivo; por su parte la concentración óptima de cloruro de sodio es de 0,055 g/L (Figura 19).

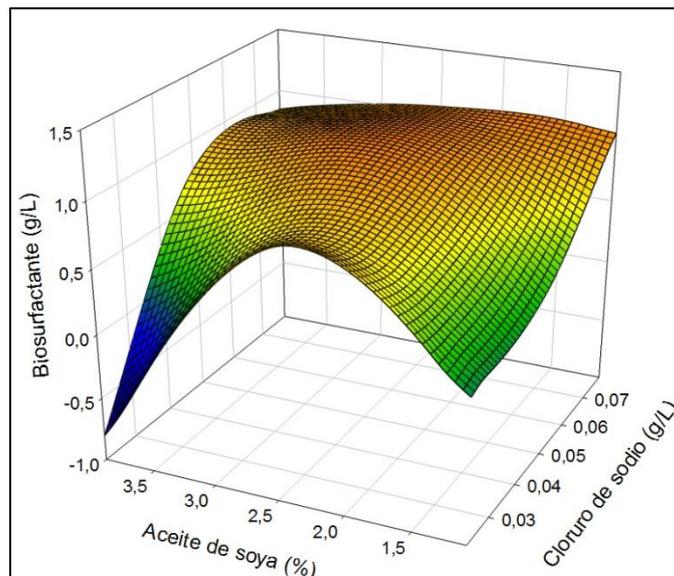


Figura 19. Diseño de superficie de respuesta de dos variables: aceite de soya y cloruro de sodio para la producción de los Biosurfactantes.

Máxima producción de Biosurfactantes expresado en color naranja con un rango de 0,9 -1,5 g/L.

Mínima producción de Biosurfactantes expresado en color azul con un rango de 0 -0,3 g/L.

Se realizó una regresión multivariable, en la cual se obtuvo una ecuación de segundo orden para identificar la influencia de las variables X_1 y X_2 sobre la producción de los Biosurfactantes. La ecuación fue la siguiente:

$$y = f + aX_1 + bX_2 + cX_1^2 + dX_2^2 + eX_1X_2 \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde los coeficientes: $f= 1.05$, $a= 0.019$, $b= 0.231$, $c= -0.316$, $d= -0.074$, $e= 0.10$, representan la producción de Biosurfactantes (g/L). Estos valores se obtuvieron mediante la derivación parcial de la ecuación anteriormente descrita, en función de cada una de las variables. Se obtuvieron las siguientes ecuaciones luego de realizar la derivación:

$$\frac{\delta y}{\delta X_1} = 0.019 + 2(-0.316)X_1 + (0.10)X_2 \quad (\text{Ecuación 9})$$

$$\frac{\delta y}{\delta X_2} = 0.231 + 2(-0.074)X_2 + (0.10)X_1 \quad (\text{Ecuación 10})$$

Mediante las ecuaciones de cada una de las variables se obtuvieron valores codificados tanto para la variable X_1 como para la variable X_2 . Para obtener los valores óptimos reales fue necesario descodificar estos valores mediante las siguientes ecuaciones:

$$X_1 \text{ real} = (X_1 \text{ Codificado} * 1) + 2.5 \quad (\text{Ecuación 11})$$

$$X_2 \text{ real} = (X_2 \text{ Codificado} * 0.02) + 0.05 \quad (\text{Ecuación 12})$$

Una vez empleadas las fórmulas anteriores, se obtuvo una concentración óptima de 2.48 % de aceite de soya y 0.055 g/L de cloruro de sodio. Con estos valores la producción máxima de los Biosurfactantes descrita por el modelo fue de 1.22 g/L. Experimentalmente el valor obtenido fue de 1.5 g/L. Se ha determinado que la ecuación efectivamente describe la influencia de ambas variables sobre la producción de los Biosurfactantes.

En el diseño de superficie anterior en el que se utilizó aceite de soya y sulfato de magnesio, se determinó que la concentración óptima de aceite de soya fue de 2,5% (v/v), valor muy cercano al obtenido en este diseño que fue de 2,48%.

El cloruro de sodio es una variable importante para observar la tolerancia de la bacteria para interactuar con el ambiente contaminado en condiciones extremas de salinidad. Se identificó una concentración adecuada para que la bacteria produzca Biosurfactantes, cabe recalcar que la tolerancia al estrés depende de la procedencia de la bacteria. Según Swapna, Papatoti, Khan, & Hameeda (2016, pp. 432-438) cuando utilizaron cepas aisladas de zonas marinas se observa que tienen la capacidad de tolerar condiciones extremas de salinidad de 4 al 8% de saturación en comparación a bacterias aisladas de suelos contaminados, siendo estas influyentes en la producción y calidad del Biosurfactante.

En el gráfico de superficie de respuesta se determinó que cuando la bacteria se encuentra en condiciones extremas de saturación con aceite de soya y bajas concentraciones de cloruro de sodio, la producción de los Biosurfactantes se inhibe. Esto ocurre porque el cloruro de sodio, al aportar iones Na^+ , tiene influencia sobre la concentración de aceite de soya para que este sea metabolizado por la bacteria *Stenotrophomonas* para la producción de Biosurfactantes.

En los datos estadísticos del diseño de superficie de respuesta se utilizaron 23 datos de un total de 27. Se obtuvo un r^2 de 0,7142 que es un valor aceptable para la elaboración del diseño de superficie de respuesta de segundo orden. El error del experimento fue 0.22, que es un valor bajo para la evaluación de la respuesta de estudio. El valor f crítico fue de 0,0004 y el valor F de 8,0066 lo que permite concluir que al ser menor el valor f crítico que el valor F se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, la que indica que al menos un tratamiento es diferente entre los demás.

