

**SELECCIÓN DEL CEPARIO DEL GRUPO GIMBA DE BACTERIAS
PRODUCTORAS DE SURFACTANTES A PARTIR DE GLICEROL CRUDO**

ERYTH DANIEL CARREÑO AFANADOR

KATHERIN ELIANA MARTINEZ SILVA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2018

**SELECCIÓN DEL CEPARIO DEL GRUPO GIMBA DE BACTERIAS
PRODUCTORAS DE SURFACTANTES A PARTIR DE GLICEROL CRUDO**

ERYTH DANIEL CARREÑO AFANADOR

KATHERIN ELIANA MARTINEZ SILVA

**Trabajo presentado como requisito para optar por el título de Ingeniero
Químico**

Directora

VIVIANA SÁNCHEZ TORRES

Ingeniería Química, Ph.D. en Ingeniería Química

Codirector

JUAN DIEGO CARVAJALINO OLAVE

Ingeniero Químico

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOQUÍMICAS**

ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

BUCARAMANGA

2018

DEDICATORIA

Dedico este logro a Dios por permitirme alcanzar esta meta tan anhelada, a mis padres Edinson y Claudia, a mi tío-padrino Luis Fernando y a mi abuela Marlene, por estar conmigo, por apoyarme y guiarme en cada paso que doy, por enseñarme a no rendirme, en general por ser las bases que me ayudaron a llegar hasta aquí; y al resto de mi familia por siempre creer en mí, en que podría lograr el Título de Ingeniera Química. (Los amo)

Katherin Eliana Martínez Silva

Dedico este logro a mi madre Omaira, mi padre Eulises y hermanas Geralin, Ninibeth y Ginnelli que son el motor de mi vida y es gracias a ellos que seré ingeniero químico. Agradezco a Aura, Dayanna y Adriana por estar ahí apoyándome en todo momento. Un agradecimiento especial a Laura Álvarez y Karen Gutiérrez, chicas ustedes se ganaron un lugar de por vida en mi corazón, gracias a sus apoyos en todos los diferentes aspectos de mi vida; por último, doy gracias a cada una de las personas que invirtió un poquito de su tiempo en ofrecer una mano amiga en la formación de mi ser.

Eryth Daniel Carreño Afanador

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	14
1.OBJETIVOS.....	16
1.1 OBJETIVO GENERAL	16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
2.MARCO TEÓRICO	17
2.1 GLICEROL CRUDO COMO FUENTE DE CARBONO	17
2.2 BIOSURFACTANTES.....	17
3. METODOLOGÍA	22
3.1 CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	22
3.2 PREPARACIÓN DE PRECULTIVOS.....	22
3.3 CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS	22
3.4 PRUEBA DE GOTA COLAPSADA	23
3.5 TENSIÓN SUPERFICIAL.....	23
3.6 SELECCIÓN DE LAS MEJORES CEPAS CON ACTIVIDAD SURFACTANTE	24
3.7 ÍNDICE DE EMULSIFICACIÓN E ₂₄	24
3.8 SEMIPURIFICACIÓN DEL SURFACTANTE	25
3.9 CARACTERIZACIÓN DE SURFACTANTES	25
3.9.1 Rendimientos y espectroscopia infrarroja por transformada de fourier (FTIR)	25
3.9.2 Concentración micelar crítica (CMC)	26

4.RESULTADOS.....	27
4.1 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS	27
4.2 CAMBIO DEL pH CON EL CRECIMIENTO	29
4.3 PRUEBA DE LA GOTA COLAPSADA.....	30
4.4 TENSIÓN SUPERFICIAL DEL SURFACTANTE CRUDO	32
4.5 ÍNDICE DE EMULSIFICACIÓN	34
4.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS SURFACTANTES SEMIPURIFICADOS.....	35
4.6.1 Caracterización por espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	35
4.6.2 Concentración micelar crítica (CMC)	36
5.CONCLUSIONES	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	43
ANEXOS	47

LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1. Revisión de la literatura sobre fuentes de carbono y tipos de biosurfactante producidos por las especies bacterianas pertenecientes al cepario del grupo GIMBA	20
Tabla 2. Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t) para las cepas bacterianas estudiadas.	29
Tabla 3. Colapso de gota de los sobrenadantes de los microorganismos en diferentes tiempos de fermentación. (+) Positivo, (-) Negativo.	31

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Curvas de crecimiento de microorganismos en medio mínimo de sales con glicerol (MMSCG).....	28
Figura 2. Resultados de pH para los surfactantes crudos a las 72 horas de incubación.....	30
Figura 3. Prueba de gota colapsada de <i>Acinetobacter brisouii</i>	31
Figura 4. Porcentaje de reducción de la tensión superficial para el surfactante crudo luego de 72 horas de cultivo	32
Figura 5. Tensión superficial de los surfactantes crudos producidos por las especies seleccionadas	33
Figura 6. Perfil de emulsificación de <i>Acinetobacter brisouii</i>	34
Figura 7. Variación en el tiempo del Índice de emulsificación (E_{24}) del surfactante crudo para las cepas seleccionadas	35
Figura 8. Variación de la tensión con la concentración de surfactante semipurificado de <i>Acinetobacter brisouii</i>	37
Figura 9. Comportamiento de la tensión superficial en agua destilada respecto al logaritmo de la concentración de surfactante semipurificado de <i>Brevibacterium sp</i> en agua destilada.....	37

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	47
ANEXO B. ESPECTROS DE PRODUCTOS METABÓLICOS DE LOS MICROORGANISMOS <i>ACINETOBACTER BRISOUII</i> Y <i>BREVIBACTERIUM SP.</i>	48
ANEXO C. TABLAS PARA LECTURA DE IR DE ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER.	50

GLOSARIO

AUTOCLAVE: aparato que sirve para esterilizar objetos o sustancias situadas en su interior por medios diferentes, como vapor, temperatura o radiación.

CEPARIO: colección de microorganismos.

COLAPSAR: decrecer o disminuir intensamente.

FASE DE LATENCIA: período de adaptación de un microorganismo a un nuevo medio de cultivo.

INTERFEROGRAMAS: figura geométrica que cuantifica la variación de posiciones de puntos dispuestos en una rejilla como consecuencia de su deformación mediante el uso de la interferencia de las ondas de luz.

MICELAS: partículas compuestas de agregados de moléculas unidas por enlaces secundarios.

TRAZAS: pequeñísimas cantidades de una sustancia presentes en otra sustancia.

RESUMEN

TÍTULO: SELECCIÓN DEL CEPARIO DEL GRUPO GIMBA DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE SURFACTANTE A PARTIR DE GLICEROL CRUDO*

AUTORES: ERYTH DANIEL CARREÑO AFANADOR**, KATHERIN ELIANA MARTINEZ SILVA**

PALABRAS CLAVE: BIOSURFACTANTE, TENSIÓN SUPERFICIAL, EMULSIÓN, GLICEROL CRUDO, *ACINETOBACTER BRISOUII*, *BREVIBACTERIUM SP.*

DESCRIPCIÓN

La industria petrolera y cosmetológica hace uso de biosurfactantes para la elaboración de sus productos y servicios ya que presentan menor toxicidad y mayor biodegradabilidad respecto a los surfactantes sintéticos. El objetivo de este trabajo fué estudiar la producción de biosurfactantes de 11 cepas bacterianas del *Grupo de Investigaciones en Minerales, Biohidrometalurgia y Ambiente* (GIMBA), empleando como fuente de carbono el glicerol crudo.

Se evaluó la actividad del surfactante crudo de las 11 cepas y se encontró que el biosurfactante producido por las cepas *Acinetobacter brisouii* y *Brevibacterium sp* lograron la mayor reducción de la tensión superficial del medio de cultivo, 37% y 20% respectivamente. Se evaluó además el índice de emulsificación E_{24} en parafina, donde las cepas que lograron la mayor emulsión fueron: *Kosakonia oryzae* (56%), *Acinetobacter bisouii* (50%) y *Pseudomonas stutzeri* (50%).

El biosurfactante semipurificado producido por *Acinetobacter bisouii* y *Brevibacterium sp* logró una reducción de la tensión superficial en agua destilada de 42,2% a una CMC de $2,48 \times 10^{-3}$ mg/mL y 33,2% a una CMC de 1,14 mg/mL respectivamente. El microorganismo *Acinetobacter brisoii* presentó propiedades tanto de emulsión a diferentes tiempos de incubación durante el cultivo como de reducción de la tensión superficial, siendo una bacteria promisoría para estudios más rigurosos.

*Trabajo de grado

**Facultad de ingenierías fisicoquímicas. Escuela de ingeniería química. Directora: Viviana Sánchez Torres Ing. Química Ph.D. en ingeniería química. Codirector: Juan Diego Carvajalino Olave Ing. Químico.

ABSTRACT

TITLE: SELECTION OF INVESTIGATION GROUP GIMBA STRAINS BACTERIA BIOSURFACTANT PRODUCERS WITH RAW GLYCEROL AS CARBON SOURCE*.

AUTHORS: ERYTH DANIEL CARREÑO AFANADOR**, KATHERIN ELIANA MARTINEZ SILVA**

KEYWORDS: BIOSURFACTANT, SUPERFICIAL TENSION, EMULSION, RAW GLYCEROL, *ACINETOBACTER BRISOUII*, *BREVIBACTERIUM SP.*

DESCRIPTION

The oil and cosmetology industry uses biosurfactants to make products and services instead of using synthetic surfactants because the first one is less toxic. Also, biosurfactants are biodegradable. This work is focused on studying the biosurfactant production of 11 bacteria strains from the group of investigation GIMBA, using raw glycerol as a carbon source, which generates a high production of biodiesel.

The raw biosurfactant production for the strain was evaluated in different incubation times. In that process it was found that the bacteria *Acinetobacter brisouii* had the highest raw biosurfactant activity, which had a superficial reduction of 37% and *Brevibacterium sp* had a reduction of 20% regarding control. In tests of emulsion index (E_{24}), the best emulsor bacteria was *Kosakonia oryzae* (56%), followed by *Acinetobacter brisouii* and *Pseudomonas stutzeri*, both with index of (50%).

