

**EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES TENSOACTIVAS DEL  
BIOSURFACTANTE PRODUCIDO POR *BACILLUS SUBTILIS* UTILIZANDO  
GLICEROL RESIDUAL**

**ANGÉLICA GÓMEZ CORZO  
MÓNICA LORENA GÓMEZ RUGE**

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

**2017**

**EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES TENSOACTIVAS DEL  
BIOSURFACTANTE PRODUCIDO POR *BACILLUS SUBTILIS* UTILIZANDO  
GLICEROL RESIDUAL**

**ANGÉLICA GÓMEZ CORZO  
MÓNICA LORENA GÓMEZ RUGE**

**Trabajo de grado como requisito para optar el título de: Ingeniero Químico**

**Director**

**VIVIANA SÁNCHEZ TORRES**

**Ingeniera Química, Ph.D**

**Codirector**

**JULIO ANDRÉS PEDRAZA AVELLA**

**Ingeniero Químico, Químico, M.Sc., Dr.**

**JORGE ALBERTO ALBARRACÍN ARIAS**

**Ingeniero Químico**

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

**2017**

## DEDICATORIA

*A Dios y a la Virgen por permitirme culminar esta etapa de la mano de mi familia.  
A mi hermosa madre por su amor y apoyo absoluto, por brindarnos lo mejor a mi hermana  
y a mí.*

*A mi Hermana por implantar en mí la disciplina, dedicación y ser mi alcahueta favorita.  
Papi, mi pedacito de cielo esto es para ti.*

*A las personas que hicieron parte de mi trascender por la universidad, docentes y amigos.*

***Mónica Gómez***

*A Dios, a mi mama y tía por su apoyo incondicional*

*A cada docente que de alguna u otra manera contribuyó en mi desarrollo como profesional*

*A la familia Hernández Osorio por su colaboración y en especial a mi novio por su  
compañía y ayuda ante momentos de dificultad*

*A mis amigas incondicionales Laura Castellanos y Angélica Otero por su motivación y  
paciencia.*

***Angélica Gómez Corzo***

## **AGRADECIMIENTOS**

En primera instancia damos gracias a Dios por permitirnos culminar esta etapa satisfactoriamente. A la Escuela de Ingeniería química por abrir sus puertas y ser el centro del conocimiento durante el recorrido de nuestra carrera.

A los Doctores Viviana Sánchez Torres y Julio Andrés Pedraza Avella por brindarnos la confianza para llevar a cabo esta investigación, por el respaldo y disposición como directores de esta tesis.

Al Ingeniero y codirector Jorge Alberto Albarracín por ser el guía en cada paso. Por brindarnos su conocimiento, tiempo, paciencia y motivación para el desarrollo de esta tesis.

Al Grupo de Investigaciones en Minerales, Biohidrometalurgia y Ambiente - GIMBA y al Grupo de Investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular – CINBIN por la disposición de los laboratorios, suministro de materiales y equipos.

A Yury López y Victor Lizcano por el acompañamiento en las distintas experimentaciones llevadas a cabo durante el trayecto de la tesis.

A las diferentes personas que directa o indirectamente estuvieron presentes opinando, corrigiendo y colaborando para concluir esta tesis.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN .....	14
1. METODOLOGÍA.....	18
1.1 MICROORGANISMO.....	18
1.2 PRECULTIVO .....	19
1.3 FERMENTACIÓN .....	19
1.4 EXTRACCIÓN DEL BIOSURFACTANTE .....	20
1.5 CONSUMO DE SUSTRATO.....	21
1.6 CUANTIFICACIÓN DEL BIOSURFACTANTE.....	21
1.7 APLICACIÓN DEL BIOSURFACTANTE .....	21
1.7.1 ESTABILIDAD DEL BIOSURFACTANTE.....	21
1.7.2 REMOCIÓN DE METALES DE AGUAS CONTAMINADAS.....	22
1.7.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	23
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	24
2.1 CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>BACILLUS SUBTILIS</i> ATCC6633 .....	24

<b>3. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES TENSOACTIVAS DEL BIOSURFACTANTE.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 ESTABILIDAD DEL BIOSURFACTANTE.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1.1 EFECTO DEL PH .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1.2 EFECTO DE LA TEMPERATURA .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1.3 EFECTO DE SALES.....</b>	<b>30</b>
<b>4. REMOCIÓN DE METALES .....</b>	<b>33</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>35</b>
<b>6. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>36</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>37</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>44</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Molécula de surfactina. ....	16
Figura 2. Diagrama de flujo metodología.....	18
Figura 3. Curva de crecimiento de <i>B. subtilis</i> en MMSGLY.....	24
Figura 4. Anova solvente – pH.....	28
Figura 5. Estabilidad del biosurfactante a diferentes pH. ....	28
Figura 6. Estabilidad del biosurfactante a diferentes temperaturas.....	30
Figura 7. Anova solvente – temperatura .....	30
Figura 8. Efecto de nacl en la estabilidad del biosurfactante .....	31
Figura 9. Anova solvente – %NaCl .....	32
Figura 10. Remoción de metales Cr <sup>3+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> en solución de biosurfactante a 24 y 48 horas .....	34

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Medio mínimo de sales con glicerol crudo.....	19
Tabla 2. Variables de estabilidad del biosurfactante .....	21
Tabla 3. Rendimientos del biosurfactante. ....	25

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
<b>Anexo A. Aplicaciones industriales de surfactantes químicos y biosurfactantes .....</b>	<b>44</b>
<b>Anexo B. Medio de Luria Bertani.....</b>	<b>46</b>
<b>Anexo C. Método de peso seco biomasa.....</b>	<b>47</b>
<b>Anexo D. Medio mínimo de sales con glicerol crudo MSMSCG. ....</b>	<b>48</b>
<b>Anexo E. Datos de la curva de crecimiento de <i>B.subtilis</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>Anexo F. Curva de calibración del glicerol crudo .....</b>	<b>50</b>
<b>Anexo G. Producción total del biosurfactante .....</b>	<b>51</b>
<b>Anexo H. Análisis Estadístico ANOVA para los índices de emulsificación obtenidos con glicerol (STATGRAPHICS centurión XV versión 15.2.06).....</b>	<b>53</b>
<b>Anexo I. Prueba de hipótesis de comparación para remoción de metales (STATGRAPHICS centurión XV versión 15.2.06).....</b>	<b>68</b>

## RESUMEN

**TÍTULO:** EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES TENSOACTIVAS DEL BIOSURFACTANTE PRODUCIDO POR *BACILLUS SUBTILIS* UTILIZANDO GLICEROL RESIDUAL\*

**AUTOR:** ANGÉLICA GÓMEZ CORZO, MÓNICA LORENA GÓMEZ RUGE\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Biosurfactantes, glicerol, *Bacillus subtilis*, surfactina.

### CONTENIDO:

A partir de un medio mínimo de sales mejorado, con glicerol como fuente de carbono, subproducto proveniente de la industria del biodiesel, se evaluaron las propiedades tensoactivas del biosurfactante producido por la cepa *Bacillus subtilis*.

Se realizó pruebas de estabilidad al biosurfactante variando las condiciones ambientales de temperatura, salinidad y pH, por medio del índice de emulsificación y a la vez se evaluó la cantidad de iones metálicos removidos de soluciones estándar de metales (cromo, cobre, plomo, níquel y zinc) por medio de la técnica de absorción atómica. Se encontró que el biosurfactante alcanzó un mayor rendimiento de producción (1,79 g L<sup>-1</sup>) en comparación con nutrientes similares en el medio y glucosa como sustrato, también presentó buena acción emulsificante con solventes como benceno, hexano y heptano, destacando el benceno con 34 %.

Los porcentajes máximos de metales removidos con el biosurfactante, se encuentran en un rango de 10 % a 80 % por encima de los surfactantes sintéticos, como el dodecilsulfato sódico (SDS), lo que conlleva a implementar el biosurfactante en la biorremediación de metales en Colombia, especialmente de metales tóxicos como plomo y zinc. Además, el biosurfactante puede ser utilizado en la recuperación de hidrocarburos, mitigando el impacto ambiental en suelos y aguas.

---

\* Proyecto de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química, Directores: Viviana Sánchez Torres y Julio Andrés Pedraza Avella

## ABSTRACT

**TITLE:** EVALUATION OF THE TENSIOACTIVE PROPERTIES OF THE BIOSURFACTANT PRODUCED BY *BACILLUS SUBTILIS* USING RESIDUAL GLYCEROL\*

**AUTHORS:** ANGÉLICA GÓMEZ CORZO, MÓNICA LORENA GÓMEZ RUGE\*\*

**KEY WORDS:** Biosurfactants, glycerol, *Bacillus subtilis*, surfactin.

### DESCRIPTION:

From an improved minimal medium of salts with glycerol as a carbon source, by-product from the biodiesel industry, the surfactant properties of the biosurfactant produced by the *Bacillus subtilis* strain were evaluated.

Biosurfactant stability tests were performed by varying the environmental conditions of temperature, salinity and pH by means of the emulsification index and at the same time the amount of metal ions removed from standard solutions of metals (chromium, copper, lead, nickel and zinc) by means of the atomic absorption technique. It was found that the biosurfactant achieved a higher production yield (1.79 g L<sup>-1</sup>) compared to similar nutrients in the medium and glucose as substrate, also showed good emulsifying action with solvents such as benzene, hexane and heptane, with benzene with 34%.

The maximum percentages of metals removed with the biosurfactant are in the range of 10% to 80% above synthetic surfactants, such as sodium dodecylsulfate (SDS), which leads to the biosurfactant in the bioremediation of metals in Colombia, especially toxic metals such as lead and zinc. In addition, the biosurfactant can be used in the recovery of hydrocarbons, mitigating the environmental impact on soils and waters.

---

\* Project of grade

\*\* Physical and Chemical Engineering's Faculty, Chemical Engineering School,  
Tutors: Viviana Sánchez Torres and Julio Andrés Pedraza Avella

## INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha generado interés en la producción y comercialización de biodiesel a nivel mundial, gracias a que contribuye a la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero, una posible sustitución de los combustibles fósiles y se prevé un aumento del 27% en la producción hasta el 2024 [1]. Actualmente Colombia posee un gran potencial para convertirse en líder mundial en la producción de biodiesel, debido a que cuenta con grandes extensiones de terrenos que pueden destinarse al cultivo de palma de aceite, sin necesidad de deforestar o poner en riesgo la producción alimentaria del país [2]. Además, Colombia cuenta con nuevas políticas públicas para la industria del biodiesel, incentivando el desarrollo del sector palmicultor y la generación de empleos. Logrando así, una tasa de crecimiento del 46,9% en la producción de biodiesel para el 2016, en comparación con el 2015 [3]. Este hecho posiciona a Colombia como el tercer productor de biodiesel después de Brasil y Argentina en Sudamérica [4].

Además de jugar un papel importante en la economía del país, el uso del biodiesel ha traído otros beneficios, debido a su menor cantidad de azufre y compuestos aromáticos, mayor eficiencia en la combustión, biodegradabilidad e independencia del petróleo para su producción [5]. Sin embargo, el aumento en la producción de biodiesel ha generado una sobreoferta de glicerol crudo, dado que por cada 1 kg de biodiesel se genera 10 kg de glicerol [6]. Aunque el glicerol es utilizado como materia prima para la elaboración de productos químicos y alimento para animales [7], producción de jabón, entre otros, la refinación del glicerol crudo para remover sus impurezas no es económicamente viable.

Es así, como el glicerol crudo cobra importancia en la comunidad científica buscando nuevas aplicaciones para implementarlas en los diferentes sectores de la

economía. En la actualidad los bioprocesos resultan ser una alternativa atractiva para el uso del glicerol crudo, ya que no requiere un tratamiento previo y tiene la ventaja de tener bajo costo sobre otros sustratos comerciales como la glucosa y celulosa, debido a que el 50% de los costos de producción en los procesos biotecnológicos son referentes a la materia prima [8]. El glicerol está siendo utilizado como fuente de energía en el metabolismo de diversos microorganismos, *Clostridium*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Bacillus*, los cuales producen metabolitos 1,3 propanodiol, butanol, ácido cítrico, ácido láctico, polihidroxicanoatos y biosurfactantes [9].

*Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva que crece adecuadamente a un pH de 7 y en condiciones mesofílicas entre 25 y 37 °C [10][11]. Las especies del género *Bacillus* se consideran un grupo adecuado para la síntesis industrial de biosurfactantes debido a que poseen bajo requerimiento de nutrientes, altas velocidades de crecimiento y pueden crecer bajo condiciones aerobias o anaeróbicas [12].

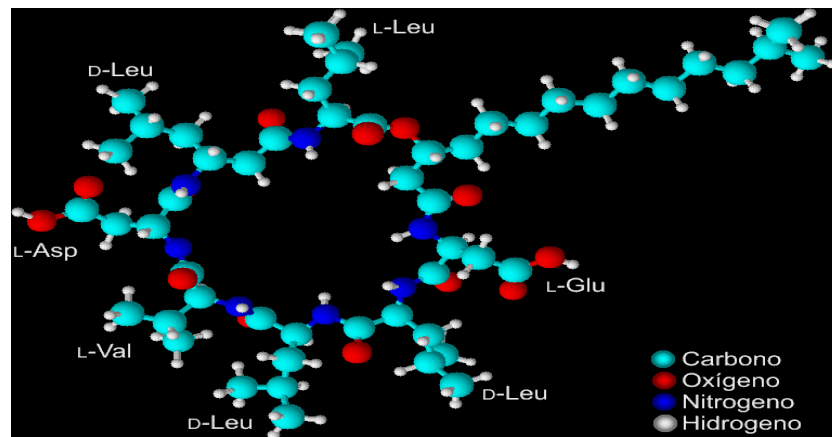
Como una alternativa viable con el medio ambiente, la bacteria *Bacillus subtilis* y sus metabolitos, pueden ser utilizados en procesos de biorremediación de suelos y aguas, como la remoción de metales e hidrocarburos. Los metales presentes en las fuentes hídricas no se degradan, lo que compromete el uso de este recurso y la remediación por métodos químicos de estos ambientes contaminados es costosa [13]. De igual manera, los surfactantes sintéticos, los cuales facilitan el transporte, recuperación y movilidad de los hidrocarburos a través de tuberías, son altamente tóxicos y no degradables [14] afectando el medio ambiente [15].

Los biosurfactantes son moléculas anfifílicas de origen microbiano las cuales actúan preferentemente en la interfase entre medios polares y no polares [16]. Cabe destacar que los biosurfactantes de bajo peso molecular son eficientes para reducir la tensión superficial e interfacial, mientras que los biosurfactantes de alto peso

molecular son más efectivos para la estabilización de emulsiones aceite-agua [17]. Las principales ventajas de los biosurfactantes son la baja toxicidad, alta biodegradabilidad, compatibilidad con el medio ambiente, formación de espuma, selectividad, ser sintetizados a partir de sustratos renovables y capacidad de adaptarse a diferentes rangos de pH, salinidad y temperatura sin perder sus propiedades funcionales [18] (Anexo A).

A partir de esto, se plantea producir surfactina, un lipopéptido con actividad surfactante proveniente de *Bacillus subtilis* (Figura 1), producido por primera vez en 1968 por Arima et al. [19], y desde entonces las investigaciones sobre los biosurfactantes se enfocaron en la optimización de medios con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, así como niveles de concentración, con el propósito de mejorar la producción de biotensoactivos [20].

**Figura 1. Molécula de surfactina.**



Fuente: Tomada de J. A. Albarracín and J. D. Carvajalino, “Evaluación de diferentes medios de cultivo para la producción de biosurfactantes de bacillus subtilis a partir de glicerol crudo.,” 2016. [21]

Además, en recientes trabajos realizados en el grupo GIMBA, se formuló un medio para el cultivo de *Bacillus subtilis* con el que se logró alcanzar un rendimiento de  $1,192 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  del biosurfactante y un índice emulsificante de 70% usando glicerol residual como fuente de carbono [21].

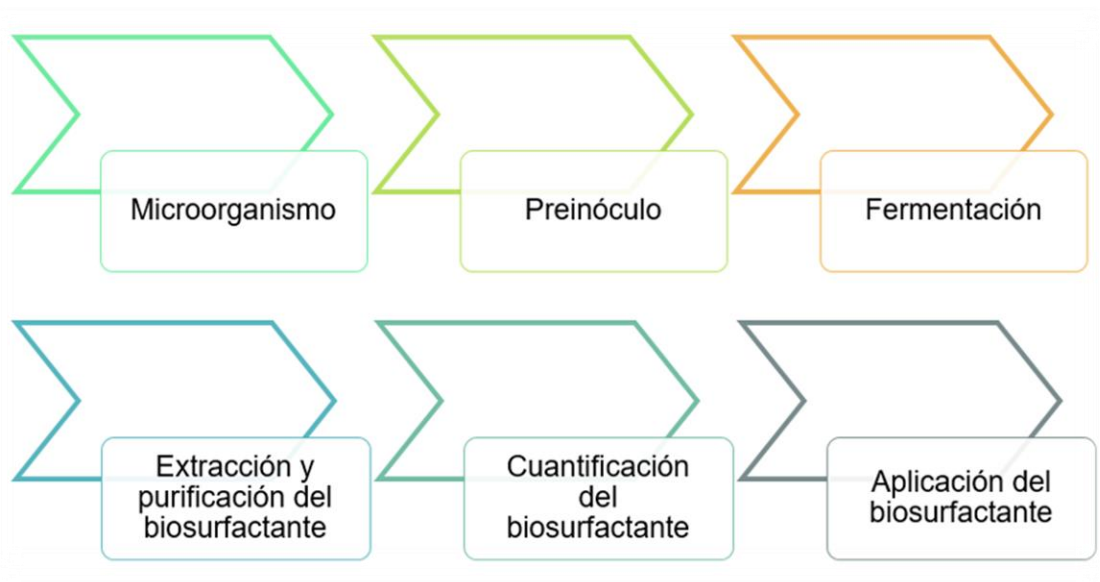
Paralelamente, en otros estudios realizados por Franca et al. [22] produce un biosurfactante proveniente de *Bacillus subtilis*, el cual presenta mayor potencial de eliminación de zinc de un efluente contaminado, 41% más que surfactantes químicos. Así mismo, Whang et al., [23] reportó que al adicionar 40 mg·L<sup>-1</sup> de surfactina en sistemas diésel-agua, ésta promovía la degradación de diésel hasta en un 94%. Por lo tanto, estas investigaciones destacan el potencial de la surfactina para aplicaciones ambientales.

Por lo cual, se busca determinar las condiciones fisicoquímicas apropiadas para la utilización del biosurfactante producido por *Bacillus subtilis*, utilizando glicerol crudo como fuente de carbono, evaluando la estabilidad del biosurfactante producido ante cambios de pH, temperatura y salinidad, mediante el índice de emulsificación para diferentes hidrocarburos y de ésta manera cuantificar la remoción de metales en agua gracias a su acción. Así mismo, se plantea establecer las curvas de crecimiento de *B. subtilis*, consumo de glicerol residual y producción de biosurfactante para determinar los diferentes rendimientos.

## 1. METODOLOGÍA

En la Figura 2 se presenta el esquema de la metodología que se siguió en este proyecto de investigación.

**Figura 2. Diagrama de flujo metodología**



### 1.1 MICROORGANISMO

La cepa *B. subtilis* ATCC6633 fue adquirida del Biofilms and Biotechnology Laboratory en Pennsylvania State University. Esta cepa se cultivó en cajas de petri con medio Luria Bertani "LB" (Anexo B) a 37 °C por 24 h y se conservaron a 4 °C. La cepa fue recultivada cada 20 días.

## 1.2 PRECULTIVO

Se realizaron precultivos por duplicado a partir de colonias individuales en 25 mL de LB esterilizado a 15 bar, 121 °C por 20 min. Los cultivos se incubaron a 37 °C, 180 rpm por 24 h. El crecimiento celular se midió mediante densidad óptica (DO) a 600 nm usando un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Genesys 10S UV/Vis, China).

## 1.3 FERMENTACIÓN

Se utilizó glicerol como única fuente de carbono, obtenido de la empresa Oleoflores S.A., Valledupar, Colombia. Se preparó 50 mL de medio mínimo de sales con glicerol crudo (MMSGLY) mejorado (Tabla 1), a pH 7 en frascos Erlenmeyer de 250 mL esterilizados previamente. El medio MMSGLY fue modificado mediante un diseño experimental variando la concentración de las sales de hierro, magnesio, manganeso y potasio con el fin de aumentar la producción de biosurfactante obtenido por el microorganismo [21].

Los cultivos fueron inoculados con 2 mL de precultivo, se incubaron a 37 °C, 180 rpm por 48 horas [11] y las fermentaciones se realizaron por triplicado. El crecimiento celular fue medido a diferentes tiempos a lo largo de la fermentación, por medio de un espectrofotómetro a 600 nm (Thermo Scientific, Genesys 10S UV/Vis, China). Por último, se midió la cantidad de biomasa producida por determinación de peso seco (Anexo C).

**Tabla 1. Medio mínimo de sales con glicerol crudo.**

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Glicerol	12,5 [g·L <sup>-1</sup> ]
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6 [g·L <sup>-1</sup> ]
MgSO <sub>4</sub>	2 [mM]
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25 [mM]

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
FeSO <sub>4</sub>	0,6 [mM]
MnSO <sub>4</sub>	0,054 [mM]
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40 [mM]
Na <sub>3</sub> -Citrato	0,008 [mM]
CaCl <sub>2</sub>	0,007[mM]

Fuente: Tomada de J. A. Albarracín and J. D. Carvajalino, "Evaluación de diferentes medios de cultivo para la producción de biosurfactantes de bacillus subtilis a partir de glicerol crudo.," 2016. [21] Los controles negativos fueron preparados con medio MMSGLY, sin inocular a las mismas condiciones de las fermentaciones. La velocidad específica de crecimiento se determinó según la siguiente ecuación:

$$\ln X = \mu_{max} + \ln X_0 \quad (\text{Ecuación 1})$$

*X*: concentración final de biomasa [ $g \cdot L^{-1}$ ]

*X*<sub>0</sub>: concentración inicial de biomasa [ $g \cdot L^{-1}$ ]

$\mu_{max}$ : velocidad específica de crecimiento [ $h^{-1}$ ]

#### 1.4 EXTRACCIÓN DEL BIOSURFACTANTE

Se retiró la biomasa por centrifugación durante 15 min, 4160 g a temperatura ambiente (Gemmyco, Centrifuge model PLC-015, USA). El sobrenadante libre de biomasa se acidificó con HCl 6 N hasta pH= 2 y se dejó en reposo durante 24 h a 4°C para la precipitación del biosurfactante. Nuevamente, se centrifugó el sobrenadante durante 20 minutos a 4160 g y se descartó el sobrenadante, a la torta se le adicionó 5 mL de una mezcla cloroformo-metanol (2:1) y 3 mL de agua destilada para la extracción del biosurfactante. Posteriormente se agitó vigorosamente toda la mezcla y se dejó en reposo durante 24 h a temperatura ambiente para la separación de las fases. Se descartó la fase inorgánica (metanol-agua) y la fase orgánica resultante que contiene el producto, se evaporó en una cabina extractora. Luego de que la muestra es secada, el precipitado se diluyó en una solución de TRIS-HCl (50 mM) a pH= 8 para su caracterización [24].

## 1.5 CONSUMO DE SUSTRATO

Una alícuota del sobrenadante libre de células se analizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), para cuantificar el glicerol consumido por los microorganismos durante la fermentación. Se utilizó una columna Coregel 107H acoplado al cromatógrafo Dionex Ultimate 3000, en modo isocrático a 60 °C, flujo 0,6 mL·min<sup>-1</sup>. La fase móvil fue ácido sulfúrico 8 mM y tiempo de análisis 32 minutos. Se inyectaron 20 µL de muestra previamente filtrada a través de filtros PVDF (0,45 µm) [25].

## 1.6 CUANTIFICACIÓN DEL BIOSURFACTANTE

El biosurfactante producido por *B. subtilis*, se cuantificó mediante el método de turbidimetría (HACH, 2100N turbidimeter, USA). Se realizó una curva de calibración con soluciones de biosurfactante diluido en TRIS-HCL (pH=8) a diferentes concentraciones (0,075, 0,1, 0,5, 0,75 y 1 g·L<sup>-1</sup>). Cada muestra se sometió a agitación y calentamiento para homogenizar, los valores obtenidos en Unidades Nefelométricas de Turbidez (NTU) se graficaron frente a la concentración de biosurfactante para obtener un modelo matemático [26].