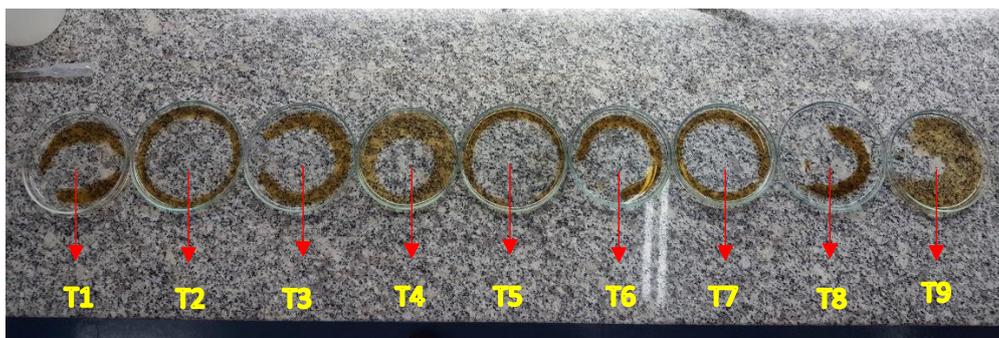
En la Tabla 10 se puede observar la longitud de dispersión del contaminante para el diseño de superficie cuando se emplea aceite de soya y cloruro de sodio como variables. No ocurrió la formación de agregados en este diseño experimental. Sin embargo, se observó con el tratamiento 2 una mayor dispersión del petróleo (Figura 20).

Tabla 10.

*Desplazamiento del contaminante utilizando Biosurfactantes proveniente de la bacteria *Stenotrophomonas* en el diseño de superficie de respuesta utilizando aceite de soya y cloruro de sodio como variables.*

Tratamiento	Control (cm)	Halo de desplazamiento (cm)	Total (cm)
1	2,0	7,0	5,0
2	2,0	8,0	6,0
3	2,0	6,0	4,0
4	2,0	5,0	3,0
5	2,0	7,5	5,5
6	2,0	6,0	4,0
7	2,0	7,0	5,0
8	2,0	7,0	5,0
9	2,0	4,0	2,0

Nota: grupo control se refiere a la muestra aplicada antes de la producción de los Biosurfactantes



*Figura 20. Test de desplazamiento del contaminante mediante la aplicación de los Biosurfactantes de *Stenotrophomonas* en el diseño de superficie de respuesta empleando aceite de soya y cloruro de sodio.*

Tratamientos: 1-9 de acuerdo al diseño experimental (Anexo 2).

Diseño central compuesto utilizando sulfato de magnesio y cloruro de sodio

Se realizó el último diseño de superficie tomando en cuentas las variables significativas obtenidas en el diseño experimental Plackett-Burman. Se tomó como variables al sulfato de magnesio y al cloruro de sodio. Se calcularon las diferentes concentraciones correspondientes a los valores codificados. Como punto de partida se determinaron los valores centrales de cada una de las variables de acuerdo a los diseños previamente elaborados: 0,5 g/L para el sulfato de magnesio y 0,05 g/L para el cloruro de sodio; este diseño experimental se realizó por triplicado. (Tabla 11).

Tabla 11.

Concentraciones de sulfato de magnesio y cloruro de sodio empleadas para la optimización del medio de cultivo en el diseño de superficie de respuesta.

Valor codificado	Valores decodificados	
	Sulfato de magnesio	Cloruro de sodio
1.4	0.92 g/L	0.078 g/L
1	0.8 g/L	0.070 g/L
0	0.5 g/L	0.05g/L
-1	0.2 g/L	0.03 g/L
-1.4	0.08 g/L	0.022 g/L

Se realizó una regresión multivariable teniendo en cuenta todas las réplicas de cada uno de los tratamientos. Se elaboró un gráfico de superficie de respuesta con ambas variables y se determinó que la concentración óptima de sulfato de magnesio es de 0,5868 g/L y para el cloruro de sodio la concentración ideal es de 0,06007 g/L (Figura 21).

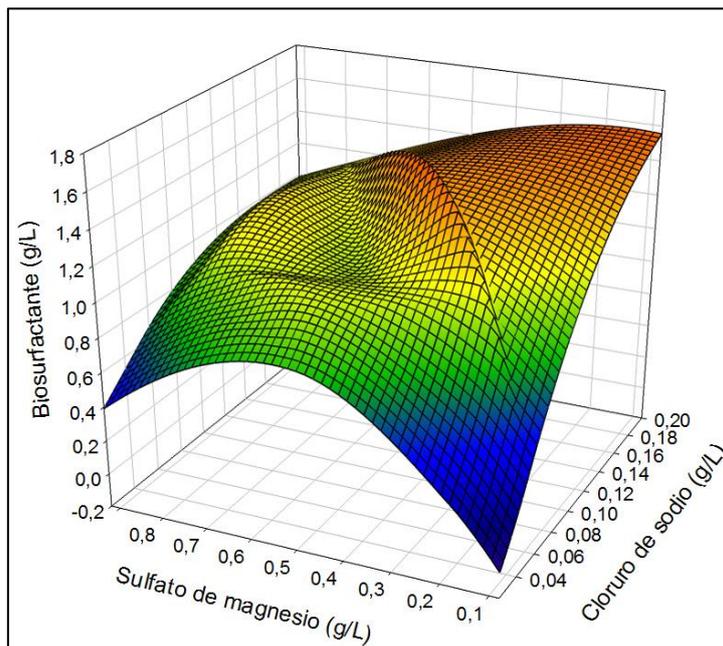


Figura 21. Diseño de superficie de respuesta de dos variables: sulfato de magnesio y cloruro de sodio en relación a la producción de los Biosurfactantes.

Máxima producción de los Biosurfactantes expresado en color naranja con un rango de 1,2-1,4 g/L.

Mínima producción de los Biosurfactantes expresado en color azul con un rango de 0-0,2 g/L.

Se realizó una regresión multivariable, en la cual se obtuvo una ecuación de segundo orden para identificar la influencia de las variables X_1 y X_2 sobre la producción de los Biosurfactantes. La ecuación fue la siguiente:

$$y = f + aX_1 + bX_2 + cX_1^2 + dX_2^2 + eX_1X_2 \quad (\text{Ecuación 13})$$

Donde los coeficientes: $f = 1.04$, $a = 0.14$, $b = 0.016$, $c = -0.2654$, $d = -0.014$, $e = -0.16$, representan la producción de Biosurfactantes (g/L). Estos valores se obtuvieron mediante la derivación parcial de la ecuación anteriormente descrita, en función de cada una de las variables. Se obtuvieron las siguientes ecuaciones luego de realizar la derivación:

$$\frac{\delta y}{\delta X_1} = 0,14 + 2(-0,2654) X_1 + (-0,16) X_2 \quad (\text{Ecuación 14})$$

$$\frac{\delta y}{\delta X_2} = 0,016 + 2 (-0,014) X_2 + (-0,16) X_1 \quad (\text{Ecuación 15})$$

Mediante las ecuaciones de cada una de las variables se obtuvo valores codificados tanto para la variable X_1 como para la variable X_2 . Para obtener los valores óptimos reales fue necesario descodificar estos valores mediante las siguientes ecuaciones:

$$X_1 \text{ real} = (X_1 \text{ Codificado} * 0,3) + 0,5 \quad (\text{Ecuación 16})$$

$$X_2 \text{ real} = (X_2 \text{ Codificado} * 0,02) + 0,05 \quad (\text{Ecuación 17})$$

Una vez empleadas todas las fórmulas anteriores se obtuvieron valores de concentración óptima de sulfato de magnesio 0,58 g/L y de cloruro de sodio 0,055 g/L. La producción máxima de Biosurfactantes descrita por el modelo fue de 1,04 g/L. Los valores obtenidos experimentalmente fueron de 0,830 g/L. Se ha determinado que la ecuación no describe la influencia de ambas variables sobre la producción de los Biosurfactantes.