The final step, when analyzing the semi-purification of biosurfactants for acid precipitation followed for organic solvents extraction, *Acinetobacter brisouii* had a reduction of superficial tension of distillate water from 65,9 mN/m to 38,3 mN/m (42,2%) with a CMC of $2,48 \times 10^{-3}$ mg/ml and the *Brevibacterium sp* with CMC of 1,14 mg/ml showed a reduction of superficial tension of distillate water from 65,9 mN/m to 44 mN/m (33,2%). In both tests, *Acinetobacter brisouii* showed proprieties of emulsion and superficial reduction.

*Bachelor Thesis

** Faculty of physic-chemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Viviana Sánchez Torres Ph.D. in Chemical Engineering. Codirector: Juan Diego Carvajalino Olave Chemical Engineering.

INTRODUCCIÓN

El aumento de la demanda energética en la sociedad, ha repercutido en un consumo de combustibles no renovables tanto en la industria como en la vida cotidiana; este problema ha impulsado el estudio y uso de otras fuentes de energías alternativas renovables como el biodiesel.

El biodiesel es un tipo de combustible obtenido a partir de la transesterificación de aceites vegetales o animales con un alcohol de bajo peso molecular [1] este combustible tiene la capacidad de reemplazar el combustible tradicional derivado del petróleo en motores de alto cilindraje. Sin embargo, en la producción del biodiesel se genera como subproducto el glicerol crudo; este subproducto representa el 10% en peso de la producción total del biodiesel y es separado del producto principal junto con trazas de catalizador, ácidos grasos libres, alcohol sin reaccionar y otras impurezas [2].

La explotación del biodiesel ha generado una producción excesiva del glicerol crudo como un subproducto con poco valor en el mercado y altos costos de tratamiento para ser usados en la industria cosmetológica.

En Colombia se produce anualmente 556.000 toneladas al año de biodiesel, que corresponden a 55.600 toneladas al año de glicerol crudo [3]. Este glicerol crudo es aprovechado en el país como complemento alimenticio en la porcicultura, o vendidos a precios muy bajos para exportación a empresas multinacionales. Por último, la opción menos viable es tratarlo para ser desechado al ambiente.

Para ser desechado, el glicerol se debe eliminar ya sea por incineración o tratamiento de aguas residuales, siendo ambos procesos una renta que eleva el precio de biodiesel. Purificar el glicerol no es una opción económicamente viable,

ya que el proceso es costoso y el producto en el mercado mundial tiene un precio de 0,38 US el litro [4].

Por otro lado, el glicerol crudo podría emplearse como fuente de carbono para producir surfactantes utilizando microorganismos. Tanto la industria de los hidrocarburos como la industria cosmetológica han usado surfactantes de origen sintético para los diferentes productos o servicios que generan, pero algunos son tóxicos, altamente contaminantes y poco biodegradables [5].

Los biosurfactantes se han convertido en objeto de estudio gracias a las propiedades que presentan, al ser comparados con los producidos de manera sintética, son más amigables con el medio ambiente, cumplen las mismas funciones que los sintéticos y al finalizar su uso se degradan y no perduran de manera residual en el entorno. Sin embargo, su disponibilidad en el mercado es limitada debido a los costos de purificación, rendimientos del cultivo empleado y naturaleza del surfactante a obtener [6].

Este trabajo busca evaluar si 11 cepas bacterianas disponibles en el Grupo de Investigaciones en Minerales, Biohidrometalurgia y Ambiente (GIMBA) son productoras de metabolitos con actividad surfactante empleando para el crecimiento bacteriano una fuente de carbono de bajo costo como el glicerol crudo.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar bacterias productoras de metabolitos con actividad surfactante en un medio mínimo de sales con glicerol crudo como fuente de carbono.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la capacidad de metabolizar glicerol crudo de las 11 cepas bacterianas disponibles en el grupo GIMBA
- Medir la actividad surfactante de los productos tensoactivos de las cepas seleccionadas mediante pruebas de tensión superficial y gota colapsada a diferentes tiempos de fermentación.
- Caracterizar los metabolitos con actividad reductora de tensión superficial de las mejores especies.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 GLICEROL CRUDO COMO FUENTE DE CARBONO

El glicerol (1,2,3-propanotriol o glicerina) es uno de los principales productos obtenidos durante la transesterificación de aceites animales o vegetales [13]; es una molécula no tóxica, no irritante, biodegradable y reutilizable empleada en diferentes sectores de la industria como precursor o aditivo de procesos alimenticios, productos cosméticos, medicamentos y más.

El glicerol es un componente abundante en la naturaleza, debido a que forma parte estructural de muchos lípidos y es extensamente aprovechado por muchos microorganismos como fuente de carbono y de energía; esto se debe a la facilidad del glicerol de cruzar la membrana de las células a partir de difusión pasiva, por medio de una proteína integral localizada en la membrana, el facilitador de glicerol GlpF [2]. En el citoplasma, el glicerol es convertido en glicerol-3-fosfato y atrapado dentro de los microorganismos para luego ser metabolizado. Una vez dentro, este es empleado por diferentes microorganismos y rutas metabólicas para producir gran variedad de compuestos con un valor agregado como el 1,3-propanediol, el cual es un monómero que se puede emplear para la producción de plásticos como el poliéster, el polietileno y el poliuretano; otro producto de alto valor es el ácido succínico, el cual se emplea en alimentos y productos farmacológicos y muchos más. En este trabajo se empleó para la producción de biosurfactantes el glicerol crudo como sustrato.

2.2 BIOSURFACTANTES

Los biosurfactantes son compuestos anfipáticos secretados por bacterias y hongos capaces de reducir la tensión superficial e interfacial entre dos compuestos no

miscibles [7]. Estas moléculas están constituidas por dos partes, una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica, la cabeza de dicha molécula está generalmente compuesta por aminoácidos o péptidos con carga positiva o negativa y la cola formada por ácidos grasos saturados o insaturados sin carga [8]. Dentro de los parámetros que permiten identificar un biosurfactante se encuentra la concentración micelar crítica (CMC), que es la cantidad máxima permitida de surfactante en la interface entre dos líquidos antes de colapsar y formar micelas.

Los metabolitos con actividad surfactante se clasifican en cinco grandes grupos de acuerdo a la naturaleza bioquímica de su estructura y estos son: glicolípidos, lipopéptidos/lipoproteínas, ácido graso/fosfolípido, polimérico y partículas surfactantes [9].

Los glicolípidos son surfactantes de bajo peso molecular y están constituidos por mono-, di-, tri- y tetrasacáridos de azúcares como glucosa, manosa, trealosa, celobiosa, manosileritritol y ramnosa, más el componente apolar propio de los compuestos anfipáticos.

Los lipopéptidos y las lipoproteínas son biosurfactantes que al igual que los glicolípidos son de bajo peso molecular, también poseen una alta actividad antibacteriana gracias a la capacidad de solubilizar enzimas de la membrana, entre los lipopéptidos más famosos esta la surfactina, que en concentraciones menores del 0,005% en peso reduce la tensión superficial del agua de 72 a 27,9 N/m [10].

Por otra parte, los biosurfactantes de alto peso molecular, son generalmente nombrados como bioemulsionantes, los cuales están constituidos por heteropolímeros como: polisacáridos, proteínas, lipopolisacáridos, lipoproteínas o mezclas de sustancias anteriormente nombradas que facilitan la captación de sustratos insolubles necesarios en los microorganismos. En esta categoría entran los ácidos grasos/fosfolípidos, los biosurfactantes poliméricos y biotensoactivos particulados.

Los ácidos grasos/fosfolípidos son generalmente producidos por bacterias y levaduras durante su crecimiento en alcanos; esto se observa en la formación de microemulsiones de alcanos en agua que producen las vesículas de bacterias de la especie *Acinetobacter* [11], esto junto con las altas aplicaciones médicas y farmacológicas vuelven este tipo de metabolitos de vital importancia para su estudio y desarrollo a gran escala.

Los biosurfactantes poliméricos han sido los más estudiados el área de metabolitos con actividad tensoactiva, emulsan, liposan, alasan y lipomanan, son ampliamente utilizados en la industria de los hidrocarburos, cosmetológica y de alimentos por su efectividad como emulsificantes de estructuras carbonadas en agua [12]. Por último, los biosurfactantes particulados son un tipo de partición vesicular de membranas extracelulares que facilitan la absorción de alcanos al realizar microemulsiones, al igual que los biosurfactantes poliméricos.

En este trabajo se produjo metabolitos con actividad surfactantes a partir de glicerol crudo con medio mínimo de sales (MMSCG), para 11 cepas bacterianas del cepario del grupo GIMBA. Se hizo la revisión de la literatura sobre la producción de biosurfactantes por estas cepas y las fuentes de carbono empleadas (Tabla 1). La expresión (n/a) se utilizó para indicar que no se encontró ningún artículo de ese microorganismo enfocado a la producción de biosurfactantes.