## 1.7 APLICACIÓN DEL BIOSURFACTANTE

**1.7.1 Estabilidad del biosurfactante.** Los estudios de estabilidad fueron evaluados mediante la actividad emulsificante ( $E_{24}$ ) del biosurfactante a diferentes condiciones de pH, temperatura y salinidad (Tabla 2).

**Tabla 2. Variables de estabilidad del biosurfactante [24].**

Variables <sup>1</sup>	Valores
------------------------	---------

<sup>1</sup> Condiciones estándar: T=25°C, pH =8, y 0% NaCl

pH	6, 8,10,12
Temperatura (°C) <sup>2</sup>	4, 25, 50, 75
NaCl (%p·v <sup>-1</sup> )	2,5, 5,10, 15

El índice  $E_{24}$  fue evaluado vertiendo en un tubo de ensayo 3 mL de la solución de biosurfactante a una concentración de 1 g·L<sup>-1</sup> y 3 mL de sustrato hidrofóbico. Posteriormente se mezclaron los tubos en vortex a alta velocidad durante 2 min y se mantuvieron en condiciones estáticas durante 24 h. Los hidrocarburos analizados fueron: hexano, heptano y benceno. Para calcular el índice de emulsificación se midió la altura que tiene la fase emulsificada y se dividió entre la altura total (ecuación 2) [27].

$$\%E_{24} = \frac{\text{Altura de la emulsión } (H_e)}{\text{Altura total } (H_T)} * 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

**1.7.2 Remoción de metales de aguas contaminadas.** Soluciones estándar que contenían 1000 ppm de cobre, cromo, plomo, zinc y níquel fueron sometidas a la acción del biosurfactante (0,25 g·L<sup>-1</sup>, temperatura ambiente y pH=10), con una relación volumétrica de solución de metal a biosurfactante de 3:1 en un agitador lineal a 30 °C y 150 rpm. A partir de lo anterior se evaluó la remoción de los iones metálicos a las 24 y 48 h. La detección de metales se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica (Agilent Technologies GTA 120, USA) con atomización de muestra en llama de acetileno y aire comprimido: Cu<sup>2+</sup> (327,4 nm), Zn<sup>2+</sup> (213,9 nm), Cr<sup>3+</sup> (357,9 nm), Pb<sup>2+</sup>(283,3 nm) y Ni<sup>2+</sup> (232 nm [28].

Los controles, positivo (SDS) y negativo (buffer TRIS-HCl), se prepararon a las mismas condiciones de la solución de biosurfactante.

---

<sup>2</sup> Se sometió la solución de biosurfactante durante 30 minutos en aceite

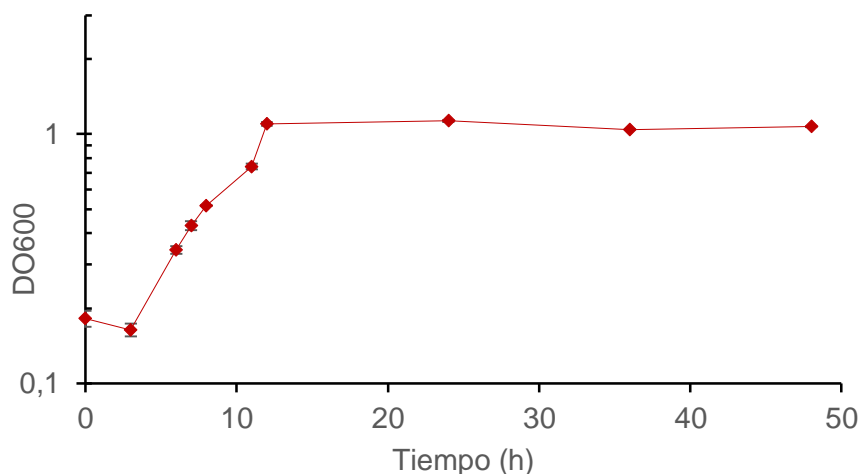
**1.7.3 Análisis estadístico.** Los resultados de estabilidad y remoción de metales fueron evaluados a través de un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de hipótesis de comparación, para encontrar cualquier diferencia estadísticamente significativa en los resultados, con un nivel de confianza del 95% utilizando el software STATGRAPHICS centurión XV versión 15.2.06.

## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1 CURVA DE CRECIMIENTO DE *BACILLUS SUBTILIS* ATCC6633

El crecimiento de *B. subtilis* utilizando como fuente de carbono glicerol crudo, se caracterizó por una fase de latencia durante las dos primeras horas (Figura 3), seguida por una fase de crecimiento exponencial durante un periodo de 3 a 12 h, y finalmente una fase estacionaria que se completó a las 48 h de incubación, tiempo a partir del cual según la literatura, la concentración de biosurfactante permanece constante [11]. La velocidad específica de crecimiento máxima fue de  $0,19 \text{ h}^{-1}$  con MMSGLY; mientras que en el medio mínimo de sales sin modificaciones (Anexo D), la velocidad específica de crecimiento máxima fue  $0,09 \text{ h}^{-1}$  como se reporta en trabajos anteriores [21]. Por lo tanto, si es mayor la velocidad de crecimiento favorece la producción de biosurfactante, ya que son productos asociados al crecimiento [27]. Los controles negativos para las fermentaciones no presentaron crecimiento microbiano.

**Figura 3. Curva de crecimiento de *B. subtilis* en MMSGLY**



\* Cada dato corresponde al promedio de al menos tres réplicas y las barras de error corresponden a la desviación estándar (Anexo E).

El pH del medio de cultivo aumentó desde un valor inicial de  $6,8 \pm 0,2$  hasta  $7,3 \pm 0,1$  durante las 48 h de fermentación lo que favorece el crecimiento microbiano, ya que los valores óptimos se encuentran en un rango de pH de 6,5 a 7,5 [12]. Este incremento de pH es consistente con investigaciones previas [29] para *B. subtilis* cultivadas en medio mineral que contiene glicerol purificado como fuente de carbono.

El glicerol crudo consumido durante la fermentación fue  $1,39 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Anexo F) y la producción promedio del biosurfactante obtenido con MMSGLY fue  $1,79 \pm 0,16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  por cultivo, medida por turbidimetría y  $1,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \pm 0,17$  por método del peso seco. Esta producción de biosurfactante es superior a la reportada en la literatura a partir de glicerol crudo en medio mínimo basal ( $1,29 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [27] y a la reportada por otros autores que utilizaron *Bacillus sp.* (Tabla 3). La productividad volumétrica del biosurfactante fue de  $0,04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . El rendimiento de biomasa con respecto al sustrato en las 48 horas de fermentación fue  $Y_{XS} = 0,6 \pm 0,2 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  y el rendimiento de biosurfactante con respecto a la biomasa fue  $Y_{PX} = 3,7 \pm 0,3 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  (Anexo G).

**Tabla 3. Rendimientos del biosurfactante.**

Fuente de carbono	Cepa	Producción ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Referencia
Glicerol	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0,158	[30]
Glicerol	<i>B. subtilis</i> BS5	0,250	[31]
Glucosa	<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	1,55	[32]
Lactosa	<i>B. subtilis</i>	1	[33]

El MMSGLY es un medio que posee una serie de iones metálicos que favorecen el crecimiento de *B.subtilis* e impulsan el metabolismo de la bacteria para la producción de biosurfactante, entre los más comunes y esenciales están  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  [34], así como las trazas metálicas  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  [32]. Estudios previos, demuestran que el ión  $\text{Mn}^{2+}$  es un propulsor para la producción de biosurfactante y

asimilación de nitrógeno inorgánico en la célula [35], ventaja que posee *B.subtilis* al utilizar MMSGLY, sobre otros microorganismos que no procesan este ión [36].

Al comparar el MMSGLY con glicerol y otro medio de sales con glucosa, los rendimientos obtenidos fueron de  $1,79 \pm 0,16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para MMSGLY y  $1,55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  [32], teniendo nutrientes similares, lo que indica que es viable reemplazar la glucosa con glicerol crudo. Así mismo, se comparan los rendimientos obtenidos a partir de diversos sustratos como aceite de girasol ( $0,98 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), suero de queso ( $0,37 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), glucosa ( $1,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [22] y otros sustratos puros como lactosa, fructosa y extracto de levadura obteniendo valores menores a  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de biosurfactante [33], dichos valores demuestran la óptima acogida de medio MMSGLY por la bacteria *B.subtilis* para la producción de biosurfactante.

### 3. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES TENSOACTIVAS DEL BIOSURFACTANTE

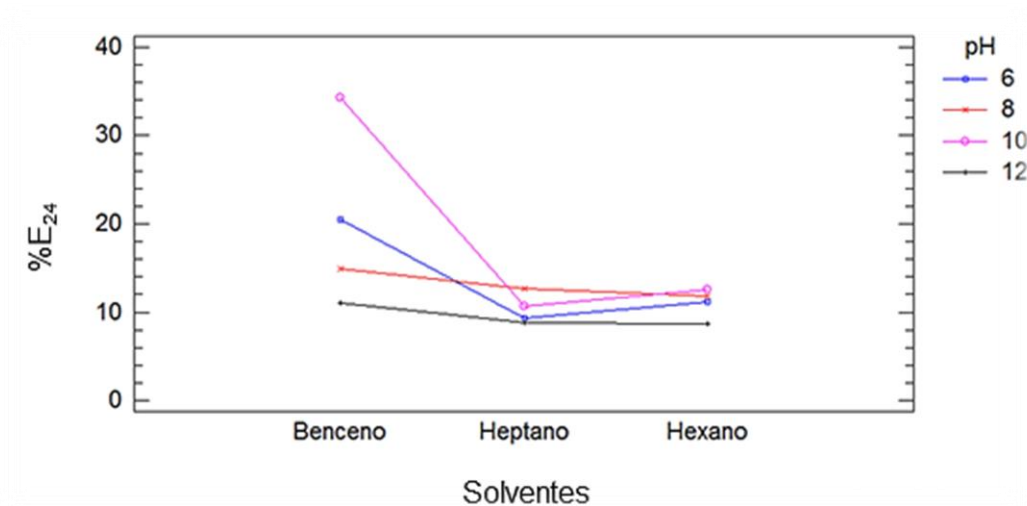
#### 3.1 ESTABILIDAD DEL BIOSURFACTANTE

Se evaluó el efecto del pH, la temperatura y la salinidad en las propiedades emulsificante del biosurfactante producido por *B. subtilis* dejando como parámetro la concentración del biosurfactante a  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  [27]. El índice de emulsificación fue cero para el control negativo (buffer sin surfactante) en todas las condiciones evaluadas.

**3.1.1 Efecto del pH.** Las condiciones de pH se determinaron de acuerdo a la solubilidad del biosurfactante, ya que por debajo de  $\text{pH}= 6$  se reduce la actividad emulsificante y se precipita el compuesto, debido a la ionización de grupos carboxílicos de ácidos aspártico y glutámico (Figura 1) [37]. Así mismo, el valor de  $\text{pK}_a$  (fuerza que tienen las moléculas al disociarse) del biosurfactante es equivalente a 6, lo que permite la formación de micelas por encima del  $\text{pK}_a$  y monocapas insolubles por debajo de este [38].

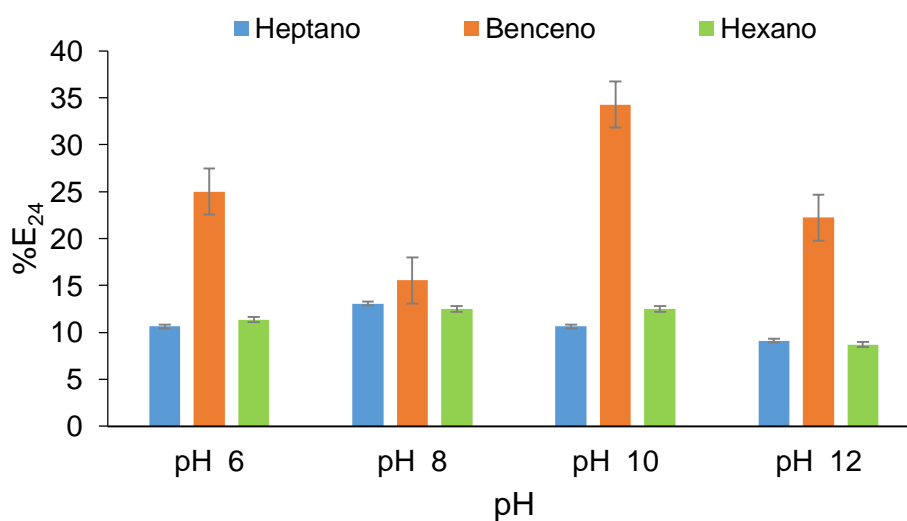
El análisis estadístico ANOVA, demuestra que la estabilidad del biosurfactante está condicionado al tipo de solvente. Además, al comparar el benceno con hexano y heptano, existe una diferencia estadísticamente significativa, por lo que se concluye que el benceno es el mejor sustrato en la estabilidad del biosurfactante, comparado con los demás solventes y además se obtienen buenos resultados de emulsión a un cualquier rango de pH (Figura 4) (Anexo H).