En los datos estadísticos del diseño de superficie de respuesta se utilizó 20 datos de un total de 27, ya que algunos datos se encontraban fuera de la línea de tendencia. Se obtuvo un r^2 de 0.7823, valor aceptable para la elaboración del diseño de superficie de respuesta de segundo orden. El error del experimento fue de 0.14, valor bajo para la evaluación de la respuesta de estudio. El valor f crítico fue de $3.87E^{-05}$ y el valor F de 14,65 lo que nos permitió concluir que al ser menor el valor f crítico que el valor F se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa la que indica que al menos un tratamiento es diferente entre los demás.

Al eliminar algunos datos hubo una diferencia en las concentraciones óptimas de sulfato de magnesio por lo que fue necesario realizar pruebas a nivel matraz para identificar la concentración ideal de sulfato de magnesio. La concentración

de cloruro de sodio resultó similar en comparación a la concentración obtenida en el anterior diseño de superficie de respuesta, 0.070 g/L. La producción de igual manera no fue la ideal en torno al resultado teórico descrito por el modelo, el cual fue de 1,04 g/L de Biosurfactantes.

Finalmente se aplicó la prueba cualitativa para la verificación de producción de los Biosurfactantes en donde se observó que el tratamiento 3 fue el que mayor cantidad de petróleo desplazó con un total de 5 cm de dispersión (Tabla 12 y Figura 22).

Tabla 12.

Desplazamiento del contaminante utilizando Biosurfactantes proveniente de la bacteria Stenotrophomonas en el diseño de superficie de respuesta utilizando sulfato de magnesio y cloruro de sodio como variables.

Tratamiento	Control (cm)	Halo de desplazamiento (cm)	Total (cm)
1	2	4	2
2	2	7	5
3	2	7,5	5,5
4	2	7	5
5	2	6,5	4,5
6	2	6,6	4,6
7	2	6	4
8	2	7	5
9	2	2,3	0,3

Nota: grupo control se refiere a la muestra aplicada antes de la producción de los Biosurfactantes.



Figura 22. Test de desplazamiento del contaminante mediante la aplicación de los Biosurfactantes de *Stenotrophomonas* en el diseño de superficie de respuesta empleando sulfato de magnesio y cloruro de sodio.

Tratamientos: 1-9 de acuerdo al diseño experimental (Anexo 2)

4.7 Optimización del medio de cultivo a escala de matraz

Se realizó un ensayo a nivel de matraz para comprobar los datos obtenidos teóricamente obtenidos mediante los diseños de superficie de respuesta. En dos diseños de superficie de respuesta se utilizaron como variable al sulfato de magnesio, los resultados en las concentraciones óptimas variaron entre cada uno de los diseños. Se realizó pruebas con sus respectivas repeticiones para obtener la concentración óptima de sulfato de magnesio. Las concentraciones óptimas utilizadas para este experimento fueron 2,5% de aceite de soya, 0,055 g/L de cloruro de sodio y se probó las dos posibles concentraciones óptimas de sulfato de magnesio 0,78 g/L y 0,58 g/L. Se determinó que la concentración óptima de sulfato de magnesio fue de 0,78 g/L con una producción de Biosurfactantes de 1,44 g/L (Figura 23).

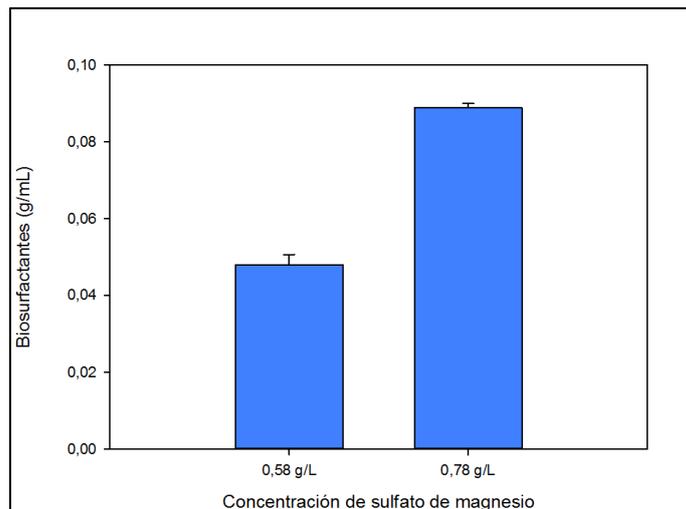


Figura 23. Producción de los Biosurfactantes con los medios optimizados utilizando diferentes concentraciones de sulfato de magnesio.

4.8 Obtención de rendimiento de los Biosurfactantes en relación a la biomasa

Para la producción a mayor escala de los Biosurfactantes se realizó el proceso de fermentación en un Biorreactor de 7 litros con las concentraciones óptimas obtenidas a nivel de matraz: sulfato de magnesio 0,78 g/L y cloruro de sodio 0,055 g/L y aceite de soya 2,5% (v/v). Se tomaron muestras cada hora durante un lapso de 48 horas para la obtención de una curva que relacione la producción de los Biosurfactantes y el crecimiento de la bacteria *Stenotrophomonas*. En la figura 25 se puede observar la curva de crecimiento de la bacteria, donde se puede evidenciar la fase exponencial, la fase estacionaria y la fase de muerte del microorganismo. Se realizó una curva de formación de producto para observar la máxima producción de Biosurfactantes en un “Biorreactor” (Figura 24).