Tabla 1. Revisión de la literatura sobre fuentes de carbono y tipos de biosurfactante producidos por las especies bacterianas pertenecientes al cepario del grupo GIMBA

Microorganismos	Fuente(s) de carbon	Clase de surfactante producido	Referencia bibliográfica
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Residuos agroindustriales	Polimérico	[14]
<i>Pseudomonas stupzeri</i>	Aceite de soya, aceite de oliva	Glicolípido (Ramnolípido)	[15]
<i>Pseudomonas putida</i>	Aceite crudo	Glicolípido (Ramnolípido)	[16]
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Aceite crudo	Lipopéptido	[17]
<i>Escherichia coli</i>	Medio Luria Bernati (LB)	Glicolípido (Ramnolípido)	[18]
<i>Bacillus subtilis</i>	Glucosa	Lipopéptido	[19]
<i>Acinetobacter brisouii</i>	Mezcla de hidrocarburos	n/a	[20]
<i>Kosakonia oryzae</i>	n/a	n/a	n/a
<i>Brevibacterium sp.</i>	Glucosa, aceite de oliva, hexadecano	Glicolípido	[21]
<i>Bacillus circulans</i>	Glucosa	Lipopéptido	[22]
<i>Enterobacter ludwigii</i>	n/a	n/a	n/a

Dentro de la literatura, los géneros de bacterias productoras de metabolitos con actividad surfactante más estudiados son: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*,

Candida y *Rhodococcus* [23]. El uso de microorganismos empleando como sustrato glicerol crudo no es un término nuevo en la industria, Szigety 2012 [24], aisló y caracterizó microorganismos capaces de metabolizar glicerol crudo como única fuente de carbono, en su estudio mencionan la bacteria *Bacillus circulans*, indicándonos que este microorganismo se encuentra de manera natural en el glicerol y es capaz de metabolizarlo. Tarazona et al 2011 [25], listó los diferentes usos que se le pueden dar al glicerol como fuente de carbono a diferentes microorganismos, entre sus usos están los biotransformadores para producción de propanodiol, butanol, ácido cítrico, etanol y varios más; algunas bacterias nombradas en el documento relevantes en nuestro estudio son la *Escherichia coli* y el género *Enterobacter* donde se usaron para la producción de etanol.

No hay muchos estudios en revistas indexadas donde se hable del uso específico del glicerol crudo para la producción de biosurfactantes, dado la gran cantidad de otros productos que se pueden obtener de la transformación del glicerol y las problemáticas que estos metabolitos acarrearán, como la baja producción y costosa purificación; en los estudios donde se habla de biosurfactantes, emplean sustratos más contaminantes y agresivos con el medio ambiente que el glicerol.

3. METODOLOGÍA

3.1 CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Del cepario del grupo GIMBA se cultivaron 11 cepas bacterianas (Tabla 1) en cajas de Petri con medio Luria Bertani “LB” (Anexo A Tabla A1) a 30 °C por 24 h. Las cajas de Petri fueron conservadas a 4 °C y recultivadas cada 20 días.

3.2 PREPARACIÓN DE PRECULTIVOS

El medio usado para los precultivos fue LB (Anexo A Tabla A1). Se vertió 20 ml de dicho medio en frascos Erlenmeyer de 250 ml y se esterilizó en autoclave a 15 bar, 121°C por 20 minutos. Se tomó una colonia de cada cepa como inóculo y los precultivos se incubaron a temperatura ambiente, 180 rpm por 24 horas. El crecimiento bacteriano se determinó mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 600 nm en el espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, USA).

3.3 CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS

Los precultivos de cada cepa se utilizaron para inocular desde una DO de 0,05, con 50 ml de medio mínimo de sales (Anexo A Tabla A2) con glicerol crudo (Oleoflores S.A) como fuente de carbono en Erlenmeyers de 250 ml. Los cultivos se hicieron por triplicado; como control se utilizaron Erlenmeyers con medio de cultivo sin inocular. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente, 180 rpm durante 72 horas. Se midió la DO de cada medio a las 0, 8, 24, 30, 48 y 72 horas para realizar las curvas de crecimiento. Finalizadas las 72 horas, los cultivos fueron centrifugados

durante 20 minutos a 4000 rpm en la centrifuga PLC-025 (GEMMY CORP., Taiwán), y se separó el sobrenadante (surfactante crudo) para las siguientes pruebas. Se midió el pH al sobrenadante en el equipo pH/pOH HI 2211 (Hanna Instruments, Italia).

3.4 PRUEBA DE GOTA COLAPSADA

Es una prueba que indica si hay presencia o no de surfactantes en el sobrenadante; es basada en la desestabilización de la interface entre la muestra y una fase hidrofóbica [26]. Si hay presencia de surfactantes, la interfase entre el aceite (fase hidrofóbica) y la muestra (fase acuosa) se desestabilizará.

Se tomaron muestras de cada cultivo a las 0, 8, 12, 24, 48 y 72 horas y se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos en microcentrífuga PRISM (Labnet, USA) y se guardó el sobrenadante (surfactante crudo). En placas de cultivo de microorganismos, se llenó cada pozo con aceite de cocina usado pre-tratado (sobrenadante del aceite centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos) y se vertieron 40 µl de sobrenadante de medio de cultivo en cada pozo. Luego de 10 minutos se evaluó el colapso de la gota. El uso de aceite de cocina usado permitió contrastar mejor la desestabilización de la interfase de la muestra y la fase hidrofóbica, para la toma de evidencia gráfica de la prueba.

3.5 TENSIÓN SUPERFICIAL

Se define como tensión superficial (TS) a la capacidad de un líquido en su superficie de soportar una fuerza externa [26]. Es una propiedad útil de medir para conocer el efecto de metabolitos tensoactivos.

A 20 mL del surfactante crudo de cada una de las cepas bacterianas y al control sin inocular se le midió la tensión superficial, empleando un tensiómetro modelo 20 (Fisher, USA), con un anillo de platino-iridio por el método del anillo de Du Nouy. Se realizaron dos mediciones por muestra y se tomó el promedio entre los dos datos. Los resultados de esta prueba fueron mostrados como un porcentaje de reducción respecto al control, como se evidencia en la siguiente fórmula.

$$\%Reducción = \frac{TS_{control} - TS_{muestra}}{TS_{control}} \times 100$$

3.6 SELECCIÓN DE LAS MEJORES CEPAS CON ACTIVIDAD SURFACTANTE

Se seleccionaron los microorganismos para los cuales la prueba de colapso de gota dio positiva en algún tiempo de incubación o la reducción de la TS fuera mayor o igual al 20% respecto al control. Los microorganismos seleccionados fueron cultivados como fue descrito en la sección 2.3 y se tomaron medidas de TS a las 8, 12, 24, 48 y 72 horas.

3.7 ÍNDICE DE EMULSIFICACIÓN E₂₄

En este ensayo, se midió la capacidad de algunos surfactantes de emulsionar [27]. Se tomaron 3 ml de surfactante crudo de cada muestra de los microorganismos seleccionados, se mezclaron con 3 ml de parafina líquida y se agitó en vortex durante 2 minutos y se dejó en reposo 24 h. Se midió la altura de la capa emulsionada sobre la altura total y se calcula el índice E₂₄ con la siguiente ecuación:

$$E_{24} = \frac{h_{emulsión}}{h_{total}} \times 100\%$$

A pesar de ser un método cuantificable, no es una prueba contundente de la presencia o ausencia de biosurfactantes, ya que solamente los surfactantes de cadena hidrofóbica larga, tienen la característica de emulsionar [28].

3.8 SEMIPURIFICACIÓN DEL SURFACTANTE

Los sobrenadantes de los microorganismos seleccionados fueron acidificados con una solución de HCl 6 N hasta alcanzar un pH de 2, las muestras acidificadas fueron refrigeradas durante 24 h a una temperatura de 4°C. Se centrifugaron los sobrenadantes a 4000 rpm durante 20 minutos en la centrifuga modelo PLC-025 (Gemmy Corp., Taiwán). El biosurfactante semipurificado se obtuvo realizando tres extracciones sucesivas al cultivo con 200 ml de cloroformo-metanol de proporción volumétrica (2:1). La muestra se agitó en vortex y se separó la fase del cloroformo eliminando el solvente en su totalidad por evaporación.

3.9 CARACTERIZACIÓN DE SURFACTANTES

3.9.1 Rendimientos y espectroscopia infrarroja por transformada de fourier (FTIR) El precipitado sólido de la fase orgánica (cloroformo) del paso anterior fue pesado para calcular rendimientos; después, el material sólido se pasó por el espectrofotómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR); en este equipo se colocó una muestra no mayor a los 5 mg en una placa transparente, se comprimió la muestra y al pasar el haz de luz infrarrojo se midieron las variaciones en la absorción de energía de la muestra. Los espectros de ambos microorganismos se analizaron mediante el empleo de tablas IR (Anexo C).

3.9.2 Concentración micelar crítica (CMC) La concentración micelar crítica (CMC) es la cantidad máxima permitida de surfactante en la interface entre dos líquidos antes de saturar completamente la interfase, colapsar y formar micelas [29]; por encima de la concentración micelar crítica, no hay reducción significativa de la TS dado que la interfase está totalmente saturada con el surfactante [30]. En esta prueba se graficaron las concentraciones de diferentes diluciones acuosas del surfactante semipurificado vs. la tensión superficial (TS).

4. RESULTADOS

4.1 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS

En la Figura 1 se muestra la capacidad que tienen los microorganismos de crecer en glicerol crudo; se observa que solamente el microorganismo *Escherichia coli* presentó fase de latencia hasta aproximadamente las 6 h de cultivo.

La fase exponencial para las cepas *Shewanella putrefaciens*, *Acinetobacter brisouii*, *Bacillus circulans*, *Pseudomonas stutzeri*, *Escherichia coli*, *Kosakonia oryzae*, *Pseudomonas putida* y *Brevibacterium sp* llegaron hasta las 30 h mientras que para las cepas *Bacillus subtilis*, *Enterobacter ludwigii*, y *Sinorhizobium meliloti* llegaron hasta las 8 h. La curva de crecimiento para *Pseudomonas stutzeri* fue irregular comparada con las otras bacterias debido a que las bacterias se agruparon formando cúmulos durante el cultivo interfiriendo en la medida de la DO.

Se calculó la velocidad específica de crecimiento máxima (μ) y el tiempo de duplicación (t) (Tabla 2). La cepa con mayor μ fue *Bacillus subtilis* con un valor de $1,1 \text{ h}^{-1}$ y la menor μ fue para *Pseudomonas stutzeri* con un valor de $0,2 \text{ h}^{-1}$.