Figura 4. ANOVA solvente – pH.



En la figura 5, se muestra los resultados del índice de emulsificación ( $E_{24}$ ) a diferentes valores de pH, para el biosurfactante producido por *B. subtilis* con distintos sustratos hidrofóbicos; benceno, hexano y heptano. Se observa que, a condiciones estándar descritas en la sección anterior, el mayor índice de emulsificación dado fue para benceno ( $E_{24} = 34,3\%$ ), hexano ( $E_{24} = 13\%$ ) y heptano ( $E_{24} = 11\%$ ) a pH 10.

Figura 5. Estabilidad del biosurfactante a diferentes pH.



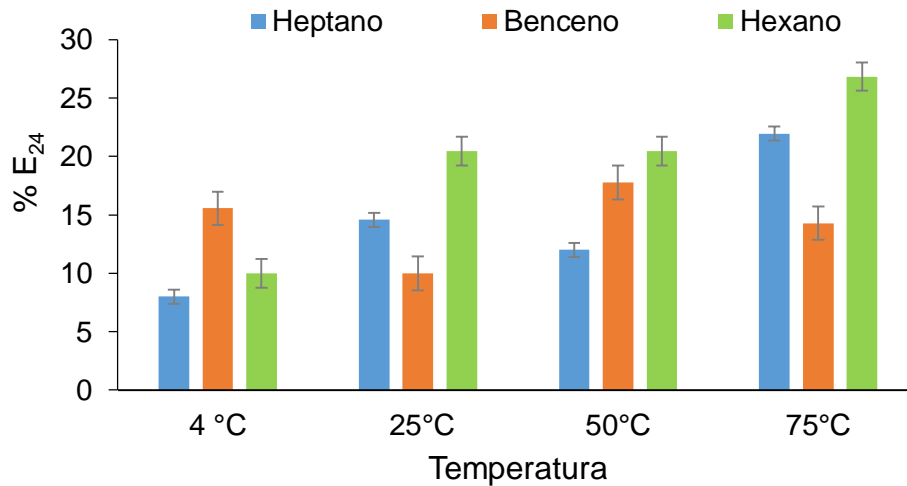
Estos resultados pueden ser atribuidos según la literatura, a que, a pH= 9,5 el biosurfactante forma micelas esféricas, cilíndricas y elipsoidales con diámetros y longitudes mayores, lo que aumenta la interacción entre el sustrato y la solución de biosurfactante, mientras que a pH menores de 9,5 sólo hay micelas esféricas y elipsoidales de menor tamaño (5 a 11 nm). Las micelas a pH 12 son principalmente esféricas, las cuales a tal condición pierden su estructura peptídica para convertirse en una estructura de cadena lineal [37], logrando así, una disminución en la actividad emulsificante. Además, la morfología de las moléculas de los hidrocarburos son determinantes en la emulsificación [39], como lo corrobora el análisis estadístico y los resultados con porcentajes de emulsificación mayores para benceno ( $C_6H_6$ ), hexano ( $C_6H_{14}$ ) y heptano ( $C_7H_{16}$ ).

**3.1.2 Efecto de la temperatura** El efecto de la variación de temperatura de 4°C a 75°C en la estabilidad del biosurfactante se observa en la figura 6, el cual, a altas temperaturas aumenta la capacidad de emulsión, siendo la mejor condición a T= 75 °C para el hexano.

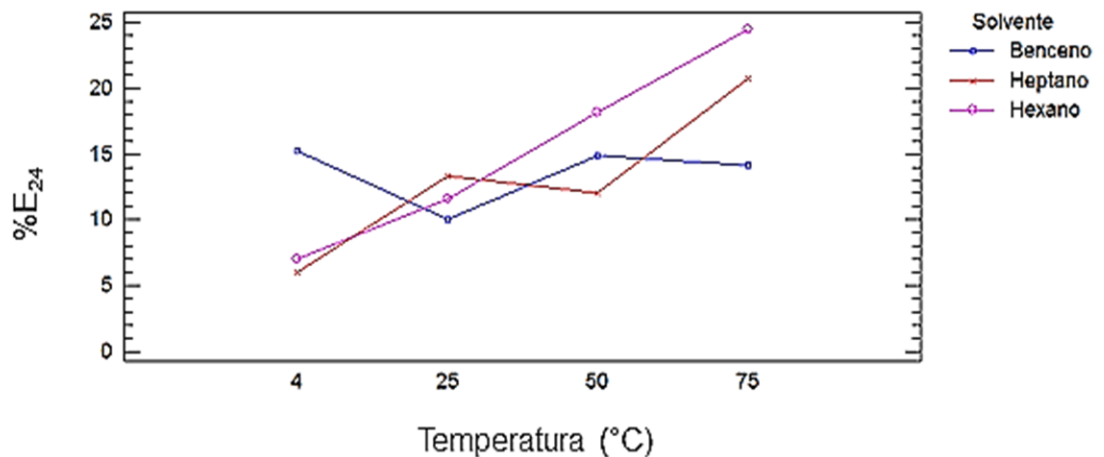
Los resultados estadísticos reflejan, que la actividad surfactante para todos los hidrocarburos fue termoestable en los rangos de temperatura evaluados, pero existe una diferencia significativa con los solventes de cadena lineal (ANEXO H), aumentando la emulsificación con el aumento de la temperatura, especialmente con hexano (Figura 7).

Cabe destacar que la remoción de sustratos a condiciones ambientales, es significativa, lo que conlleva a reducir un posible costo operacional. Igualmente, estos resultados sugieren que el biosurfactante puede usarse en procesos de recuperación de hidrocarburos donde prevalecen altas temperaturas.

**Figura 6. Estabilidad del biosurfactante a diferentes temperaturas**



**Figura 7. ANOVA solvente – temperatura**



**3.1.3 Efecto de sales.** Las propiedades del biosurfactante a concentraciones mayores de NaCl, tienden a disminuir su capacidad de emulsión (Figura 8). El método estadístico reporta que la sal es influyente en la estabilidad del biosurfactante. La concentración de sal y heptano presentan una diferencia

significativa por encima de los demás sustratos (ANEXO H) y a la vez se observa una reducción de todos los solventes a concentraciones mayores de 5% de NaCl (Figura 9).

Casos similares, fueron reportados con *B.subtilis* ICA56 y *P.aeruginosa* UCP0992 en donde a concentraciones superiores de NaCl al 20% el biosurfactante reduce la capacidad de emulsión hasta un 70% [40][22]. Los resultados obtenidos concuerdan con estudios preliminares, en donde se afirma que los electrólitos afectan directamente a los grupos carboxilos de los rhamnolípidos [40], al igual que los lipopéptidos producidos por *B.subtilis*, formando monocapas que disminuyen la concentración micelar crítica (CMC) y la tensión superficial [41], es decir, a altas concentraciones de sal se reduce considerablemente el tamaño y la forma de la micela, afectando la emulsión del biosurfactante en la recuperación de hidrocarburos [37].

**Figura 8. Efecto de NaCl en la estabilidad del biosurfactante**

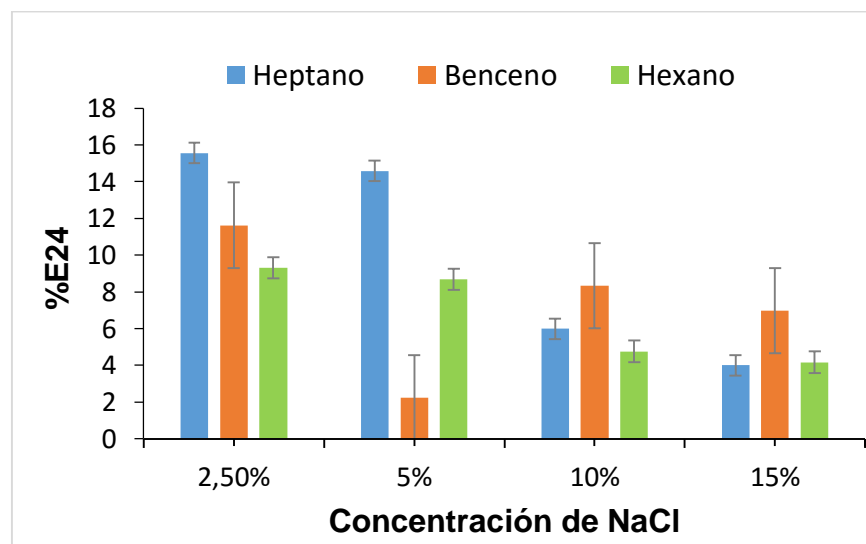
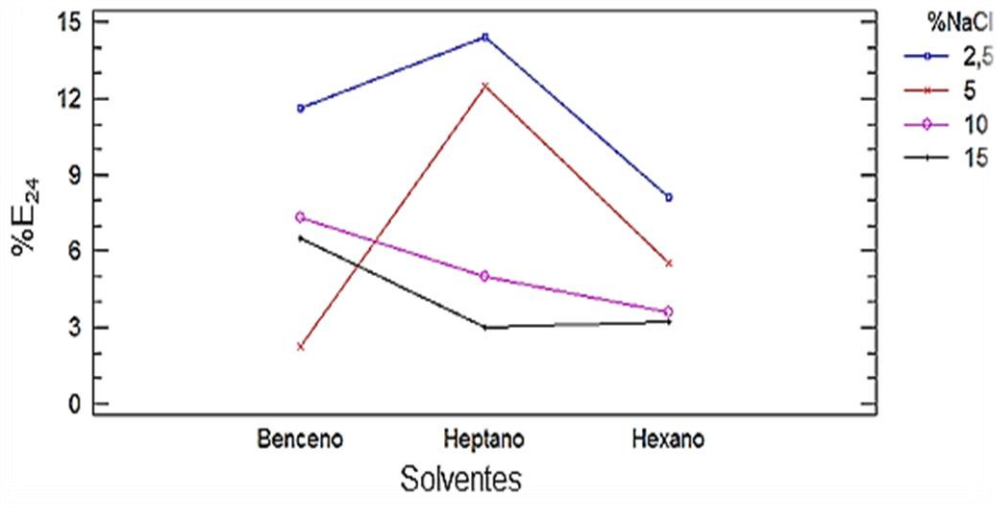


Figura 9. ANOVA solvente – %NaCl



#### 4. REMOCIÓN DE METALES

La remoción de metales bajo la acción de las propiedades del biosurfactante producido por *B.subtilis* ATCC6633, en primer lugar se dio gracias a la formación de complejos de metales y en segundo lugar a la morfología del lipopéptido, ya que está constituido por dos grupos carboxilos, lo que lo convierte en un biosurfactante aniónico, capaz de formar enlaces iónicos y generar fuerzas electrostáticas con los metales [42]. En este estudio se evaluaron la remediación de metales con  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  a temperatura ambiente, 0% NaCl y pH=10. Se sabe que en presencia de NaCl la efectividad del biosurfactante disminuye, ya que la quelación de metales, se reduce drásticamente por la competencia entre los metales evaluados y el ión  $\text{Na}^+$  [43]. De igual manera, se evaluó la remoción de metales con controles positivo y negativo.