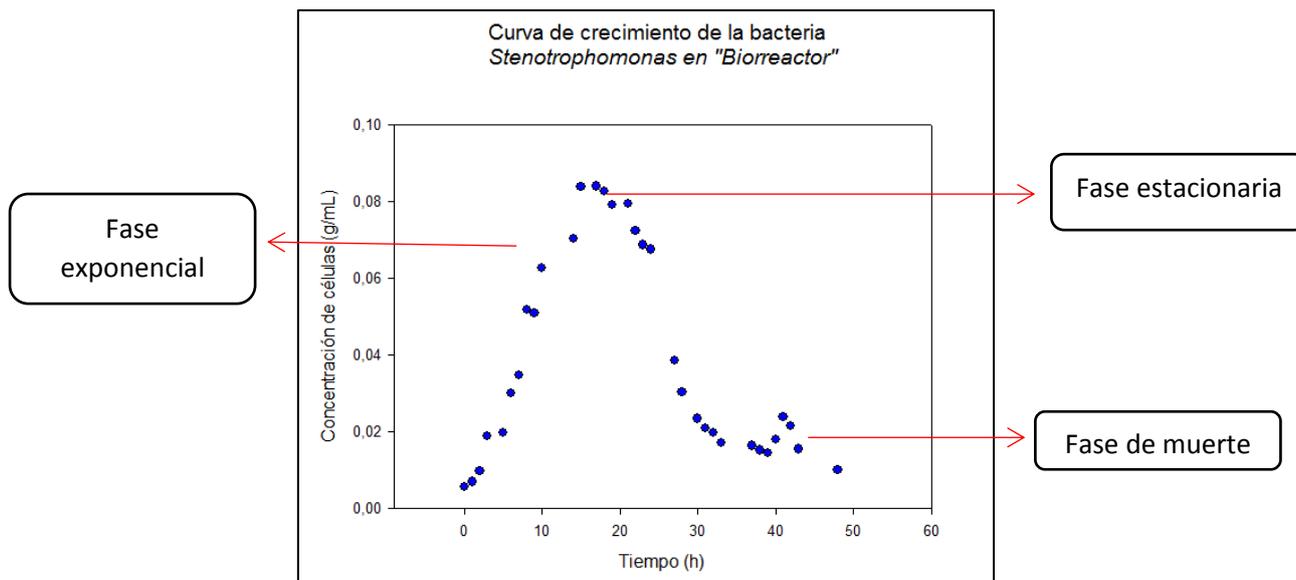


Figura 24. Curva de crecimiento de la bacteria *Stenotrophomonas* en un "Biorreactor" de 7 litros.

Se pudo observar notablemente que el tiempo de crecimiento de la bacteria *Stenotrophomonas* se redujo a 12 horas, esto debido a las condiciones controladas del oxígeno, la temperatura, el pH y la agitación. Al tener las condiciones de operación bien establecidas, la bacteria posee todas las facilidades para su crecimiento. Se obtuvo una velocidad específica de crecimiento de $0,15 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo de duplicación de 4 horas. A nivel de matraz el crecimiento de la bacteria fue en mucho mayor tiempo alcanzando las 30 horas aproximadamente y se obtuvo una velocidad específica de crecimiento de $0,042 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo de duplicación de 16 horas. Se determinó que efectivamente el tiempo de crecimiento en un "Biorreactor" se reduce (Doran, 1998, pp. 349-363).

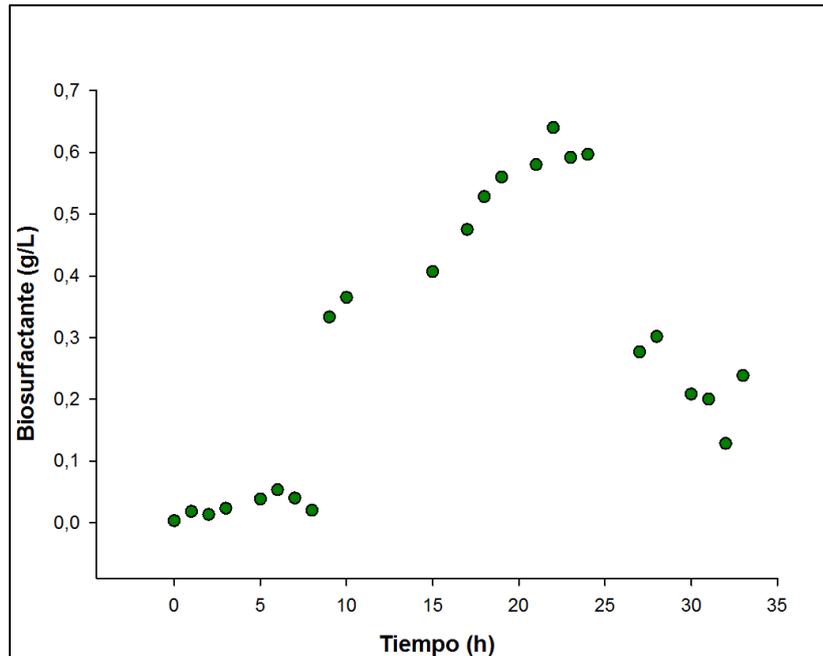


Figura 25. Producción de los Biosurfactantes a partir de *Stenotrophomonas* en un “Biorreactor” de 7 litros.

La formación de producto se obtuvo cuando la bacteria alcanzó la fase estacionaria entre las 17 y 24 horas y el tiempo de producción de Biosurfactantes, sin embargo, la producción disminuyó en comparación al nivel de matraz. La producción a nivel de matraz fue de 1,5 g/L mientras que en el Biorreactor la producción máxima en la fase estacionaria fue de 0,689 g/L, indicando que la producción de Biosurfactantes disminuye a pesar de que las condiciones se encuentran controladas. El proceso de escalado para la producción de los Biosurfactantes es complejo y requiere flujos de aire más controlados debido a la cantidad de espuma generada en el “Biorreactor”. (Gong, Peng, & Wang, 2015, pp. 2033-2038).

Con la obtención de la curva de crecimiento de la bacteria y la curva de formación de producto se realizaron los cálculos para determinar el rendimiento del Biosurfactante en función de la biomasa. Se calcularon diferentes parámetros cinéticos y se obtuvo un rendimiento de 0,2130 g/g (Ver tabla 13).

Tabla 13.

Parámetros cinéticos de la bacteria del género Stenotrophomonas.

X_o	0,00564249	g/mL
X_f	0,00998815	g/mL
P_o	0	g/mL
P_f	0,0204	g/mL

Nota: X_o =concentración inicial de células, X_f = concentración final de células, P_o = Cantidad inicial de Biosurfactantes, P_f = Cantidad final de Biosurfactantes.

