



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

---

## **DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

### **POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

#### **PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES PARA SU USO POTENCIAL EN LA ELIMINACIÓN DE METALES PESADOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

**PRESENTA:**

**MARIA FERNANDA FIGUEROA SANEZ**

**DIRECTOR: DR. FRANCISCO JAVIER ALMENDARIZ TAPIA**

**Hermosillo, Sonora**

**Julio, 2021**

# Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

# UNIVERSIDAD DE SONORA

## APROBACION DEL JURADO

de la tesis presentada por:

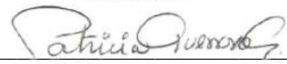
**I.Q. María Fernanda Figueroa Sanz**

Esta tesis ha sido revisada por cada uno de los miembros del Jurado y por mayoría de votos la han encontrado satisfactoria.

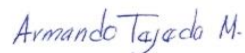
09/07/21  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia  
Presidente


09/07/21  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Patricia Guerrero Germán  
Secretario

09/07/21  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Armando Tejada Mansir  
Vocal

09/07/21  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Sergio Martínez Hernández  
Sinodal Externo



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

# UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ingeniería

**Posgrado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química**

## AUTORIZACIÓN DEL EXAMEN DE GRADO

12 de Julio de 2021.

Por medio de la presente se hace constar que la estudiante **MARIA FERNANDA FIGUEROA SANEZ**, ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de grado del programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería.

**DR. ABRAHAM ROGELIO MARTIN GARCÍA**

**COORDINADOR DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA:  
INGENIERÍA QUÍMICA**

## RESUMEN

En los últimos años, los productos metabólicos producidos por microorganismos han tenido una mayor atención, ya que la utilización de estos productos en bioprocesos de tratamiento de aguas y sedimentos contaminados con metales ha aumentado la eficiencia de eliminación. Entre los productos metabólicos, los biosurfactantes han sido ampliamente estudiados debido a sus múltiples aplicaciones, incluida la eliminación de metales pesados. Los biosurfactantes son una clase de compuestos que son producidos por algunos microorganismos que en varios casos son extracelulares, los cuales han sido investigados por su capacidad de formar complejos con algunos metales, tales como cadmio, plomo y zinc. En este estudio, se evaluó la producción de biosurfactantes de microorganismos metalotolerantes como potencial para la eliminación de metales pesados. Así mismo, se seleccionaron las siguientes bacterias del cepario del laboratorio de biorremediación de la Universidad de Sonora: *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas rhodesiae*, y *Pseudomonas aeruginosa*. En las pruebas de actividad hemolítica *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa* fueron los únicos microorganismos capaces de lisar los globulos rojos mientras que en la prueba de la actividad lipolítica solo *P. aeruginosa* hidrolizó al aceite vegetal. Con base a lo anterior se continuaron las pruebas de producción de biosurfactante utilizando glicerol (3% v/v) como fuente de carbono, con lo cual se logró una producción de 1.054 g/L a las 10 horas de cultivo, cuantificado como ramnolípido por el método del orcinol. La cuantificación de la biomasa permitió establecer que el biosurfactante es un metabolito primario asociado al crecimiento ya que se observó un incremento simultáneo de biomasa y biosurfactante con una producción máxima de microorganismos de  $11.33 \times 10^8$  UFC/mL a un tiempo de 7.96 h de acuerdo con el modelo logístico. Con el índice de emulsificación y la dispersión del aceite, realizadas con el sobrenadante libre de células, se comprobó que el biosurfactante es un metabolito extracelular observando un índice de emulsificación de 52.22% a las 10 h, que concuerda la producción de la biomasa con una dispersión del aceite positiva, sin embargo en la prueba de la gota colapsada no se observó ningún cambio, por lo que presumiblemente podría necesitarse una mayor cantidad de

biosurfactante en el sobrenadante para observar un colapso de la gota. En base a los resultados obtenidos se estableció una metodología confiable para la detección y cuantificación de biosurfactantes, los cuales pueden tener una potencial utilización en la eliminación de metales pesados de aguas de la industria minera.

## ABSTRACT

In recent years, the metabolic products produced by microorganisms have received greater attention, since the use of these products in bioprocess for the treatment of water and sediments contaminated with metals has increased the efficiency of elimination. Among metabolic products, biosurfactants have been widely studied due to their multiple applications, including the removal of heavy metals. Biosurfactants are a class of compounds that are produced by some microorganisms that in several cases are extracellular, which have been investigated for their ability to form complexes with some metals, such as cadmium, lead and zinc. In this study, the production of biosurfactants from metallotolerant microorganisms was evaluated as a potential for the removal of heavy metals. Likewise, the following bacteria were selected from the strain of the bioremediation laboratory of the University of Sonora: *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas rhodesiae*, and *Pseudomonas aeruginosa*. In the hemolytic activity tests, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa* were the only microorganisms capable of lysing red blood cells, whereas in the lipolytic activity test only *P. aeruginosa* hydrolyzed the vegetable oil. Based on the above, the biosurfactant production test were continued using glycerol (3% v/v) as a carbon source, with which a production of 1.0514 g/L was achieved at 10 hours of culture, quantified as rhamnolipid by the orcinol method. The quantification of the biomass allowed establishing that the biosurfactant is a primary metabolite associated with growth since a simultaneous increase in biomass and biosurfactant was observed with a maximum production of microorganisms of  $11.33 \times 10^8$  CFU/mL at time of 7.96 h according to the logistic model. With the emulsification index and the oil spreading, carried out with the cell-free supernatant, it was verified that the biosurfactant is an extracellular metabolite, observing an emulsification index of 52.22% at 10 h, which agrees the biomass production with a positive oil spreading, however in the drop-collapse test no change was observed so presumably to a greater amount of biosurfactant in the supernatant could be needed to observe a collapse of the droplet. Based on the results obtained, a reliable methodology was established for the detection and quantification of biosurfactants, which may have a potential use in removal of heavy metals from waters of the mining industry.