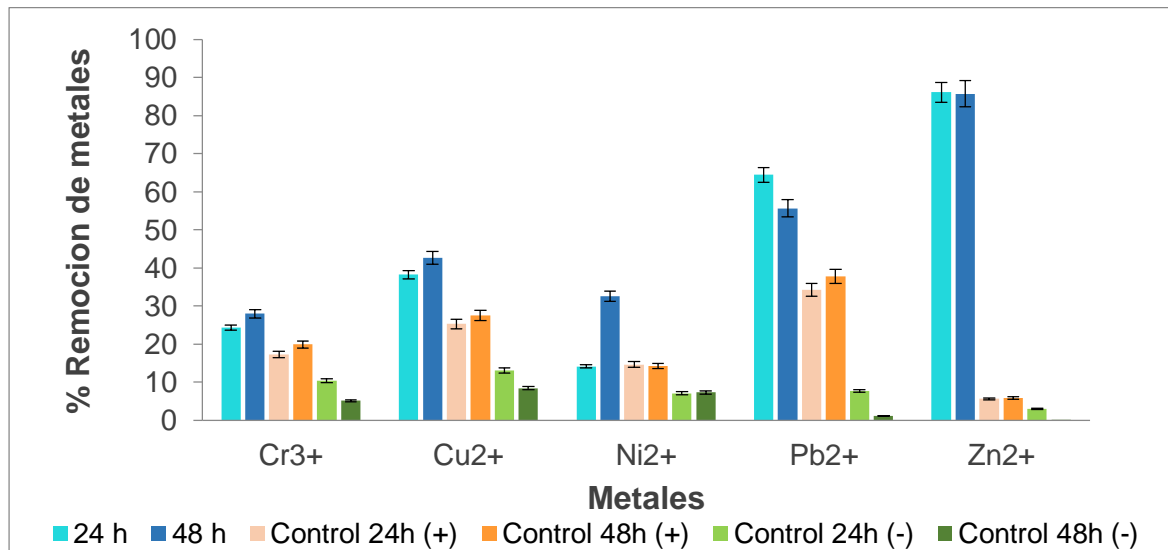
La cantidad de metal eliminado por la solución de biosurfactante producido por *B. subtilis* ATCC 6633 aumentó gradualmente con el tiempo, la remoción de  $\text{Cu}^{2+}$  fue de 38.2%, 24.3% de  $\text{Cr}^{3+}$  y 14% de  $\text{Ni}^{2+}$  (Figura 10). Sin embargo, alcanzó mayor remoción a 48 h, reteniendo 43%, 33%, 28% para cobre, níquel y cromo respectivamente. Según los resultados, hay mayor retención de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  a pH 10 puesto que el biosurfactante muestra mayor afinidad por los cationes divalentes que por los cationes monovalentes y demás valencias [44].

Los controles negativos presentaron remoción como consecuencia de las fuerzas de interacción de carga, es decir, los metales en ausencia de micelas del biosurfactante pueden ser removidos [45], pero no con la misma efectividad del biosurfactante (Anexo I). De igual manera sucede con el surfactante sintético.

Los iones metálicos de  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  han reportado retención de 32% y 40,3% con *B. subtilis* A21 [46]. Por lo tanto, se concluye que el biosurfactante producido por

*B.subtilis* ATCC6633 favorece positivamente la extracción de metales de zinc y plomo a las 24 h.

**Figura 10. Remoción de metales Cr<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> en solución de biosurfactante a 24 y 48 horas**



Una ventaja del biosurfactante producido a partir de *B.subtilis* ATCC 6633 en la remoción de metales con respecto a otros surfactantes, se debe a las dos cargas negativas, ya que por una mol de solución de biosurfactante se elimina dos moles de metales, en comparación con los biosurfactantes rhamnolipidos (1:1) y soforolipidos (1:1) [44].

## 5. CONCLUSIONES

*Bacillus subtilis* en medio MMSGLY con glicerol, como única fuente de carbono y velocidad específica de crecimiento de  $0,19 \text{ h}^{-1}$ , obtuvo una producción de biosurfactante de  $1,79 \pm 0,16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

El mayor índice de emulsificación del biosurfactante para los diferentes valores de pH, fue para benceno en condiciones de alcalinidad (pH 10), mientras que el pH como una variable en la estabilidad del biosurfactante, no demostró diferencia estadísticamente significativa, por el contrario, sí el tipo de solvente. La actividad del biosurfactante para todos los hidrocarburos, fue estable en el rango de temperatura evaluados (4 a  $75^\circ\text{C}$ ), presentando un efecto significativo en la estabilidad del biosurfactante con hexano a  $75^\circ\text{C}$ , con el valor máximo de emulsión ( $E_{24} = 27 \%$ ). Las concentraciones de sal influyeron en el índice de emulsificación del heptano, obteniéndose el mayor valor a 2,5 % de NaCl ( $E_{24}=16 \%$ ).

El biosurfactante producido, posee una efectiva acción sobre la remoción de metales en las fuentes hídricas, destacando la captación de  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{+2}$  con solución de biosurfactante en un 86%, 64% y 42.6% respectivamente, como consecuencia a sus cargas negativas del ácido aspártico y glutámico, lo que lo convierte en un producto viable para la remoción de metales en aguas contaminadas.

## **6. RECOMENDACIONES**

Para lograr aumentar la producción de biosurfactante, es necesario optimizar las variables de agitación y tamaño del inóculo. Además, se sugiere hacer una caracterización estructural del surfactante a condiciones de estabilidad, mediante espectrofotometría de masas, resonancia magnética nuclear y microscopia electrónica de transmisión.

De igual modo, se propone determinar la CMC y evaluar las propiedades de emulsificación y retención de metales por efluentes contaminados por hidrocarburos e iones metálicos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] “OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2015,” 2015.
- [2] Fedebiocombustibles, “Preguntas frecuentes de los biocombustibles,” 2017. [Online]. Available: <http://www.fedebiocombustibles.com/nota-web-id-923.htm>. [Accessed: 25-Dec-2016].
- [3] R. Bioenergy, “Producción de biodiesel: creció 46.9% en 2016,” 2017. [Online]. Available: <http://www.rosariobioenergysa.com/novedades/produccion-de-biodiesel-crecio-469-en-2016>. [Accessed: 02-Mar-2017].
- [4] Reporteenergía, “Colombia sube producción y mezcla obligatoria de Biocombustibles.,” 2013. [Online]. Available: <http://www.fedebiocombustibles.com/v3/nota-web-id-1413.htm>.
- [5] A. Demirbas, “Importance of biodiesel as transportation fuel,” *Energy Policy* vol. 35, pp. 4661–4670, 2007.
- [6] C. B. Aguilar, R. D. M. Prado, L. Castellanos, and C. N. Silva, “Características de la glicerina generada en la producción de biodiesel, aplicaciones generales y su uso en el suelo,” *Cultivos Tropicales*, vol. 37, no. 3, pp. 7–14, 2016.
- [7] F. Yang, M. A. Hanna, and R. Sun, “Value-added uses for crude glycerol – a byproduct of biodiesel production,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 5, no. 1, p. 13, 2012.
- [8] A. Mayorga and W. A. Mejía, “Aprovechamiento integral del glicerol residual en la industria del biodiesel: caso 1,3-propanodiol (1,3-pd),” *Rev. Investig. TECCIENCIA*, pp. 80–93, 2005.
- [9] N. Tarazona, N. Ramírez, P. Moreno, Y. Combariza, and C. Guzmán, “Aislamiento y caracterización de microorganismos nativos y aprovechamiento del glicerol como única fuente de carbono.,” *SciELO*, vol. 24, no. 2, pp. 7–11, 2011.
- [10] R. Sen and T. Swaminathan, “Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 47, no. 4, pp. 358–363, 1997.

- [11] D. Cooper, C. Macdonald, S. Duff, and N. Kosaric, "Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 42, no. 3, pp. 408–412, 1981.
- [12] S. N. Al-Bahry *et al.*, "Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 81, pp. 141–146, 2013.
- [13] D. Vullo, "Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente," *Quim. Viva*, no. 3, pp. 93–104, 2003.
- [14] N. Kosaric and F. V. Sukan, *Biosurfactants: Production and utilization - Processes, Technologies, and Economics*, vol. 159. 2015.
- [15] C. N. Mulligan, S. K. Sharma, and M. Ackmez, *Research Trends and Applications*. 2010.
- [16] G. Soberón Chávez, "Biosurfactants: from genes to applications," *Biosurfactants from genes to Appl*, Springer vol. 20, p. 220, 2010.
- [17] M. Pacwa-Płociniczak, G. A. Plaza, Z. Piotrowska-Seget, and S. S. Cameotra, "Environmental applications of biosurfactants: Recent advances," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, no. 1, pp. 633–654, 2011.
- [18] F. A. Bezza and E. M. Nkhalambayausi Chirwa, "Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil," *Chemosphere*, vol. 144, pp. 635–644, 2016.
- [19] K. Arima, a Kakinuma, and G. Tamura, "Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 31, no. 3, pp. 488–494, 1968.
- [20] D. Jiménez, S. A. Medina, and J. N. Gracida, "Propiedades , aplicaciones y producción de biotensioactivos," *Int. Contam. Ambient* vol. 26, no. 1, pp. 65–84, 2010.
- [21] J. A. Albarracín and J. D. Carvajalino, "Evaluación de diferentes medios de

cultivo para la producción de biosurfactantes de bacillus subtilis a partir de glicerol crudo.,” 2016.

- [22] Í. W. Lima de Franca *et al.*, “Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils,” *Catal. Today*, vol. 255, pp. 10–15, 2015.
- [23] L. M. Whang, P. W. G. Liu, C. C. Ma, and S. S. Cheng, “Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 151, no. 1, pp. 155–163, 2008.
- [24] A. Aparna, G. Srinikethan, and H. Smitha, “Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas sp.* 2B,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 95, pp. 23–29, 2012.
- [25] J. A. Gamboa-Rueda, V. A. Lizcano-Gonzalez, M. A. Ordoñez-Supelano, J. A. Perez-Mendoza, C. Guzman-Luna, and L. J. Lopez-Giraldo, “Unstructured kinetic model of batch fermentation of usp glycerol for lactic acid production,” *CTyF - Ciencia, Tecnol. y Futur.*, vol. 6, no. 1, pp. 81–94, 2015.
- [26] S. Mukherjee, P. Das, and R. Sen, “Rapid quantification of a microbial surfactant by a simple turbidometric method,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 76, no. 1, pp. 38–42, 2009.
- [27] A. F. De Faria *et al.*, “Production and structural characterization of surfactin (C 14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry,” *Process Biochem.*, vol. 46, no. 10, pp. 1951–1957, 2011.
- [28] Ý. Kojuncu, J. M. Bundalevska, Ü. Ay, Č. Katarina, T. Stafilov, and G. Akcin, “Separation Science and Technology Atomic Absorption Spectrometry Determination of Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn, and TI Traces in Seawater Following Flotation Separation,” *Sep. Sci. Technol.*, vol. 39, pp. 2751–2765, 2004.
- [29] F. Reis, E. Sérvulo, and F. De Franca, “Lipopeptide surfactant production by bacillus subtilis grown on low-cost raw materials,” *Appl Biochem Biotechnol.*

- vol. 113–116, no. 3, pp. 899–900, 2004.
- [30] M. De Sousa *et al.*, “Crude Glycerol from Biodiesel Industry as Substrate for Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633,” *Braz. arch. biol. technol.*, vol. 57, no. April, pp. 295–301, 2014.
- [31] A. M. Abdel-Mawgoud, M. M. Aboulwafa, and N. A. H. Hassouna, “Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 150, no. 3, pp. 305–325, 2008.
- [32] X. Huang, J. Liu, Y. Wang, J. Liu, and L. Lu, “The positive effects of Mn<sup>2+</sup> on nitrogen use and surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332,” *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, vol. 29, no. 2, pp. 381–389, 2015.
- [33] J. F. B. Pereira *et al.*, “Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications,” *Fuel*, vol. 111, pp. 259–268, 2013.
- [34] V. García, “Los microorganismos,” in *Introducción a la microbiología*, 2nd ed., EUNED, Ed. Costa Rica, 2004.
- [35] J. D. Sheppard and D. G. Cooper, “Microbiology Biotechnology The response of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 to manganese during continuous-phased growth,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 72–73, 1991.
- [36] J. Charney, W. P. Fisher, and C. P. Hegarty, “Manganese as an essential element for sporulation in the genus *Bacillus*,” *J. Bacteriol.*, vol. 2, pp. 145–148, 1951.
- [37] K. A *et al.*, “Electron cryo-microscopic studies on micellar shape and size of surfactin, an anionic lipopeptide,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 5, pp. 43–48, 1995.
- [38] R. Maget-dana, L. Thimon, and F. Peypoux, “Surfactin / iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A,” *Sci*, vol. 3, pp. 1047–1051, 1992.
- [39] N. Sakthipriya, M. Doble, and J. S. Sangwai, “Action of biosurfactant producing thermophilic *Bacillus subtilis* on waxy crude oil and long chain paraffins,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 105, pp. 168–177, 2015.