El rendimiento obtenido de 0,2130 g/g nos indica que la producción de Biosurfactantes no está relacionada con el crecimiento del microorganismo. Los Biosurfactantes son metabolitos secundarios y se producen en la fase estacionaria de crecimiento. Esto se logró corroborar mediante el gráfico anterior de producción de Biosurfactantes y se observó que efectivamente la mayor producción ocurrió en la fase estacionaria y no en la fase exponencial de crecimiento.

5 Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se identificó mediante pruebas bioquímicas que la bacteria empleada para este trabajo fue del género *Stenotrophomonas*.

Se determinó que la mejor fuente de carbono para la producción de Biosurfactantes a partir de la bacteria *Stenotrophomonas* es el aceite de soya.

A concentraciones de aceite de soya $< 1\%$ (v/v) o $> 3,5\%$ (v/v) la producción de Biosurfactantes disminuye.

La mejor fuente de nitrógeno fue la peptona donde se obtuvo una producción de Biosurfactantes de 1,44 g/L. Se determinó que la concentración de peptona debe ser $< 1,5$ g/L.

Mediante el diseño experimental de Plackett-Burman se identificaron las variables más influyentes en la producción de los Biosurfactantes de la bacteria *Stenotrophomonas*. Estas son: el aceite de soya, el sulfato de magnesio y el cloruro de sodio.

Mediante diseños de superficie de respuesta se determinaron que las concentraciones óptimas de las variables estudiadas fueron: 2,5 % (v/v) de aceite de soya, 0,78 g/L de sulfato de magnesio y 0,055 g/L de cloruro de sodio.

Se observó que a bajas concentraciones de sulfato de magnesio y aceite de soya la producción de Biosurfactantes se reduce notablemente. Existe una dependencia entre estas dos variables en función de la producción de los Biosurfactantes.

Mediante la técnica de desplazamiento del contaminante se determinó que los Biosurfactantes obtenidos poseen la capacidad de interactuar con el petróleo y desplazarlo.

Se demostró que el tiempo de crecimiento de la bacteria empleada se reduce a escala de biorreactor y la producción de los Biosurfactantes ocurre en menor tiempo.

Se demostró que la bacteria *Stenotrophomonas* es una cepa productora de Biosurfactantes y que la producción no está asociada al crecimiento microbiano.

5.2 Recomendaciones

Debido al difícil proceso de escalado es recomendable mantener flujos de oxígeno estables para que la bacteria aproveche la aireación en el medio de cultivo.

Se recomienda realizar una optimización de las condiciones de operación de la bacteria *Stenotrophomonas* para maximizar la producción de los Biosurfactantes.

Se sugiere la investigación de la estructura de los Biosurfactantes producidos por la bacteria *Stenotrophomonas* para identificar el tipo de Biosurfactante.

REFERENCIAS

- Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S., & Nabi, A. (2008). *Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 223(1-3). doi:10.1016/j.desal.2007.01.198
- Accorsini, F. R., Mutton, M. J. R., Lemos, E. G. M., & Benincasa, M. (2012). *Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(1). doi:10.1590/S1517-83822012000100013
- Acevedo, F., Gentina, J. C., & Illánés, A. (2002). Cinética de fermentaciones. En *Fundamentos de ingeniería bioquímica* (Editoriales Valparaíso, p. 293). Valparaíso, Chile.
- Ahmadi, M. A., Zendejboudi, S., Bahadori, A., James, L., Lohi, A., Elkamel, A., & Chatzis, I. (2014). *Recovery Rate of Vapor Extraction in Heavy Oil Reservoirs—Experimental, Statistical, and Modeling Studies*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53(41). doi:10.1021/ie502475t
- Amani, H., & Kariminezhad, H. (2016). *Study on emulsification of crude oil in water using emulsan biosurfactant for pipeline transportation*. *Petroleum Science and Technology*, 34(3). doi:10.1080/10916466.2015.1118500
- Anandaraj, B., & Thivakaran, P. (2010). *Isolation and production of biosurfactant producing organism from oil spilled soil*. *J Biosci Tech*, 1(3). Recuperado el 20 de julio de 2017 de www.jbstonline.com/documents/vol1issue3/jbst2010010302.pdf
- Aparna, A., Srinikethan, G., & Hedge, S. (2011). *Effect of addition of biosurfactant produced by Pseudomonas ssp. on biodegradation of crude oil*. *International Proceedings of Chemical, Biological & Environmental Engineering*. Recuperado el 20 de Julio de 2017 de <http://www.ipcbee.com/vol6/no1/15-F00028.pdf>
- Arena, U. (2012). *Process and technological aspects of municipal solid waste gasification. A review*. *Waste Management*, 32(4). doi:10.1016/j.wasman.2011.09.025

- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., Marchant, R. (2010). *Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2). doi:10.1007/s00253-010-2589-0
- Becerra, S. (2013). VIVIR CON LA CONTAMINACIÓN PETROLERA EN ELECUDADOR. *Revista Lider*. doi: 0719-5265
- Belcher, R. W., Huynh, K. V., Hoang, T. V., & Crowley, D. E. (2012). *Isolation of biosurfactant-producing bacteria from the Rancho La Brea Tar Pits. World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(12). doi:10.1007/s11274-012-1137-8
- Ben Ayed, H., Jemil, N., Maalej, H., Bayouhd, A., Hmidet, N., & Nasri, M. (2015). *Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from Bacillus amyloliquefaciens An6. International Biodeterioration & Biodegradation*, 99. doi:10.1016/j.ibiod.2014.12.009
- Calvo, J. J. O., & Fernández, C. V. G. (2016). *Role of natural surfactants in bioremediation and bioavailability of PAH. Biosaiia: Revista de los másteres de Biotecnología Sanitaria y Biotecnología Ambiental, Industrial y Alimentaria*, (5). Recuperado el 22 de Julio de 2017 de <https://www.upo.es/revistas/index.php/biosaia/article/viewFile/1830/1496>
- Cameotra, R. M., S. (2002). *An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(4). doi:10.1007/s00253-001-0924-1
- 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). doi:10.1002/btpr.1796
- Castellanos, M. L., Isaza, R. J., & Torres, J. M. (2016). EVALUACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (TPH) SOBRE SUELOS URBANOS EN MAICAO, COLOMBIA. *Revista Colombiana de Química*, 44(3). doi:10.15446/rev.colomb.quim.v44n3.55605
- Cervantes, M. (2014). *CARACTERIZACION MOLECULAR Y EVALUACION DE LA CAPACIDAD DEGRADATIVA DE LA ATRAZINA POR*

BACTERIAS AISLADAS DE SUELOS". UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, Perú-Lima.