Figura 1. Curvas de crecimiento de microorganismos en medio mínimo de sales con glicerol (MMSCG)

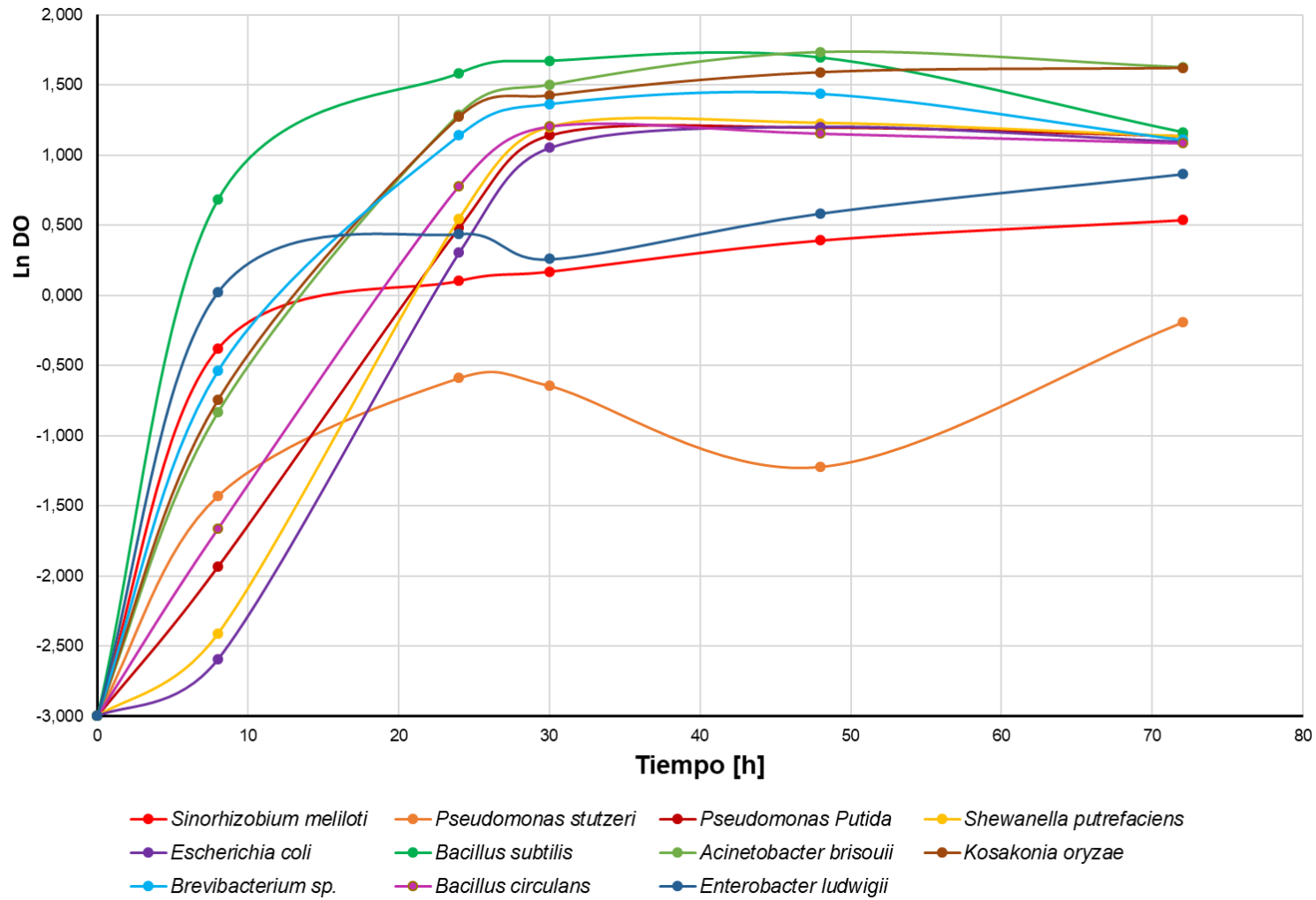


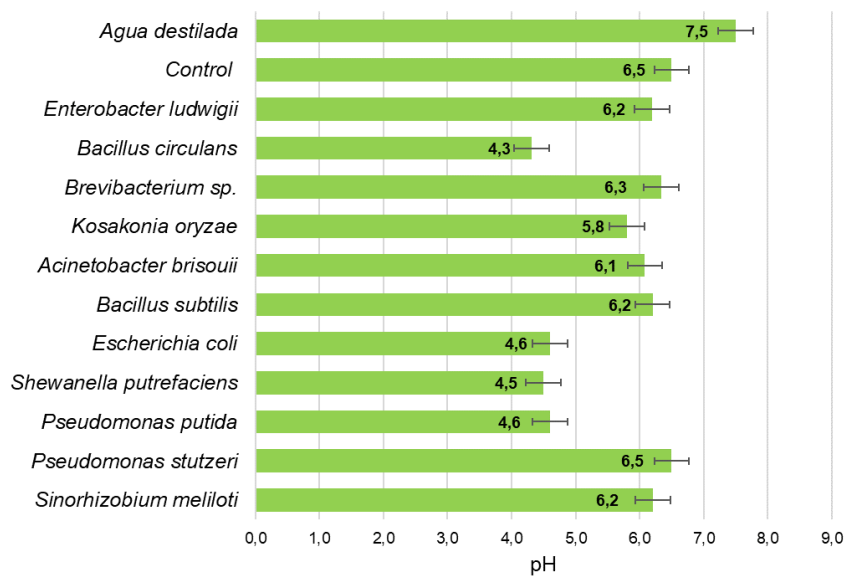
Tabla 2. Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t) para las cepas bacterianas estudiadas.

Bacteria	μ [h⁻¹]	t [h]
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	0,8	0,9
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0,2	3,2
<i>Pseudomonas putida</i>	0,3	2,1
<i>Shewanella putrefaciens</i>	0,4	1,8
<i>Escherichia coli</i>	0,4	1,8
<i>Bacillus subtilis</i>	1,1	0,7
<i>Acinetobacter brisouii</i>	0,3	2,0
<i>Kosakonia oryzae</i>	0,3	2,1
<i>Brevibacterium sp.</i>	0,3	2,2
<i>Bacillus circulans</i>	0,3	2,1
<i>Enterobacter ludwigii</i>	0,9	0,8

4.2 CAMBIO DEL pH CON EL CRECIMIENTO

La Figura 2 muestra los resultados de pH de los cultivos, medio sin inocular (control) y agua destilada finalizadas las 72 horas de incubación. El pH del control fue de 6,5, las cepas *Enterobacter ludwigii*, *Brevibacterium sp.*, *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus subtilis* y *Acinetobacter brisouii* mantuvieron el pH estable (en promedio pH 6,3) mientras que las cepas *Pseudomonas putida*, *Shewanella putrefaciens*, *Escherichia coli* y *Bacillus circulans* acidificaron significativamente el medio de cultivo con un pH promedio de 4,5.

Figura 2. Resultados de pH para los surfactantes crudos a las 72 horas de incubación



4.3 PRUEBA DE LA GOTA COLAPSADA

En la Figura 3, se muestra como ejemplo los resultados de la prueba de la gota colapsada para *Acinetobacter brisouii*, donde se observa el colapso de la interface sobrenadante/aceite a diferentes tiempos de incubación en comparación con los controles donde la gota quedó intacta. En la Tabla 3 se muestran los resultados del colapso de gota de los sobrenadantes de los microorganismos en diferentes tiempos de fermentación, donde las cruces indican la presencia de surfactante mediante el colapso de la muestra. De las 11 bacterias del cepario, las bacterias que dieron positivo en esta prueba fueron: *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter brisouii*, y *Kosakonia oryzae*.

Figura 3. Prueba de gota colapsada de *Acinetobacter brisouii*.

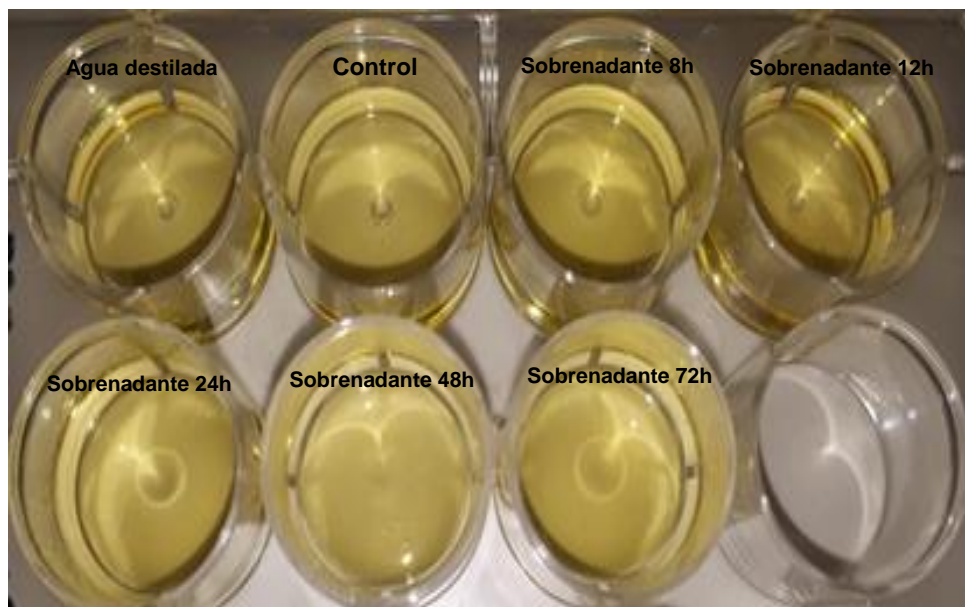


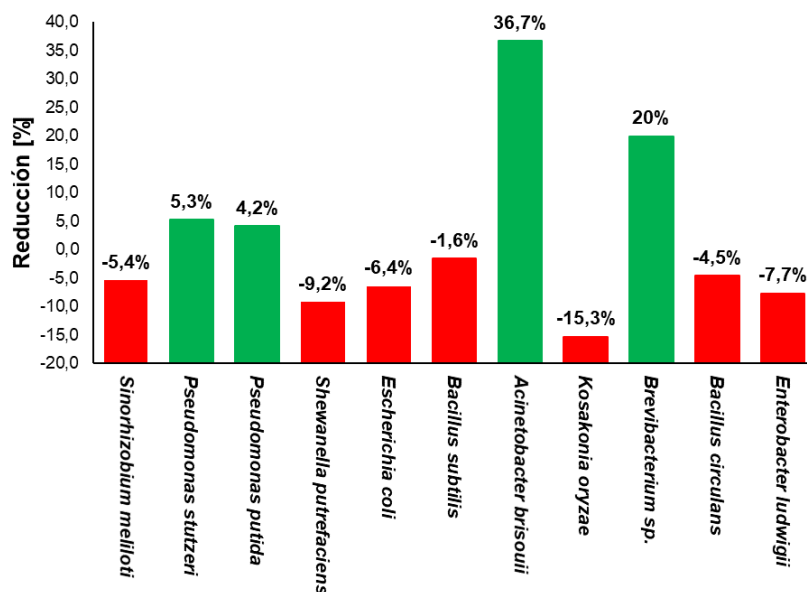
Tabla 3. Colapso de gota de los sobrenadantes de los microorganismos en diferentes tiempos de fermentación. (+) Positivo, (-) Negativo.