- [40] S. N. R. L. Silva, C. B. B. Farias, R. D. Rufino, J. M. Luna, and L. A. Sarubbo, "Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 79, no. 1, pp. 174–183, 2010.
- [41] S. Peker, "Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2," *Biochemie* vol. 35, pp. 225–233, 2004.
- [42] R. Diniz, J. Moura, D. Luna, G. Maria, D. C. Takaki, and L. Asfora, "Electronic Journal of Biotechnology Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988," *Electronic Journal of Biotechnology* vol. 17, pp. 34–38, 2014.
- [43] P. V Bhaskar and N. B. Bhosle, "Bacterial extracellular polymeric substance (EPS) : A carrier of heavy metals in the marine food-chain," *Environment International*, vol. 32, pp. 191–198, 2006.
- [44] J. Wallachb, "Ionophorous and sequestering properties of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis*", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol 1 pp. 57–62, 1993.
- [45] P. Das, S. Mukherjee, and R. Sen, "Bioresource Technology Biosurfactant of marine origin exhibiting heavy metal remediation properties," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 20, pp. 4887–4890, 2009.
- [46] A. K. Singh and S. S. Cameotra, "Efficiency of lipopeptide biosurfactants in removal of petroleum hydrocarbons and heavy metals from contaminated soil," *Environ Sci Pollut*, 2013.
- [47] A. Singh, J. D. Van Hamme, and O. P. Ward, "Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects," *Biotechnol. Adv.*, vol. 25, no. 1, pp. 99–121, 2007.
- [48] J. Kuhn, H. Müller, D. Salzig, and P. Czermak, "A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation," *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 18, no. 3, pp. 252–255, 2015.

## BIBLIOGRAFÍA

AGUILAR C. B., CASTELLANOS L., PRADO R. D. M., and SILVA C. N., "Características de la glicerina generada en la producción de biodiesel, aplicaciones generales y su uso en el suelo," *Cultivos Tropicales*, vol. 37, no. 3, pp. 7–14, 2016.

ALBARRACÍN J. A. and CARVAJALINO, J. D. "Evaluación de diferentes medios de cultivo para la producción de biosurfactantes de bacillus subtilis a partir de glicerol crudo.," 2016.

APARNA A., SRINIKETHAN G., and SMITHH. A, "Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Production and characterization of biosurfactant produced by a novel Pseudomonas sp . 2B," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 95, pp. 23–29, 2012.

ARIMA K., KAKINUMA a, and TAMURA G., "Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by Bacillus subtilis: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 31, no. 3, pp. 488–494, 1968.

LIMA DE FRANCA Í. W. *et al.*, "Production of a biosurfactant by Bacillus subtilis ICA56 aiming bioremediation of impacted soils," *Catal. Today*, vol. 255, pp. 10–15, 2015.

KOSARIC N. and F. SUKAN V., *Biosurfactants: Production and utilization - Processes, Technologies, and Economics*, vol. 159. 2015.

MUKHERJEE S., DAS P., and SEN R., "Rapid quantification of a microbial surfactant by a simple turbidometric method," *J. Microbiol. Methods*, vol. 76, no. 1, pp. 38–42, 2009.

GAMBOA-RUEDA J. A., LIZCANO-GONZALEZ V. A., ORDOÑEZ-SUPELANO M. A., PEREZ-MENDOZA J. A., GUZMAN-LUNA C., and LOPEZ-GIRALDO L. J., "Unstructured kinetic model of batch fermentation of usp glycerol for lactic acid production," *CTyF - Ciencia, Technol. y Futur.*, vol. 6, no. 1, pp. 81–94, 2015.

## ANEXOS

### Anexo A. Aplicaciones industriales de surfactantes químicos y biosurfactantes

Tabla A1. Aplicaciones industriales de surfactantes químicos y biosurfactantes. Modificada de Singh, Van Hamme, and Ward, 2007 [47]

<b>Industria</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Función</b>
Petróleo.	Recobro mejorado	Mejorar el drenaje en el pozo petrolero; Estimular la liberación de petróleo atrapado por capilares; Humedecimiento de superficies sólidas; Reducción de la viscosidad y punto de fluidez del crudo; Disminución de la tensión interfacial; Disolución de petróleo.
	Desemulsificación.	Desemulsión de emulsiones de crudo; Solubilización en crudo; Reducción de la viscosidad, agente humectante.
Ambiental.	Biorremediación.	Emulsificación de hidrocarburos; Disminución de la tensión interfacial; Secuestro de metales.
	Remediación y limpieza de suelos	Emulsificación por adherencia a hidrocarburos; dispersión; agente espumante; detergente; Limpieza del suelo.
Alimentos.	Emulsificación y desemulsificación.	Emulsionante; Solubilizante; Desensibilizador; Suspensión, humectación, espumación, desespumado, espesante, agente lubricante.
	Ingredientes funcionales	Interacción con lípidos, proteínas e hidratos de carbono, agente protector.
Biológica.	Microbiología	Comportamiento fisiológico como la movilidad celular, la comunicación celular, la adhesión de nutrientes, la competencia celular y la patogénesis de las plantas y los animales.

<b>Industria</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Función</b>
	Farmacéutica y terapéuticas	Agentes antivirales antibacterianos, antifúngicos; Agentes adhesivos; Moléculas inmunomoduladoras; Vacunas; terapia de genes.
Agricultura.	Biocontrol.	Facilitación de mecanismos de control biológico de microbios tales como parasitismo, antibiosis, competición, resistencia sistémica inducida e hipovirulencia.
Bioprocesos.	Procesamiento downstream	Biocatálisis en sistemas acuosos de dos fases y microemulsiones; Biotransformaciones; Recuperación de productos intracelulares; Mejora de la producción de enzimas extracelulares y productos de fermentación.
Cosmética.	Salud y productos de belleza.	Emulsionantes, agentes espumantes, solubilizantes, agentes humectantes, agentes limpiadores, agentes antimicrobianos, mediadores de la acción enzimática.

## Anexo B. Medio de Luria Bertani

Tabla B1. Medio de Luria Bertani.

<b>Componente</b>	<b>Concentración [g L<sup>-1</sup>]</b>
Triptona	10
NaCl	10
Extracto de levadura	5
Agar bacteriológico	15

Tomada de J. A. Albarracín and J. D. Carvajalino, "Evaluación de diferentes medios de cultivo para la producción de biosurfactantes de bacillus subtilis a partir de glicerol crudo.," 2016. [21]

### **Anexo C. Método de peso seco biomasa**

Es un método directo y sencillo de cuantificación de biomasa en g o mL de muestra. Para este método se requiere una balanza (precisión 0,001 g), un recipiente para depositar la muestra y una estufa. Inicialmente se pesa el recipiente vacío, luego se adiciona líquido fermentado y se centrifuga (5000 g, por 20 minutos), por último, se retira el sobrenadante del recipiente y el sólido centrifugado se deja secar en la estufa por 24 h para posteriormente ser medido en la balanza. La cantidad de biomasa producida se determina por la diferencia del peso inicial del recipiente con el peso final de este.

#### Anexo D. Medio mínimo de sales con glicerol crudo MSMSCG.

Tabla D1. Medio mínimo de sales con glicerol crudo MSMSCG.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Glicerol crudo	10 [g·L <sup>-1</sup> ]
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50 [g·L <sup>-1</sup> ]
MgSO <sub>4</sub>	0,8 [mM]
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40 [mM]
Na <sub>3</sub> -Citrato	0,008 [mM]
CaCl <sub>2</sub>	0,007 [mM]
FeSO <sub>4</sub>	0,004 [mM]
MnSO <sub>4</sub>	0,001 [mM]

Tomada de J. A. Albarracín and J. D. Carvajalino, “Evaluación de diferentes medios de cultivo para la producción de biosurfactantes de bacillus subtilis a partir de glicerol crudo.,” 2016. [21]

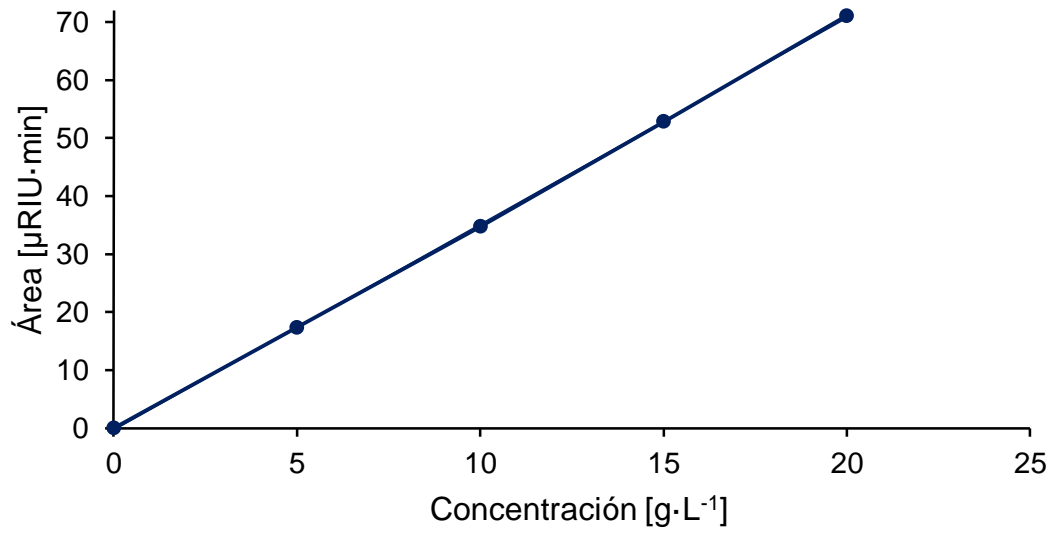
## Anexo E. Datos de la curva de crecimiento de *B.subtilis*

Tabla E1. Curva de crecimiento *B.subtilis*

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Elemeyer 1</b>	<b>Elemeyer 2</b>	<b>Elemeyer 3</b>	<b>Promedio DO</b>	<b>Desviación</b>
0	0.186	0.186	0.120	0.182	0.0147
3	0.330	0.300	0.400	0.164	0.0189
6	0.395	0.380	0.510	0.343	0.0272
7	0.510	0.525	0.515	0.428	0.0028
8	0.815	0.750	0.655	0.517	0.0283
11	1.065	1.195	1.040	0.740	0.0317
12	0.985	1.015	0.545	1.100	0.1011
24	1.090	1.150	1.150	1.130	0.0133
36	1.025	1.050	1.055	1.043	0.0061
48	1.055	1.080	1.080	1.072	0.0056

## Anexo F. Curva de calibración del glicerol crudo

Figura 13. Curva de calibración del sustrato



$$A = 3.5528 \times \text{Concentración de sustrato} - 0.3265 \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$R^2 = 0,999$$

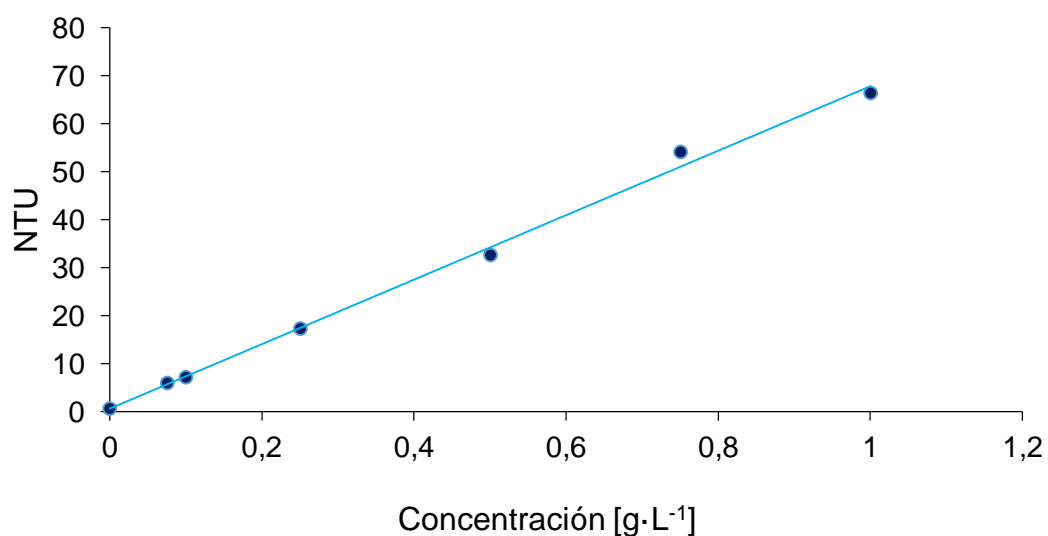
## Anexo G. Producción total del biosurfactante

### CURVA DE CALIBRACIÓN DEL BIOSURFACTANTE

La curva de calibración para cuantificar el biosurfactante (Figura 14) presenta un comportamiento lineal [48] con coeficiente de correlación de  $R^2=0.9963$ , dando como resultado la ecuación 4.

$$NTU = 67.285 \times \text{Concentración de biosurfactante} + 0.5823 \quad (\text{Ecuación 4})$$

Figura 14. Curva de calibración del biosurfactante



De acuerdo a la ecuación, se calcularon los valores del biosurfactante producido por *B. subtilis* ATCC6633, los cuales fueron corroboradas por medio del método de peso seco, obteniendo resultados con un error menor al 10% (Tabla H1).