- Ceschia, E., Harjani, J. R., Liang, C., Ghoshouni, Z., Andrea, T., Brown, R. S., & Jessop, P. G. (2014). *Switchable anionic surfactants for the remediation of oil-contaminated sand by soil washing*. *RSC Adv.*, 4(9). doi: 10.1039/C3RA47158F
- De, S., Malik, S., Ghosh, A., Saha, R., & Saha, B. (2015). A review on natural surfactants. *RSC advances*, 5(81). doi: 10.1039/C5RA11101C
- Denton, M., & Kerr, K. G. (1998). *Microbiological and clinical aspects of infection associated with Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1). Recuperado el 27 de Abril de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9457429>
- Dobler, L., Vilela, L. F., Almeida, R. V., & Neves, B. C. (2016). *Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting*. *New Biotechnology*, 33(1). doi: 10.1016/j.nbt.2015.09.005
- Doran, P. (1998). Principios de ingeniería de los bioprocesos. En *Principios de ingeniería de los bioprocesos* (pp. 1-405). Zaragoza: Acribia S.A.
- Falciglia, P. P., Giustra, M. G., & Vagliasindi, F. G. A. (2011). *Low-temperature thermal desorption of diesel polluted soil: Influence of temperature and soil texture on contaminant removal kinetics*. *Journal of Hazardous Materials*, 185(1). doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.09.046
- Fathabad, E. (2010). *Biosurfactants in Pharmaceutical industry*. *Academic Journals*. doi: 10.3923/ajdd.2011.58.69
- Fotidis, I. A., Wang, H., Fiedel, N. R., Luo, G., Karakashev, D. B., & Angelidaki, I. (2014). *Bioaugmentation as a Solution To Increase Methane Production from an Ammonia-Rich Substrate*. *Environmental Science & Technology*, 48(13). doi:10.1021/es5017075
- Franzetti, A., Gandolfi, I., Fracchia, L., Van Hamme, J., Gkorezis, P., Marchant, R., & Banat, I. M. (2014). *Biosurfactant use in heavy metal removal from industrial effluents and contaminated sites*. *Biosurfactants: Production*

- and Utilization—Processes, Technologies, and Economics*, 159. doi: 10.1201/b17599-20
- Freitas de Oliveira, D. W., Lima França, Í. W., Nogueira Félix, A. K., Lima Martins, J. J., Aparecida Giro, M. E., Melo, V. M. M., & Gonçalves, L. R. B. (2013). *Kinetic study of biosurfactant production by Bacillus subtilis LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.06.011
- Gargouri, B., Contreras, M. del M., Ammar, S., Segura-Carretero, A., & Bouaziz, M. (2017). *Biosurfactant production by the crude oil degrading Stenotrophomonas sp. B-2: chemical characterization, biological activities and environmental applications. Environmental Science and Pollution Research*, 24(4). doi:10.1007/s11356-016-8064-4
- Gómez, W., Gaviria, J., & Cardona, S. (2009). Evaluación de la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina-suelo contaminado con una mezcla de gasolina. *Dyna*, 76(160). Recuperado el 25 de Abril de 2017 de <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v76n160/a08v76n160.pdf>
- Gong, Z., Peng, Y., & Wang, Q. (2015). *Rhamnolipid production, characterization and fermentation scale-up by Pseudomonas aeruginosa with plant oils. Biotechnology Letters*, 37(10). doi:10.1007/s10529-015-1885-2
- Gudiña, E. J., Fernandes, E. C., Rodrigues, A. I., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2015). *Biosurfactant production by Bacillus subtilis using corn steep liquor as culture medium. Frontiers in Microbiology*, 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00059
- Haba, E., Espuny, M. J., Busquets, M., & Manresa, A. (2000). *Screening and production of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. Journal of applied microbiology*, 88(3). Recuperado el 5 de Mayo de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10747218>
- Hassan, M., Essam, T., Yassin, A. S., & Salama, A. (2016). *Optimization of rhamnolipid production by biodegrading bacterial isolates using Plackett–*

- Burman design. International Journal of Biological Macromolecules*, 82. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.09.057
- Hazra, C., Kundu, D., Ghosh, P., Joshi, S., Dandi, N., & Chaudhari, A. (2011). *Screening and identification of Pseudomonas aeruginosa AB4 for improved production, characterization and application of a glycolipid biosurfactant using low-cost agro-based raw materials. Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86(2). doi:10.1002/jctb.2480
- Hemlata, B., Selvin, J., & Tukaram, K. (2015). *Optimization of iron chelating biosurfactant production by Stenotrophomonas maltophilia NBS-11. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(2). doi:10.1016/j.bcab.2015.02.002
- Henkel, M., Müller, M. M., Kügler, J. H., Lovaglio, R. B., Contiero, J., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2012a). *Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. Process Biochemistry*, 47(8). doi:10.1016/j.procbio.2012.04.018
- Henkel, M., Müller, M. M., Kügler, J. H., Lovaglio, R. B., Contiero, J., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2012b). *Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. Process Biochemistry*, 47(8). doi:10.1016/j.procbio.2012.04.018
- Henkel, M., Müller, M. M., Kügler, J. H., Lovaglio, R. B., Contiero, J., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2012c). *Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. Process Biochemistry*, 47(8). doi:10.1016/j.procbio.2012.04.018
- Ikhwani, A. Z. N., Nurlaila, H. S., Ferdinand, F. D. K., Fachria, R., Hasan, A. E. Z., Yani, M., Suryani. (2017). *Preliminary study: optimization of pH and salinity for biosurfactant production from Pseudomonas aeruginosa in diesel fuel and crude oil medium. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 58. doi:10.1088/1755-1315/58/1/012056