Bacterias	Colapso de gota				
	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-
<i>Shewanella putrefaciens</i>	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter brisouii</i>	-	-	+	+	+
<i>Kosakonia oryzae</i>	-	-	+	+	+
<i>Brevibacterium sp.</i>	-	-	-	-	-
<i>Bacillus circulans</i>	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter ludwigii</i>	-	-	-	-	-
Control	-	-	-	-	-
Agua destilada	-	-	-	-	-

4.4 TENSIÓN SUPERFICIAL DEL SURFACTANTE CRUDO

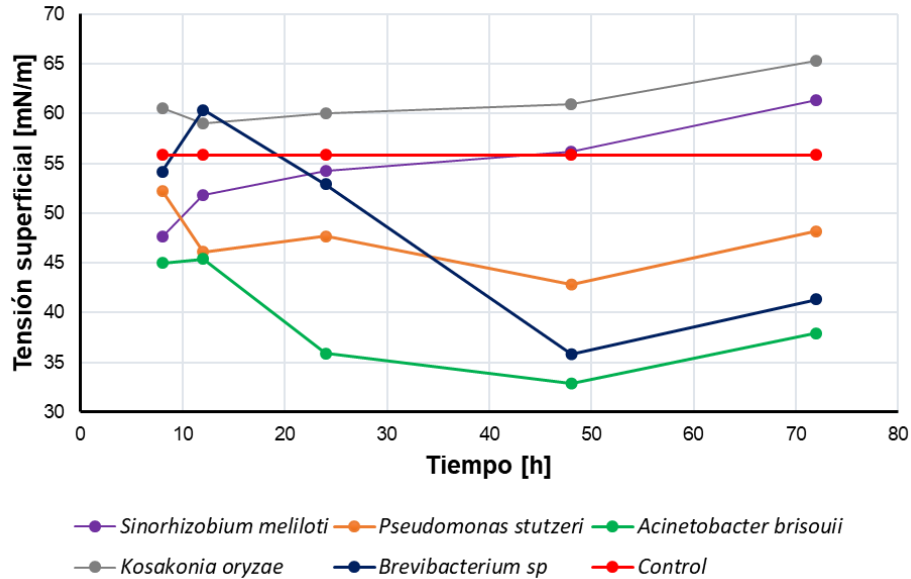
Las cepas bacterianas con mayor porcentaje de redujeron la TS con el surfactante crudo al finalizar el cultivo fueron *Acinetobacter brisouii* y *Brevibacterium sp.*

Figura 4. Porcentaje de reducción de la tensión superficial para el surfactante crudo luego de 72 horas de cultivo



Las bacterias seleccionadas por los criterios de reducción de la TS o colapso de gota fueron: *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter brisouii*, *Kosakonia oryzae* y *Brevibacterium sp.*, se repitió el crecimiento para tomar muestras de TS a las 0, 8, 12, 24, 48 y 72 horas (Figura 5).

Figura 5. Tensión superficial de los surfactantes crudos producidos por las especies seleccionadas

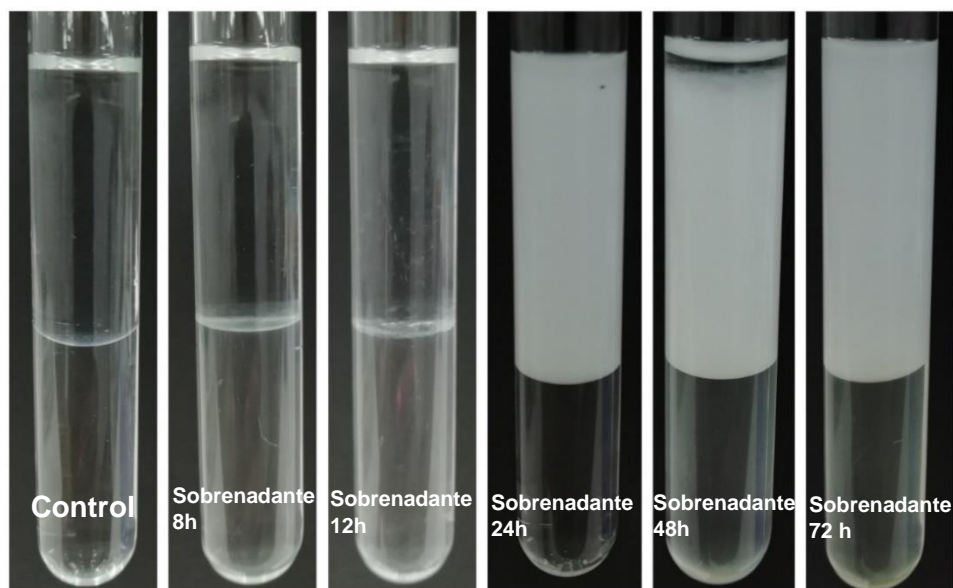


En Figura 5 se observa que las mejores cepas reductoras de TS son *Acinetobacter brisouii* y *Brevibacterium sp* con descensos de TS a 32,9 mN/m y 35,8 mN/m respectivamente a las 48 h de incubación respecto al control (55,9 mN/m). A las 48h de cultivo, estas bacterias se encontraban en su fase estacionaria (Figura 1); para ambos microorganismos, la fase exponencial termino a las 30 h, en este caso, la producción de metabolitos reductores de TS no está relacionada con el crecimiento de microorganismos, la producción de estos metabolitos se da entre las 30h y 48h de cultivo (fase estacionaria), siendo 48h el punto de la máxima reducción, a tiempos superiores, comienza a ver un aumento de TS, dándonos dos ideas preliminares; la primera idea es que para ambos microorganismos los metabolitos que producen no son de carácter primario sino secundario; por último, el aumento de la TS en el medio nos indica que el microorganismos ha agotado la fuente de carbono y está comenzando a metabolizar el surfactante en el medio.

4.5 ÍNDICE DE EMULSIFICACIÓN

La Figura 6 muestra como ejemplo el perfil de emulsificación de la bacteria *Acinetobacter Brisouii*. A partir de las 24 h se obtuvo un E₂₄ del 50%. Esto indica que el metabolito con actividad surfactante de este microorganismo tiene la capacidad de emulsionar.

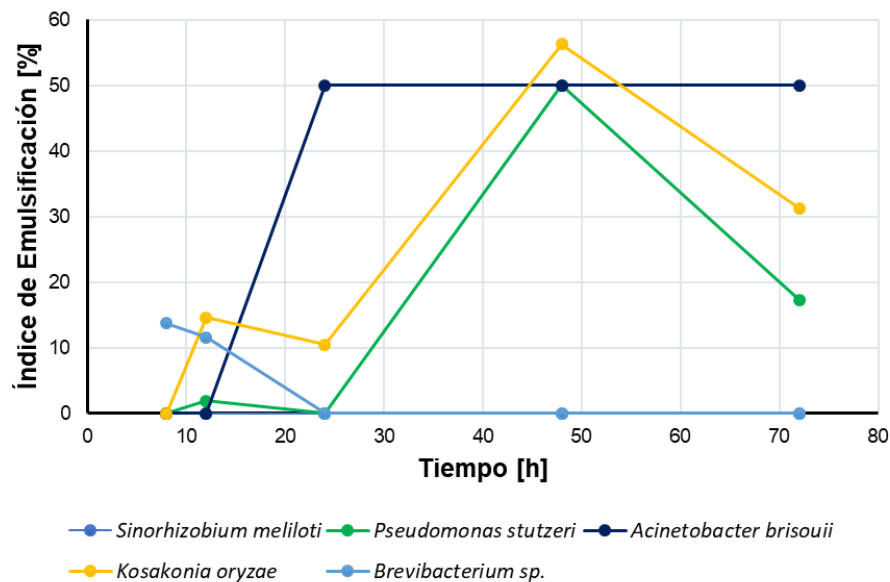
Figura 6. Perfil de emulsificación de *Acinetobacter brisouii*.



En la Figura 7 se observa la variación de E₂₄ en el tiempo de cultivo para las 5 cepas preseleccionadas. *Pseudomonas stutzeri* fue el único microorganismo que dio positivo en la prueba de gota colapsada a las 8h y 72h (Tabla 3), redujo la TS a 44 mN/m respecto al control al as 48 h de cultivo (Figura 5) y tuvo un E₂₄ del 50% a las 48 h de cultivo (Figura 7). *Sinorhizobium meliloti* no formó emulsión, no redujo TS a las 72 h (Figura 4) ni tuvo una reducción de TS apreciable durante su cultivo respecto al control (8 mN/m), *Kosakoria oryzae* produjo la mayor emulsificación a las 48 horas de fermentación con un E₂₄ de 57%; sin embargo, esta cepa no redujo la TS (Figura 5).