Tabla G1. Cuantificación del biosurfactante

Número experimento	Método turbidimétrico [g·L <sup>-1</sup> ]	Método peso seco [g·L <sup>-1</sup> ]	Error (%)
1	1,59	1,55	2,52
2	2,22	2,15	3,15
3	1,83	1,80	1,64
4	1,62	1,60	1,23
5	1,67	1,62	2,99
6	1,81	1,75	3,31
Promedio total [g·L <sup>-1</sup> ]	1,79 ± 0,16	1,75 ± 0,17	2,48 ± 0,69

## Anexo H. Análisis Estadístico ANOVA para los índices de emulsificación obtenidos con glicerol (STATGRAPHICS centurión XV versión 15.2.06)

1. Efecto del pH para el índice de emulsificación con cada solvente

Figura H1. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Solvente	287,691	2	143,845	6,62	0,0115
B: pH	142,113	3	47,3712	2,18	0,1433
RESIDUOS	260,738	12	21,7282		
TOTAL (CORREGIDO)	690,542	17			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Si existe una diferencia significativa entre el solvente y no el pH para la estabilidad del biosurfactante ( $p < 0,05$ )

1.1 Heptano

Figura H2. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	17,1722	3	5,72406	3,77	0,1164
Intra grupos	6,08039	4	1,5201		
Total (Corr.)	23,2526	7			

No existe una diferencia significativa entre el pH y la estabilidad del biosurfactante ( $p > 0,05$ ) con heptano.

1.2 Benceno

Figura H3. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	248,647	3	82,8822	2,18	0,2334
Intra grupos	152,289	4	38,0723		
Total (Corr.)	400,936	7			

No existe una diferencia significativa entre el pH y la estabilidad del biosurfactante ( $p > 0,05$ ) con benceno

### 1.3 Hexano

Figura H4. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	14,5453	3	4,84844	11,69	0,0190
Intra grupos	1,65903	4	0,414756		
Total (Corr.)	16,2043	7			

Si existe una diferencia significativa entre el pH y la estabilidad del biosurfactante ( $p > 0,05$ ) con hexano.

### 1.4 Interacción entre benceno y heptano para la estabilidad del biosurfactante.

Figura H5. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	417,783	1	417,783	13,79	0,0023
Intra grupos	424,188	14	30,2992		
Total (Corr.)	841,972	15			

Puesto que el valor P de la prueba F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de %E<sub>24</sub> entre un nivel de solventes y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Figura H6. Prueba de múltiples rangos para %E<sub>24</sub> por solventes

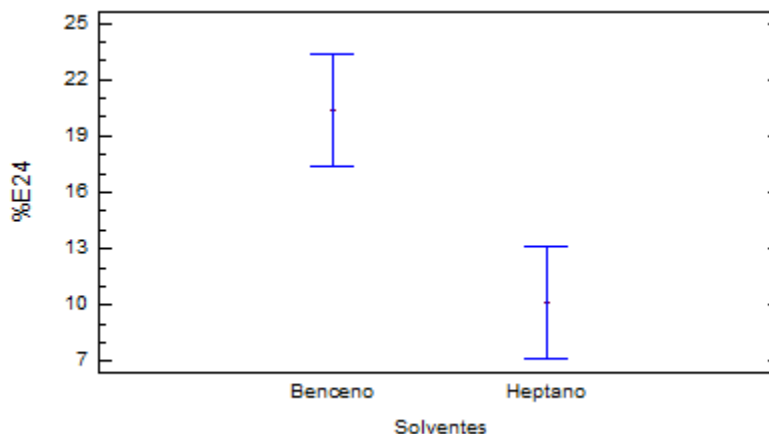
Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Solventes</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Heptano	8	10,1319	X *
Benceno	8	20,3517	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Benceno - Heptano	*	10,2199	5,90297

\* indica una diferencia significativa.

Figura H7. Medias y 95 % de Fisher LSD



Esta gráfica muestra la media de %E<sub>24</sub> para cada uno de los niveles de solventes. También muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. Estos intervalos no se traslapan y tienen una diferencia estadísticamente significativa.

### 1.5 Interacción entre el heptano y hexano en la estabilidad del biosurfactante

Figura H8. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2,32715	1	2,32715	0,83	0,3789
Intra grupos	39,4569	14	2,81835		
Total (Corr.)	41,784	15			

Puesto que el valor P de la prueba F es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de %E<sub>24</sub> entre un nivel de solventes y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Figura H9. Prueba de múltiples rangos para %E<sub>24</sub> por solventes

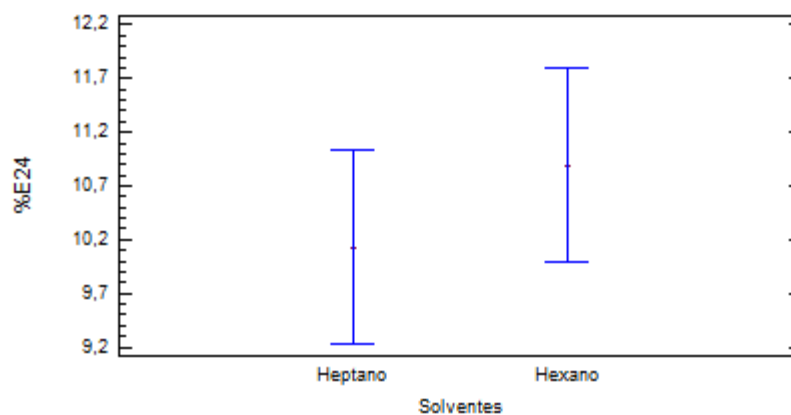
Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Solventes</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Heptano	8	10,1319	X
Hexano	8	10,8946	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Heptano - Hexano		-0,76275	1,80033

\* indica una diferencia significativa.

Figura H10. Medias y 95 % de Fisher LSD



Esta gráfica muestra la media de %E<sub>24</sub> para cada uno de los niveles de solventes. También muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. Estos intervalos se traslapan y no tienen una diferencia estadísticamente significativa.

1.6 Interacción de hexano y benceno en la estabilidad del biosurfactante.

Figura H11. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	357,749	1	357,749	12,01	0,0038
Intra grupos	417,14	14	29,7957		
Total (Corr.)	774,889	15			

Puesto que el valor P de la prueba F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de %E<sub>24</sub> entre un nivel de solventes y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Figura H12. Prueba de múltiples rangos para %E<sub>24</sub> por solventes

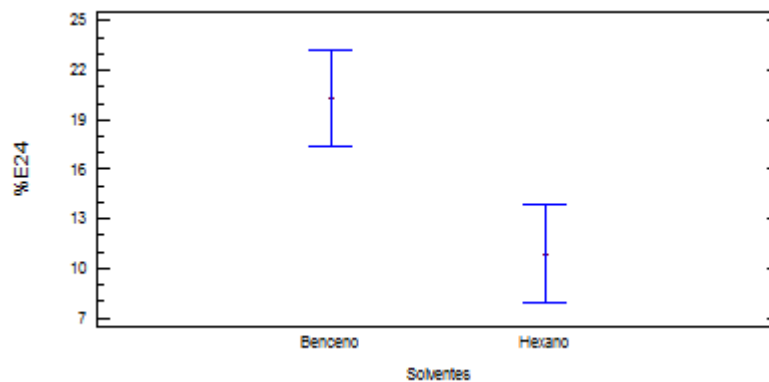
Método: 95,0 porcentaje LSD

Solventes	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Hexano	8	10,8946	X
Benceno	8	20,3517	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Limites
Benceno - Hexano	*	9,45712	5,85372

\* indica una diferencia significativa.

Figura H13. Medias y 95 % de Fisher LSD



Esta gráfica muestra la media de %E<sub>24</sub> para cada uno de los niveles de solventes. También muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. Estos intervalos no se traslapan y tienen una diferencia estadísticamente significativa.

## 2) Efecto de la temperatura

Figura H14. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A.Temperatura	315,786	3	105,262	6,03	0,0054
B:Solvente	16,7478	2	8,37391	0,48	0,6270
RESIDUOS	296,608	17	17,4475		
TOTAL (CORREGIDO)	625,095	22			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Existe una diferencia significativa entre la temperatura y la estabilidad del biosurfactante ( $p > 0,05$ ) y no con los solventes.

### 2.1 Heptano

Figura H15. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	193,154	3	64,3846	31,01	0,0031
Intra grupos	8,305	4	2,07625		
Total (Corr.)	201,459	7			

Existe una diferencia significativa entre la temperatura y la estabilidad del biosurfactante ( $p > 0,05$ ) con heptano.

### 2.2 Benceno

Figura H16. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	35,4277	3	11,8092	2,79	0,1733
Intra grupos	16,9188	4	4,2297		
Total (Corr.)	52,3466	7			

No existe una diferencia significativa entre la temperatura y la estabilidad del biosurfactante ( $p > 0,05$ ) con benceno.

### 2.3 Hexano

Figura H17. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	347,078	3	115,693	10,77	0,0219
Intra grupos	42,9742	4	10,7436		
Total (Corr.)	390,053	7			

Sí existe una diferencia significativa entre la temperatura y la estabilidad del biosurfactante ( $p > 0,05$ ) con hexano.

### 2.4 Interacción entre benceno y heptano para la estabilidad del biosurfactante.

Figura H18. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,403225	1	0,403225	0,02	0,8836
Intra grupos	253,805	14	18,129		
Total (Corr.)	254,209	15			

Puesto que el valor P de la prueba F es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de %E<sub>24</sub> entre un nivel de solventes y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Figura H19. Prueba de múltiples rangos para %E<sub>24</sub> por solventes

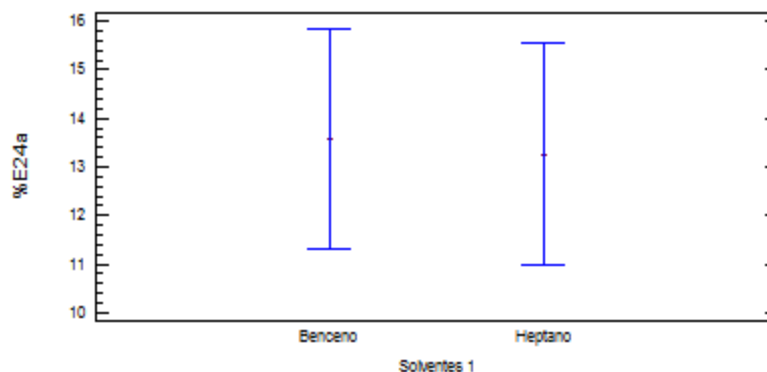
Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Solventes 1</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Heptano	8	13,255	X
Benceno	8	13,5725	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Benceno - Heptano		0,3175	4,56606

\* indica una diferencia significativa.

Figura H20. Medias y 95 % de Fisher LSD



Esta gráfica muestra la media de %E<sub>24</sub> para cada uno de los niveles de solventes. También muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. Estos intervalos se traslapen y no tienen una diferencia estadísticamente significativa.