- Jiménez, M. L. B. (2013). PRODUCCIÓN DE UN POLÍMERO TIPO POLIHIDROXIALCANOATO (PHA) EMPLEANDO RESIDUOS DE LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL. Universidad Nacional de Colombia
- Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A., & Desai, A. J. (2008). *Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. Bioresource Technology*, 99(1). doi:10.1016/j.biortech.2006.12.010
- Korayem, A. S., Abdelhafez, A. A., Zaki, M. M., & Saleh, E. A. (2015). *Optimization of biosurfactant production by Streptomyces isolated from Egyptian arid soil using Plackett–Burman design. Annals of Agricultural Sciences*, 60(2). doi:10.1016/j.aogas.2015.09.001
- Kurniawan, T., Lo, W., & Chan, G. (2006). *Physico-chemical treatments for removal of recalcitrant contaminants from landfill leachate. Journal of Hazardous Materials*, 129(1-3). doi:10.1016/j.jhazmat.2005.08.010
- Lara-Díaz, R. A., & Melgoza-Alemán, R. M. (2009). Solidificación-Estabilización de Cromo, Níquel y Plomo en una Matriz Sólida de Hormigón Fabricada con Cemento Portland. *Información tecnológica*, 20(1). doi:10.4067/S0718-07642009000100005
- Larreátegui, R. (2013). *Estudio comparativo en la producción de dos tipos de compost con residuos orgánicos en la pre-parroquia San Gabriel del baba cantón Santo Domingo*. Universidad de las Américas, Ecuador.
- Lau, E. V., Gan, S., Ng, H. K., & Poh, P. E. (2014). *Extraction agents for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil in soil washing technologies. Environmental Pollution*, 184. doi:10.1016/j.envpol.2013.09.010
- Liu, Q., Lin, J., Wang, W., Huang, H., & Li, S. (2015). *Production of surfactin isoforms by Bacillus subtilis BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. Biochemical Engineering Journal*, 93. doi:10.1016/j.bej.2014.08.023
- López, R. (2013). *Remediación electrocinética de suelos de baja permeabilidad contaminados con compuestos orgánicos hidrófobos*. Universidad de Castilla de la Mancha, Ciudad Real.

- Makkar, R. S., Cameotra, S. S., & Banat, I. M. (2011). *Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production*. *AMB express*, 1(1).doi: 10.1186/2191-0855-1-5
- McKenna, A. (2013). *Heavy Petroleum Composition*. *Energy Fuels*. doi: 10.1021/ef301737f
- McFaddin, J. (2013). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. En J. McFaddin, *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Estados Unidos: Panamericana.
- Mallampati, S. R., Mitoma, Y., Okuda, T., Simion, C., & Lee, B. K. (2015). *Dynamic immobilization of simulated radionuclide ¹³³Cs in soil by thermal treatment/vitrification with nanometallic Ca/CaO composites*. *Journal of Environmental Radioactivity*, 139. doi:10.1016/j.jenvrad.2014.10.006
- Mao, X., Jiang, R., Xiao, W., & Yu, J. (2015). *Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: a review*. *Journal of hazardous materials*, 285. doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.12.009
- Montgomery, D. (2005). En *Diseño y análisis de experimentos* (Segunda). Arizona, USA: Limusa Wiley.
- Moya Ramírez, I., Tsaousi, K., Rudden, M., Marchant, R., Jurado Alameda, E., García Román, M., & Banat, I. M. (2015). *Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source*. *Bioresource Technology*, 198. doi:10.1016/j.biortech.2015.09.012
- Mukherjee, S., Das, P., Sivapathasekaran, C., & Sen, R. (2008). *Enhanced production of biosurfactant by a marine bacterium on statistical screening of nutritional parameters*. *Biochemical Engineering Journal*, 42(3). doi:10.1016/j.bej.2008.07.003
- Nitschke, M., & Silva, S. S. e. (2016). *Recent Food Applications of Microbial Surfactants*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. doi:10.1080/10408398.2016.1208635
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Poliwoda, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2014). *Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-*

- producing Pseudomonas sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. Environmental Science and Pollution Research*, 21(15). doi:10.1007/s11356-014-2872-1
- Patel, K. S., Ramteke, S., Naik, Y., Sahu, B. L., Sharma, S., Lintelmann, J., & Georg, M. (2015). *Contamination of Environment with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in India. Journal of Environmental Protection*, 06(11). doi:10.4236/jep.2015.611111
- 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). doi: 10.5897/AJMR12.647
- Pruthi, V., & Cameotra, S. S. (2003). *Effect of nutrients on optimal production of biosurfactants by Pseudomonas putida—a Gujarat oil field isolate. Journal of Surfactants and Detergents*, 6(1). Recuperado el 3 de Junio de 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007/s11743-003-0250-9>
- Rahman, P. K. S. M., & Gakpe, E. (2008). *Production, Characterisation and Applications of Biosurfactants-Review. Biotechnology(Faisalabad)*, 7(2). doi:10.3923/biotech.2008.360.370
- Ramarathnam, R., Bo, S., Chen, Y., Dilantha, F., Xuewen, G., & De Kleivit, T. (2007). *Molecular and biochemical detection of fengycin and bacillomycin D-producing Bacillus spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. Research press web*, 57. doi:10.1139/W07-049
- Rita Cassia, & Rufino, R. (2013). *Enhancement of Biosurfactant production from Pseudomonas cepacia CCT6659 through optimization of nutritional parameters using response surface methodology.* doi: 10.3139/113.110241
- Rodriguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., & García, J. (1994). Tincion Gram. En *Bacteriología General* (págs. 55-63). Costa Rica: Universidad de Costa Rica.

- Sadef, Y., Poulsen, T. G., & Bester, K. (2014). *Impact of compost process temperature on organic micro-pollutant degradation. Science of The Total Environment*. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.07.003
- Sen, R. (Ed.). (2010). *Biosurfactants*. New York, N.Y.: Austin, Tex: Springer Science+Business Media ; Landes Bioscience.
- Shaligram, N. S., & Singhal, R. S. (2010). *Surfactin—A Review on Biosynthesis, Fermentation, Purification and Applications. Food Technology & Biotechnology*, 48(2). Recuperado el 17 de Mayo de 2017 de https://www.researchgate.net/publication/228354663_SurfactinA_Review_on_Biosynthesis_Fermentation_Purification_and_Applications
- Sharma, D., Ansari, M. J., Al-Ghamdi, A., Adgaba, N., Khan, K. A., Pruthi, V., & Al-Waili, N. (2015). *Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa DSVP20 isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated soil and its physicochemical characterization. Environmental Science and Pollution Research*, 22(22). doi:10.1007/s11356-015-4937-1
- Shi, Z., Chen, J., & Yin, X. (2013). *Effect of anionic–nonionic-mixed surfactant micelles on solubilization of PAHs. Journal of the Air & Waste Management Association*, 63(6). doi:10.1080/10962247.2013.778918
- Shoeb, E., Akhlaq, F., Badar, U., Akhter, J., & Imtiaz, S. (2013). *Classification and industrial applications of biosurfactants. Academic Research International*, 4(3). doi: : 2223-9944
- 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). doi: 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). doi:10.1007/s40003-014-0144-4
- Słomińska, M., Konieczka, P., & Namieśnik, J. (2014). *The Fate of BTEX Compounds in Ambient Air. Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44(5). doi: 10.1080/10643389.2012.728808