Las cepas *Pseudomonas stutzeri* y *Brevibacterium sp*, presentaron propiedades similares en la formación de emulsiones con un E₂₄ de 50% y 13% respectivamente, así como su capacidad de reducir la TS (Figura 5). Al ser el interés de este trabajo la reducción de la TS sobre la acción emulsificante, se seleccionaron las cepas *Acinetobacter Brisouii* y *Brevibacterium sp*, para la obtención del biosurfactante semipurificado.

Figura 7. Variación en el tiempo del Índice de emulsificación (E₂₄) del surfactante crudo para las cepas seleccionadas



4.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS SURFACTANTES SEMIPURIFICADOS

4.6.1 Caracterización por espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) Las bacterias *Acinetobacter brisouii* y *Brevibacterium sp.*, fueron los microorganismos donde hubo mayor reducción de la tensión superficial (TS) a las 48 horas de cultivo respecto al control. Luego de la semipurificación del

surfactante, la producción obtenida de biosurfactante fue de 187 mg/L para *Acinetobacter brisouii* y 50 mg/L para *Brevibacterium sp.*

Por aparte, en el espectro de la bacteria *Acinetobacter brisouii* (Figura B1, Anexo B) se observan 3 diferentes picos en la región de 3600 cm^{-1} a 2800 cm^{-1} , el pico en 3278 cm^{-1} indica la presencia de enlaces O-H en la muestra; entre los 2800 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} , se observan 2 señales cercanas los cuales indican la presencia de CH_2 o CH_3 , respaldado por el pico a 1454 cm^{-1} . Entre los $1850\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$, se observan varios picos entre los que sobresale uno a los 1643 cm^{-1} , característicos de los grupos carbonilos (aldehídos), concluyendo con la presencia de señales entre los $2900\text{-}2695\text{ cm}^{-1}$ indicando la presencia de enlaces carbonilos.

Para *Brevibacterium sp* (Figura B2, Anexo B) se observa un único y ancho domo en los 3296 cm^{-1} que evidencia la presencia de enlaces O-H. No se observa una banda en los 1645 cm^{-1} indicando la presencia de enlaces carbonilo (cetonas).

Ambos surfactantes semipurificados mostraron en sus espectros que están constituidas por enlaces de tipo C-H, C-O, O-H y todas las variaciones en los enlaces.

4.6.2 Concentración micelar crítica (CMC) En la Figura 8 se muestra la variación de la tensión superficial respecto al logaritmo de la concentración de surfactante semipurificado para *Acinetobacter brisouii*. El cambio significativo en los valores de tensión se da cuando el logaritmo natural de la concentración es cercano a (-6,00) correspondiente a una CMC de $2,48 \times 10^{-3}$ mg/ml, a valores superiores a esta concentración, no hay cambios significativos en la TS.

Para *Brevibacterium sp* (Figura 9) se observa el cambio significativo cuando el logaritmo natural de la concentración es aproximadamente (0,13), es decir la CMC es de 1,14 mg/ml.

Figura 8. Variación de la tensión con la concentración de surfactante semipurificado de *Acinetobacter brisouii*

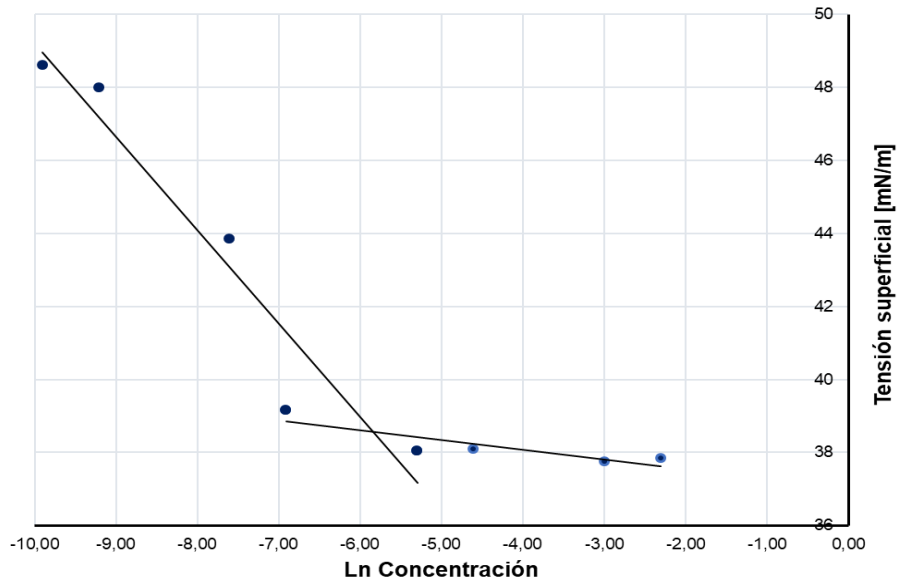
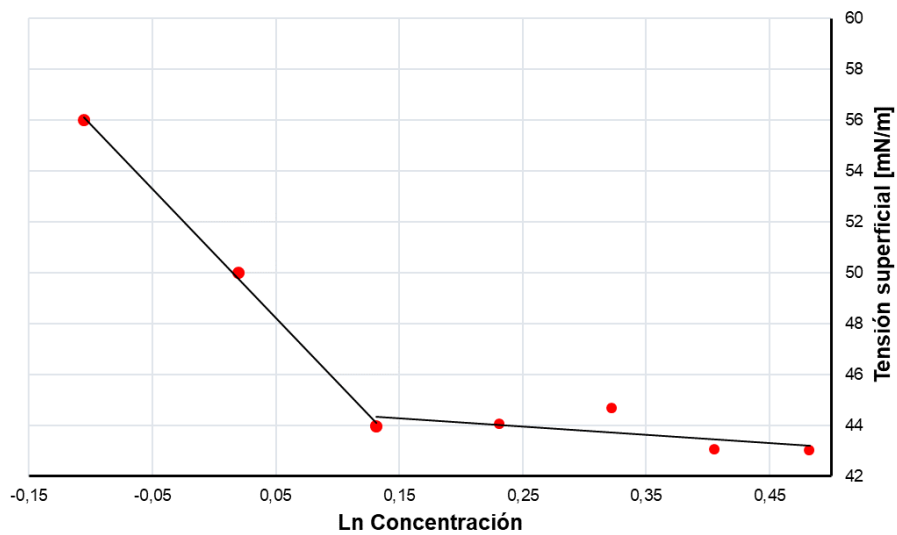


Figura 9. Comportamiento de la tensión superficial en agua destilada respecto al logaritmo de la concentración de surfactante semipurificado de *Brevibacterium sp* en agua destilada



5. CONCLUSIONES

- Se observó que todos los microorganismos del cepario tuvieron la capacidad de crecer en glicerol crudo con medio mínimo de sales, evidenciando el potencial del glicerol crudo como una fuente de carbono promisoría para procesos biotecnológicos.
- Las mejores cepas emulsoras fueron: *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter brisouii*, y *Kosakonia oryzae*; y las mejores cepas reductoras de TS fueron *Acinetobacter brisouii* y *Brevibacterium sp*, con descensos de TS a (33,5 mN/m) para la primera y (42,4 mN/m) para la segunda respecto al MMSCG (55,8 mN/m) a las 48 horas de incubación.
- La concentración micelar crítica (CMC) evidenció que el mejor surfactante producido entre las dos cepas caracterizadas fue el del microorganismo *Acinetobacter brisouii* ya que con una CMC $2,48 \times 10^{-3}$ mg/ml es capaz de reducir la TS del agua destilada de 65,9 mN/m a 39 mN/m.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] STRATTA, José. Biocombustibles: Los aceites vegetales como constituyentes principales del biodiesel. La paz: Departamento de Capacitación y Desarrollo de Mercado,2000.
- [2] GERVÁSIO, Paulo da silva, *et al.* Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. En: *Biotechnology Advances*, 2009.
- [3] BARÓN, Manuel, *et al.* Gestión de la cadena productiva del biodiesel: una revisión de la literatura. En: *Ingeniería*, 2013, vol.18, no.1., p. 84-117.
- [4] NORHASYIMI, Rahmat. Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: A critical review.En: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*,2010. p.987-1000.
- [5] KIM, Hs, *et al.* Characterization of a biosurfactant mannosyllerythritollipid produced from *Candida* sp. En: *Biotechnol*,1999. p.713-721.
- [6] KOSARIC, Nain, *et al.* BIOSURFACTANTS: Production and Utilization—Processes, Technologies, and Economics. En: *Biosurfactants Production Applications*, Vol. 159. 2014.
- [7] NITSCHKE, M. Biosurfactantes: Propiedades e aplicações. En: *Quim. Nova*, 2002. p. 772-776.
- [8] DE LA ROSA, Nuvia, *et al.* Biosurfactantes y su papel en la biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas. En: *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*,2014. p.47-67.
- [9] CORTÉS, Alejandro de Jesús, *et al.* Surfactantes biológicos con aplicación potencial en tecnología de alimentos: una revisión. En: *Biológicas*, 2013. p.16-23.