2.5 Interacción de heptano y hexano en la estabilidad del biosurfactante.

Figura H21. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	16,5853	1	16,5853	0,39	0,5410
Intra grupos	591,511	14	42,2508		
Total (Corr.)	608,097	15			

Puesto que el valor P de la prueba F es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de %E<sub>24</sub> entre un nivel de solventes y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Figura H22. Prueba de múltiples rangos para %E<sub>24</sub> por solventes

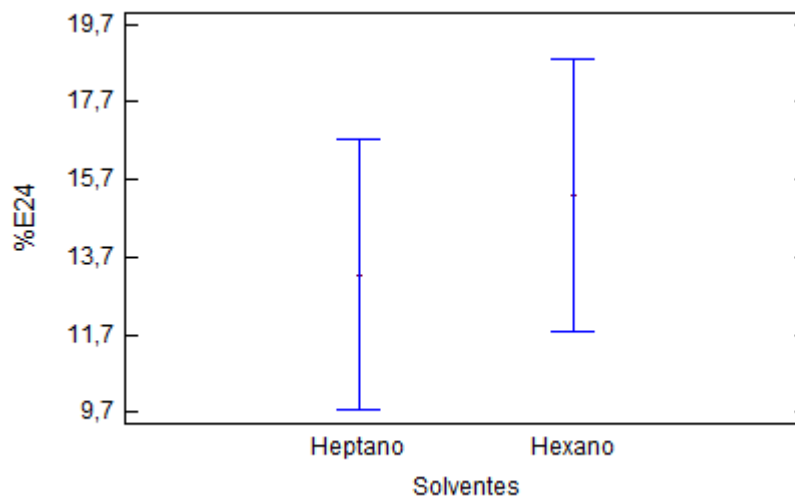
Método: 95,0 porcentaje LSD

Solventes	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Heptano	8	13,255	X
Hexano	8	15,2913	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Limites
Heptano - Hexano		-2,03625	6,97064

\* indica una diferencia significativa.

Figura H23. Medias y 95 % de Fisher LSD



Esta gráfica muestra la media de %E<sub>24</sub> para cada uno de los niveles de solventes. También muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales,

sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. Estos intervalos se traslapen y no tienen una diferencia estadísticamente significativa.

## 2.6 Interacción de hexano y benceno en la estabilidad del biosurfactante.

Figura H24. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	11,8164	1	11,8164	0,37	0,5507
Intra grupos	442,399	14	31,5999		
Total (Corr.)	454,216	15			

Puesto que el valor P de la prueba F es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de %E<sub>24</sub> entre un nivel de solventes y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Figura H25. Prueba de múltiples rangos para %E<sub>24</sub> por solventes

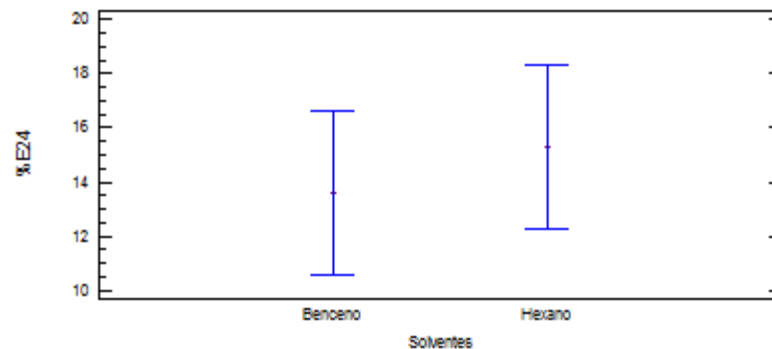
Método: 95,0 porcentaje LSD

Solventes	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Benceno	8	13,5725	X
Hexano	8	15,2913	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Benceno - Hexano		-1,71875	6,02835

\* indica una diferencia significativa.

Figura H26. Medias y 95 % de Fisher LSD



Esta gráfica muestra la media de %E<sub>24</sub> para cada uno de los niveles de solventes. También muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. Estos intervalos se traslapen y no tienen una diferencia estadísticamente significativa.

### 3) Efecto de NaCl para el índice de emulsificación con cada solvente

Figura H27. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A.Solvente	52,3834	2	26,1917	2,19	0,1408
B:%NaCl	180,009	3	60,0031	5,02	<b>0,0106</b>
RESIDUOS	215,259	18	11,9588		
TOTAL (CORREGIDO)	447,651	23			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Sí existe una diferencia significativa entre % NaCl y %E<sub>24</sub> para el biosurfactante.

#### 3.1 Heptano

Figura H28. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	187,125	3	62,3751	<b>16,50</b>	<b>0,0102</b>
Intra grupos	15,117	4	3,77925		
Total (Corr.)	202,242	7			

Sí existe una diferencia significativa entre el % NaCl y la estabilidad del biosurfactante ( $p > 0,05$ ) con heptano.

#### 3.2 Benceno

Figura H29. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	89,1045	3	29,7015	<b>2,58</b>	<b>0,1907</b>
Intra grupos	45,9717	4	11,4929		
Total (Corr.)	135,076	7			

No existe una diferencia significativa entre el % NaCl y la estabilidad del biosurfactante ( $p > 0,05$ ) con benceno.

### 3.3 Hexano

Figura H30. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	30,5876	3	10,1959	1,50	0,3435
Intra grupos	27,2408	4	6,81019		
Total (Corr.)	57,8284	7			

No existe una diferencia significativa entre el % NaCl y la estabilidad del biosurfactante ( $p > 0,05$ ) con hexano.

### 3.4 Interacción entre benceno y heptano para la estabilidad del biosurfactante

Figura H31. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	13,4139	1	13,4139	0,56	0,4678
Intra grupos	337,131	14	24,0808		
Total (Corr.)	350,545	15			

Puesto que el valor P de la prueba F es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de %E<sub>24</sub> entre un nivel de solventes y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Figura H32. Prueba de múltiples rangos para %E<sub>24</sub> por solventes

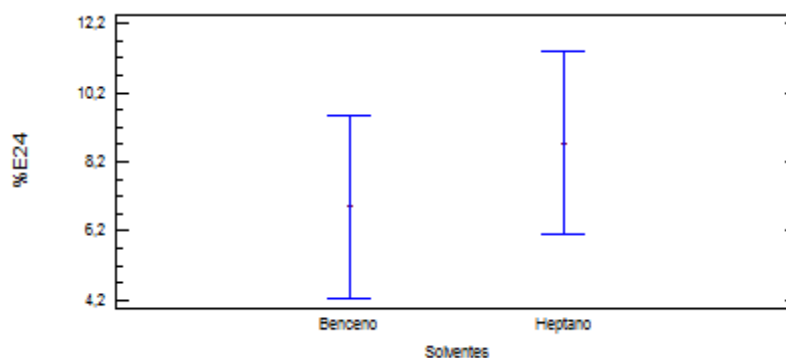
Método: 95,0 porcentaje LSD

Solventes	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Benceno	8	6,90375	X
Heptano	8	8,735	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Limites
Benceno - Heptano		-1,83125	5,26248

\* indica una diferencia significativa.

Figura H33. Medias y 95 % de Fisher LSD



Esta gráfica muestra la media de %E<sub>24</sub> para cada uno de los niveles de solventes. También muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. Estos intervalos se traslapen y no tienen una diferencia estadísticamente significativa.

### 3.5 Interacción entre hexano y heptano para la estabilidad del biosurfactante

Figura H34. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	52,4538	1	52,4538	2,82	0,1151
Intra grupos	260,071	14	18,5765		
Total (Corr.)	312,525	15			

Puesto que el valor P de la prueba F es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de %E<sub>24</sub> entre un nivel de solventes y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Figura H35. Prueba de múltiples rangos para %E<sub>24</sub> por solventes

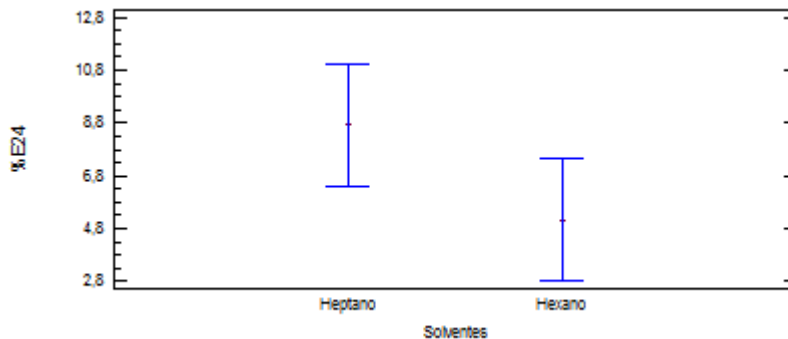
Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Solventes</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Hexano	8	5,11375	X
Heptano	8	8,735	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Heptano - Hexano		3,62125	4,62207

\* indica una diferencia significativa.

Figura H36. Medias y 95 % de Fisher LSD



Esta gráfica muestra la media de %E<sub>24</sub> para cada uno de los niveles de solventes. También muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. Estos intervalos se traslapen y no tienen una diferencia estadísticamente significativa.

### 3.6 Interacción entre benceno y hexano para la estabilidad del biosurfactante

Figura H37. Análisis de varianza para %E<sub>24</sub>

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	12,8164	1	12,8164	0,93	0,3512
Intra grupos	192,898	14	13,7784		
Total (Corr.)	205,714	15			

Puesto que el valor P de la prueba F es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de %E<sub>24</sub> entre un nivel de solventes y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Figura H38. Prueba de múltiples rangos para %E<sub>24</sub> por solventes

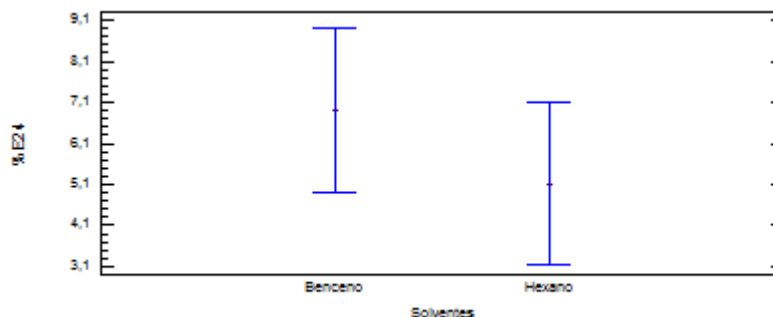
Método: 95,0 porcentaje LSD

Solventes	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Hexano	8	5,115	X
Benceno	8	6,905	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Limites
Benceno - Hexano		1,79	3,98065

\* indica una diferencia significativa.

Figura H39. Medias y 95 % de Fisher LSD



Esta gráfica muestra la media de %E<sub>24</sub> para cada uno de los niveles de solventes. También muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. Estos intervalos se traslapan y no tienen una diferencia estadísticamente significativa.

**Anexo I. Prueba de hipótesis de comparación para remoción de metales  
(STATGRAPHICS centurión XV versión 15.2.06)**

M<sub>1</sub>: % Remoción de metales con solución de biosurfactante

M<sub>2</sub>: % Remoción de metales con control negativo

Hipótesis nula (H<sub>0</sub>) : M<sub>1</sub> – M<sub>2</sub> = 0

Hipótesis alterna (H<sub>1</sub>) : M<sub>1</sub> – M<sub>2</sub> ≠ 0

Tabla I1. Prueba de hipótesis de comparación de remoción de metales.

Cromo					
Método	Medias	Desviación estándar	Tcal	Valor P	Hipótesis (H <sub>0</sub> ) P < 0,05
M <sub>1</sub>	26,156	0,05	368,24	7·10 <sup>-5</sup>	Rechazada
M <sub>2</sub>	7,744				
Cobre					
Método	Medias	Desviación estándar	Tcal	Valor P	Hipótesis (H <sub>0</sub> ) P < 0,05
M <sub>1</sub>	40,411	0,05	593,1	3·10 <sup>-5</sup>	Rechazada
M <sub>2</sub>	10,756				
Níquel					
Método	Medias	Desviación estándar	Tcal	Valor P	Hipótesis (H <sub>0</sub> ) P < 0,05
M <sub>1</sub>	23,467	0,05	331,78	9·10 <sup>-5</sup>	Rechazada
M <sub>2</sub>	6,878				

Plomo					
Método	Medias	Desviación estándar	Tcal	Valor P	Hipótesis (Ho) P< 0,05
M <sub>1</sub>	60,056	0,05	1113,34	8,1·10 <sup>-7</sup>	Rechazada
M <sub>2</sub>	4,389				
Zinc					
Método	Medias	Desviación estándar	Tcal	Valor P	Hipótesis (Ho) P< 0,05
M <sub>1</sub>	85,918	0,05	1687,76	3,5·10 <sup>-7</sup>	Rechazada
M <sub>2</sub>	1,53				

Existen diferencias significativas entre la remoción de metales en solución de biosurfactante en comparación con los controles negativos, para todos los metales.