- Soberón-Chávez, G. (Ed.). (2011). *Biosurfactants: from genes to applications*. Heidelberg ; New York: Springer-Verlag.
- Souza, E. C., Vessoni-Penna, T. C., & de Souza Oliveira, R. P. (2014). *Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 89. doi:10.1016/j.ibiod.2014.01.007
- Su, C. (2014). *A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: situation, impact and remediation techniques*. *Environmental Skeptics and Critics*, 3(2), 24. Recuperado el 10 de Junio de 2017 de https://www.researchgate.net/publication/285634155_A_review_on_heavy_metal_contamination_in_the_soil_worldwide_Situation_impact_and_remediation_techniques
- Suja, F., Rahim, F., Taha, M. R., Hambali, N., Rizal Razali, M., Khalid, A., & Hamzah, A. (2014). *Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90. doi: 10.1016/j.ibiod.2014.03.006
- Swapna, T., Papathoti, K., Khan, M., & Hameeda, B. (2016). *Bioreduction of Cr by biosurfactant producing marine bacterium Bacillus subtilis SHB 13*, 75. Recuperado el 22 de Abril de 2017 de https://www.researchgate.net/publication/305543700_Bioreduction_of_Cr_VI_by_Biosurfactant_Producing_Marine_Bacterium_Bacillus_subtilis_HB_13
- Tian, W., Yao, J., Liu, R., Zhu, M., Wang, F., Wu, X., & Liu, H. (2016). *Effect of natural and synthetic surfactants on crude oil biodegradation by indigenous strains*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 129. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.03.027
- Tzanakos, K., Mimilidou, A., Anastasiadou, K., Stratakis, A., & Gidarakos, E. (2014). *Solidification/stabilization of ash from medical waste incineration into geopolymers*. *Waste Management*, 34(10). doi:10.1016/j.wasman.2014.03.021

- Van Bogaert, I. N. A., Saerens, K., De Muynck, C., Develter, D., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2007). *Microbial production and application of sophorolipids*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(1). doi: 10.1007/s00253-007-0988-7
- Vila, J. (2014). Técnicas de biorremediación para el saneamiento del subsuelo. *Medio Ambiente*.
- Volke Sepúlveda, T., & Velasco Trejo, J. A. (2004). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. México, D.F: Inst. Nacional de Ecología.
- Ware, G. (2005). Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. En *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Springer, Vol. 184). Arizona, USA: Board.
- White, D. A., Hird, L. C., & Ali, S. T. (2013). *Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium Rhodococcus sp., strain PML026*. *Journal of Applied Microbiology*, 115(3). doi: 10.1111/jam.12287
- Zhang, T., Zou, H., Ji, M., Li, X., Li, L., & Tang, T. (2014). *Enhanced electrokinetic remediation of lead-contaminated soil by complexing agents and approaching anodes*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(4). doi:10.1007/s11356-013-2274-9

ANEXOS

ANEXO 1

Tablas de los diseños factoriales completamente al azar para la selección de la mejor fuente de carbono y nitrógeno

Anexo 1.1.

Tratamientos y concentraciones de melaza para la evaluación de la producción de biosurfactantes

Tratamientos	Concentración de melaza (v/v)
1	0.3%
2	0.5%
3	0.7%
4	0.9%
5	1.1%

Anexo 1.2.

Tratamientos y concentraciones de aceite de soya para la evaluación de la producción de biosurfactantes

Tratamientos	Concentración de aceite de soya (v/v)
1	1,5%
2	2.5%
3	3.5%
4	4,5%
5	5,5%

Anexo 1.3.

Tratamientos y concentraciones de sulfato de amonio para la evaluación de la producción de biosurfactantes

Tratamientos	Concentración de sulfato de amonio (g/L)
1	0.5
2	1
3	1,5
4	2
5	2,5

Anexo 1.4.

Tratamientos y concentraciones de nitrato de potasio para la evaluación de la producción de biosurfactantes

Tratamientos	Concentración de nitrato de potasio (g/L)
1	0,5
2	1
3	1,5
4	2
5	2,5

Anexo 1.5.

Tratamientos y concentraciones de peptona para la evaluación de la producción de biosurfactantes

Tratamientos	Concentración de peptona (g/L)
1	0,5
2	1
3	1,5
4	2
5	2,5

ANEXO 2

Tablas de los diseños centrales compuestos

Anexo 2.1.

Combinaciones de los tratamientos del diseño de superficie utilizando aceite de soya y sulfato de magnesio.

Tratamiento	Aceite de soya (%)	Sulfato de magnesio (g/L)
1	2,5	0,50
2	3,2	0,50
3	3,0	0,80
4	2,5	0,92
5	2,0	0,20
6	1,8	0,50
7	2,0	0,80
8	2,5	0,08
9	3,0	0,20

Anexo 2.2.

Combinaciones de los tratamientos del diseño de superficie utilizando aceite de soya y cloruro de sodio.

Tratamiento	Aceite de soya (%)	Cloruro de sodio (g/L)
1	2,5	0,05
2	3,2	0,05
3	3,0	0,07
4	2,5	0,08
5	2,0	0,03
6	1,8	0,05
7	2,0	0,07
8	2,5	0,02
9	3,0	0,03

Anexo 2.3.

Combinaciones de los tratamientos del diseño de superficie utilizando sulfato de magnesio y cloruro de sodio.

Tratamiento	Sulfato de magnesio (g/L)	Cloruro de sodio (g/L)
1	0,50	0,05
2	0,50	0,05
3	0,80	0,07
4	0,92	0,08
5	0,20	0,03
6	0,50	0,05
7	0,80	0,07
8	0,08	0,02
9	0,20	0,03

ANEXO 3

Diluciones para la elaboración de la curva de calibrado de biomasa de la bacteria Stenotrophomonas.

Curva de calibrado		
Dilución	Medio Estéril (mL)	Inóculo (mL)
1	9	1
2	8	2
3	7	3
4	6	4
5	5	5
6	4	6
7	3	7
8	2	8
9	1	9