- [10] JIMENEZ ISLAS, Donaji; MEDINA MORENO, Sergio a. Y GRACIDA RODRIGUEZ, Jorge Noel. Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos: una revisión. Rev. Int. Contam. Ambient [online]. 2010, vol.26, n.1, p.65-84
- [11] VIJAYAKUMAR, S; SARAVANAN, V. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. En: Research Journal of microbiology,2015. p.181-192.
- [12] CHAKRABARTI, S. BACTERIAL BIOSURFACTANT: Characterization, antimicrobial and metal remediation properties. Ph.D. Thesis. Roudkela: National Institute of Technology. 2012
- [13] PAGLIARO, Mario. From Glycerol to Value-Added Products. En: Gesellschaft Deutscher Chemiker, 2007. p.4434-4440.
- [14] SAISA-ARD, K. Isolation and characterization of biosurfactants-producing bacteria isolated from palm oil industry and evaluation for biosurfactants production using low-cost substrates. En: Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology, 2013. p. 275-284.
- [15] SINGH, D.N., TRIPATHI, A.K. Coal induced production of a rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas stutzeri*, isolated from the formation water of Jharia coalbed. En: Bioresource Technology. 2013, vol. 128. p. 215-221.
- [16] SURYANTI, V. Optimization Production of Biosurfactant by *Pseudomonas*. Canada International Conference on Green and Renewable Energy Resources. Canada: IOP Publishing. 2017. p 1-5
- [17] KEELER, S. J. Estados Unidos Patente nº US 7,776,795 B2. 2008
- [18] OCHSNER, U. Isolation, Characterization, and Expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB Genes Encoding a Rhamnosyltransferase Involved in Rhamnolipid Biosurfactant Synthesis. En: THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1994. p.19787-19795.

- [19] HEE-SIK, K. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. En: *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997. p.41-46.
- [20] HAIYAN, J. Isolation and characterization of a newly isolated pyrene-degrading *Acinetobacter* strain USTB-X. En: *Environmental Science and Pollution Research*, 2014. p.2724-2732.
- [21] FERHAT, S. Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. En: *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011. p.1182-1188.
- [22] DAS, P. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived ofrom a marine *Bacillus circulans*. En: *Journal of Applied Microbiology*.2007
- [23] KHADYDJA, Dayelle, *et al.* Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. En: *International Journal of Molecular Sciences*, 2016. p.401-432.
- [24] SZIGETY, Esteban. Tensión superficial: un modelo experimental. En: *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*, 2012. p.393-400.
- [25]TARAZONA, N; RAMIREZ, N; MORENO, P; COMBARIZA, Y; & GUZMAN, C. Aislamiento y caracterización de microorganismos nativos y aprovechamiento del glicerol como única fuente de carbono. En: *Ion*. 2011, vol.24 no.2. p. 7-11.
- [26] LA FUENTE, Gustavo & CORNAGO, María. Glicerol: síntesis y aplicaciones. TRABAJO DE FIN DE MÁSTER. 2017.
- [27] WALTER, Vanessa. Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. New York: Springer. En S. Ramkrishna, biosurfactants,2010. p.1-13.

- [28] PACWA-PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; y CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. En: International Journal of Molecular Sciences. Vol. 12, No.1 (2011); p. 633-654.
- [29] AVILÁN, Alexandra. Implementación de surfactantes como método de tratamiento para aguas subterráneas contaminadas con DNAPLs. BOGOTÁ D.C, 2007.
- [30] MOROI, Y. Micelles. En: Plenum Press. (1992).
- [31] LALUCAT, J.; BENNASAR, A.; BOSCH, R.; GARCÍA-VALDÉS, E. & PALLERONI, N. J. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: En: *Biology of Pseudomonas stutzeri*. Vol. 70, No.2, (2006); p.510–547.

BIBLIOGRAFÍA

- AVILÁN, Alexandra. Implementación de surfactantes como método de tratamiento para aguas subterráneas contaminadas con DNAPLs. BOGOTÁ D.C, 2007.
- BARÓN, Manuel, *et al.* Gestión de la cadena productiva del biodiesel: una revisión de la literatura. En: Ingeniería, 2013, vol.18, no.1., p. 84-117.
- CHAKRABARTI, S. BACTERIAL BIOSURFACTANT: Characterization, antimicrobial and metal remediation properties. Ph.D. Thesis. Roudkela: National Institute of Technology. 2012
- CORTÉS, Alejandro de Jesús, *et al.* Surfactantes biológicos con aplicación potencial en tecnología de alimentos: una revisión. En: Biológicas, 2013. p.16-23.
- DAS, P. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived ofrom a marine *Bacillus circulans*. En: Journal of Applied Microbiology.2007
- DE LA ROSA, Nuvia, *et al.* Biosurfactantes y su papel en la biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas. En: Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal,2014. p.47-67.
- FERHAT, S. Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. En: International Biodeterioration & Biodegradation, 2011. p.1182-1188.
- GERVÁSIO, Paulo da silva, *et al.* Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. En: Biotechnology Advances, 2009.
- HAIYAN, J. Isolation and characterization of a newly isolated pyrene-degrading *Acinetobacter* strain USTB-X. En: Environmental Science and Pollution Research, 2014. p.2724-2732.

HEE-SIK, K. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. En: *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997. p.41-46.

JIMENEZ ISLAS, Donaji; MEDINA MORENO, Sergio a. Y GRACIDA RODRIGUEZ, Jorge Noel. Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos: una revisión. *Rev. Int. Contam. Ambient* [online]. 2010, vol.26, n.1, p.65-84

KEELER, S. J. Estados Unidos Patente nº US 7,776,795 B2. 2008

KHADYDJA, Dayelle, *et al.* Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. En: *International Journal of Molecular Sciences*, 2016. p.401-432.

KIM, Hs, *et al.* Characterization of a biosurfactant mannosyllerythritollipid produced from *Candida* sp. En: *Biotechnol*, 1999. p.713-721.

KOSARIC, Nain, *et al.* BIOSURFACTANTS: Production and Utilization—Processes, Technologies, and Economics. En: *Biosurfactants Production Applications*, Vol. 159. 2014.

LA FUENTE, Gustavo & CORNAGO, María. Glicerol: síntesis y aplicaciones. TRABAJO DE FIN DE MÁSTER. 2017.

LALUCAT, J.; BENNASAR, A.; BOSCH, R.; GARCÍA-VALDÉS, E. & PALLERONI, N. J. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: En: *Biology of Pseudomonas stutzeri*. Vol. 70, No.2, (2006); p.510–547.

MOROI, Y. Micelles. En: *Plenum Press*. (1992).

NITSCHKE, M. Biossurfactantes: Propiedades e aplicações. En: *Quim. Nova*, 2002. p. 772-776.

NORHASYIMI, Rahmat. Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: A critical review. En: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010. p.987-1000.

OCHSNER, U. Isolation, Characterization, and Expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB Genes Encoding a Rhamnosyltransferase Involved

in Rhamnolipid Biosurfactant Synthesis. En: THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1994. p.19787-19795.

PACWA-PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; y CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. En: International Journal of Molecular Sciences. Vol. 12, No.1 (2011); p. 633-654.

PAGLIARO, Mario. From Glycerol to Value-Added Products. En: Gesellschaft Deutscher Chemiker, 2007. p.4434-4440.

SAISA-ARD, K. Isolation and characterization of biosurfactants-producing bacteria isolated from palm oil industry and evaluation for biosurfactants production using low-cost substrates. En: Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology, 2013. p. 275-284.

SINGH, D.N., TRIPATHI, A.K. Coal induced production of a rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas stutzeri*, isolated from the formation water of Jharia coalbed. En: Bioresource Technology. 2013, vol. 128. p. 215-221.

STRATTA, José. Biocombustibles: Los aceites vegetales como constituyentes principales del biodiesel. La paz: Departamento de Capacitación y Desarrollo de Mercado, 2000.

SURYANTI, V. Optimization Production of Biosurfactant by *Pseudomonas*. Canada International Conference on Green and Renewable Energy Resources. Canada: IOP Publishing. 2017. p 1-5

SZIGETY, Esteban. Tensión superficial: un modelo experimental. En: Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias, 2012. p.393-400.

TARAZONA, N; RAMIREZ, N; MORENO, P; COMBARIZA, Y; & GUZMAN, C. Aislamiento y caracterización de microorganismos nativos y aprovechamiento del glicerol como única fuente de carbono. En: Ion. 2011, vol.24 no.2. p. 7-11.

VIJAYAKUMAR, S; SARAVANAN, V. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. En: Research Journal of microbiology,2015. p.181-192.

WALTER, Vanessa. Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. New York: Springer. En S. Ramkrishna, biosurfactants,2010. p.1-13.

ANEXOS

ANEXO A. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Tabla A1. LB

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Extracto de levadura	5 g/L
Trictona	10 g/L
Cloruro de sodio	10 g/L
Agar bacteriológico	15 g/L

Tabla A2. Medio mínimo de sales con glicerol crudo(MMSCG)

Componente	Concentración
Glicerol	12,5 [g L ⁻¹]
(NH ₄) ₂ SO ₄	6 [g L ⁻¹]
MgSO ₄	2 [mM]
KH ₂ PO ₄	25 [mM]
FeSO ₄	0,6 [mM]
MnSO ₄	0,054 [mM]
Na ₂ HPO ₄	40 [mM]
Na ₃ -Citrate	0,008 [mM]
CaCl ₂	0,007 [mM]

Tomado de: ALBARRACÍN ARIAS, JORGE ALBERTO y CARVAJALINO OLAVE, JUAN DIEGO. Evaluación de diferentes medios de cultivo para producción de biosurfactantes de *Bacillus subtilis* a partir de glicerol crudo. Tesis de pregrado Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. 2016. p 33.

ANEXO B. ESPECTROS DE PRODUCTOS METABÓLICOS DE LOS MICROORGANISMOS *ACINETOBACTER BRISOUII* Y *BREVIBACTERIUM SP.*

Figura B1. Espectro de metabolitos purificados de la fase cloroformo de *Acinetobacter brisouii*.

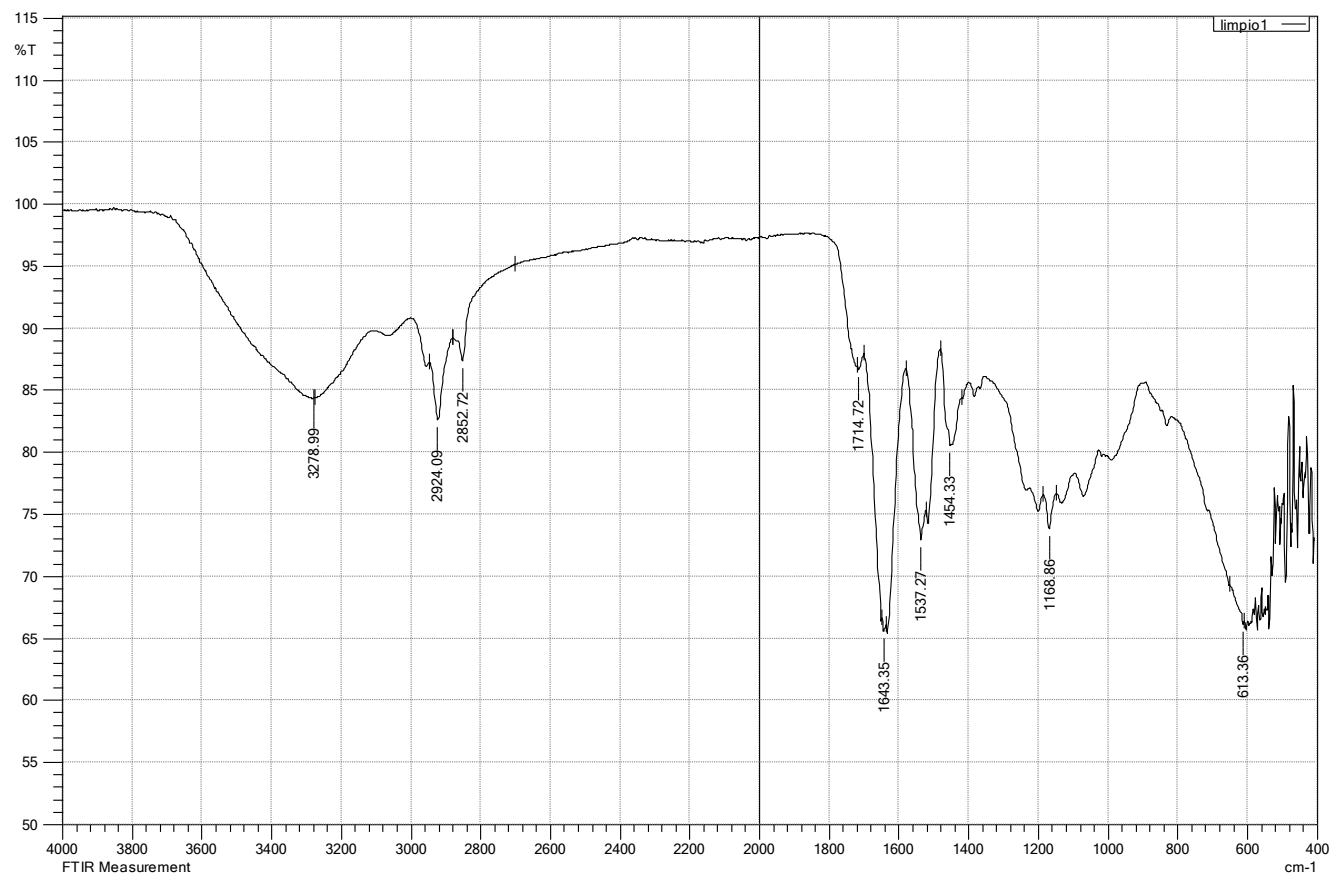
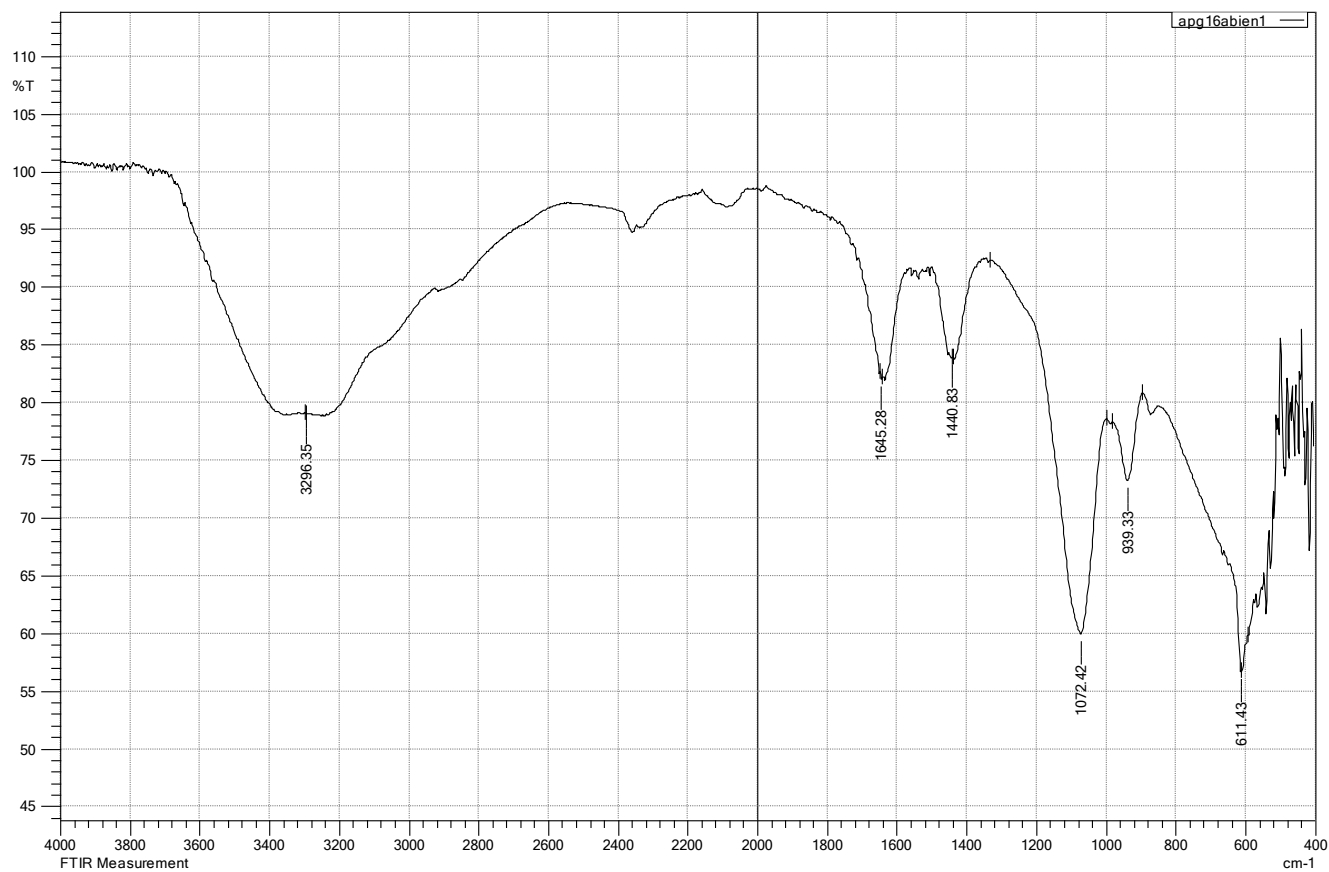


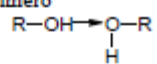
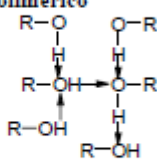
Figura B2. Espectro de metabolitos purificados de la fase cloroformo de *Brevibacterium* sp.



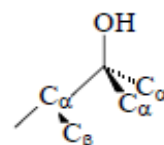
ANEXO C. TABLAS PARA LECTURA DE IR DE ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER.

TABLA IR : ALCOHOLES Y FENOLES.

Vibraciones de estiramiento del enlace O-H:

Estado del alcohol	Posición, cm^{-1}	Coefficiente ϵ	Forma	Notas
1) Libre, sin asociar:	3640-3610	30-100	Agudo	Medido en fase vapor o en disolventes no polares, pero si estos están húmedos, también aparece la señal del agua en 3710.
Primario, $-\text{CH}_2-\text{OH}$	3640	70		
Secundario, $\text{R}_2\text{CH}-\text{OH}$	3630	60-50		
Terciario, $\text{R}_3\text{C}-\text{OH}$	3620	45		
Fenoles, $\phi-\text{OH}$	3610			
2) Hidroperóxido: $-\text{O}-\text{O}-\text{H}$	3560-3530			
Puentes de hidrógeno:				
3) Dímero 	3600~3500		Agudo	No se observa normalmente, por ocultarlo la banda polimérica. También aquí aparecen otros puentes de hidrógeno con éteres, cetonas y aminas
4) Polimérico 	3400~3200	Grande	Ancho	También aquí aparecen las aminas (3500~3200) y la pequeña señal de sobretono del carbonilo. En muestras húmedas aparece la señal de estiramiento H-O-H (3600~3100), en cuyo caso también se observa la flexión en 1640~1615.
Puentes intramoleculares:				
5) Alcoholes polivalentes	3600~3500	50-100	Agudo	
6) puentes π	3600-3500			
7) Puente intramolec. con carbonilos, nitro, etc.	3200~2500		Ancho	Generalmente se pierde bajo la señal de los estiramientos C-H

Vibraciones de estiramiento del enlace C-OH:



Tipo de alcohol	Posición, cm^{-1}	Desplazamientos, cm^{-1}	Notas
Primario	1050 (1075~1025)	Ramificación en α : -15	Las insaturaciones pueden ser alquenos o aromáticos. Sobre β y mas lejos no influyen en la posición. Si tanto en α como en α' y α'' hay ramificaciones, descuenta otros 15 cm^{-1} .
Secundario	1100 (1150~1100)	Insaturación en α : -30	
Terciario	1125 (1200~1100)	Anillo en $\alpha-\alpha'$: -50	
Fenoles	1200 (1250~1150)	Insaturación en α y anillo $\alpha-\alpha'$: -90 Dieno conjugado en α : -140	

Vibraciones de torsión del enlace C-OH:

Posición (cm^{-1})	Forma	Notas
660 ± 50	Ancha	No es muy útil