---

## DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a Dios y a mis padres en agradecimiento por siempre estar conmigo en las buenas y las malas.

A toda mi familia que siempre me ha apoyado en todos los aspectos.

A mis compañeros y amigos de posgrado por siempre apoyarme y darme ánimos para terminar este proyecto. Gracias por siempre apoyarme y por las anécdotas que compartimos.

A Rayza Herrera por ser mi amiga, compañera de estudios en toda esta etapa y por aguantarme jiji.

Los quiero muchoo !!!!



---

---

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>2</b>
<b>Objetivo General .....</b>	<b>3</b>
<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>4</b>
<b>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Contaminación por Metales Pesados .....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Cobre .....	5
<b>2.2 Biorremediación.....</b>	<b>5</b>
2.2.1 Microorganismos.....	6

---

2.2.2 Sustancias producidas .....	6
<b>2.3 Biosurfactantes .....</b>	<b>7</b>
2.3.1 Clasificación y propiedades .....	9
2.3.2 Pruebas de detección .....	12
<b>2.4 Producción de Biosurfactantes.....</b>	<b>17</b>
<b>2.5 Eliminación de Metales Pesados por Biosurfactantes .....</b>	<b>20</b>
2.5.1 Mecanismos de eliminación .....	21
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>24</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Materiales y Equipos .....</b>	<b>24</b>
3.1.1 Materiales.....	24
3.1.2 Equipos .....	24
3.1.3 Medios de cultivo .....	25
<b>3.2 Metodología .....</b>	<b>26</b>
3.2.1 Resiembra.....	26
3.2.2 Pruebas de detección y producción de biosurfactantes .....	26
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>30</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Pruebas de detección .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2 Producción de Biosurfactantes.....</b>	<b>34</b>

---

<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>43</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>43</b>
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>45</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>52</b>
<b>Anexo A:.....</b>	<b>52</b>
<b>Anexo B:.....</b>	<b>53</b>

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Relación de la tensión superficial, concentración de biosurfactante en la formación de micelas. ....	10
<b>Figura 2.</b> Actividad hemolítica positiva para a) <i>Pseudomonas stutzeri</i> , b) <i>Pseudomonas sp</i> , c) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	13
<b>Figura 3.</b> Actividad lipolítica positiva para a) <i>Pseudomonas stutzeri</i> , b) <i>Pseudomonas sp</i> , c) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	14
<b>Figura 4.</b> Gota colapsada, a) Positivo y b) Control negativo .....	15
<b>Figura 5.</b> Dispersión del aceite .....	16
<b>Figura 6.</b> Índice de Emulsificación (E24).....	16
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de remoción de metales pesados por biosurfactantes iónicos..	22
<b>Figura 8.</b> Crecimiento en agar sangre de a) <i>Bacillus cereus</i> , y b) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , c) <i>Bacillus megaterium</i> y d) <i>Pseudomonas rhodesiae</i> .....	31
<b>Figura 9.</b> En agar LB suplementado con aceite de oliva y Rodamina B de: a) <i>Bacillus cereus</i> y b) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , c) <i>Bacillus megaterium</i> y d) <i>Pseudomonas rhodeasiae</i> . ....	33
<b>Figura 10.</b> Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el medio mínimo mineral .....	36
<b>Figura 11.</b> Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( ) y producción de ramnolípidos ( ) .....	37
<b>Figura 12.</b> Dispersión del aceite utilizando sobrenadante libre de células de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	39
<b>Figura 13.</b> Gota colapsada utilizando sobrenadante libre de células de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	40
<b>Figura 14.</b> Índice de emulsificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	41
<b>Figura 15.</b> Tubos del Índice de emulsificación .....	42
<b>Figura 16.</b> Estructura del ramnolípidos.....	52
.....	52

---

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Aplicación de los tensoactivos dependiendo del valor de HLB. ....	11
<b>Tabla 2.</b> Microorganismos productores de biosurfactantes .....	17
<b>Tabla 3.</b> Agar LB.....	25
<b>Tabla 4.</b> Agar nutritivo.....	25
<b>Tabla 5.</b> Medio mínimo mineral.....	26
<b>Tabla 6.</b> Turbidez estándar de McFarland.....	53

---

## **AGRADECIMIENTO**

Le agradezco a la Universidad de Sonora y a CONACYT por aceptarme y su apoyo en la terminación de este proyecto.

Al Posgrado en Ciencias de la Ingeniería por todo su apoyo y facilidades a lo largo de la maestría.

Al Comité: Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia, Dra. Patricia Guerrero Germán, Dr. Armando Tejeda Mansir, Dr. Sergio Martínez Hernández por todo su apoyo y recomendaciones a lo largo de mi formación.

A la Dra. Guadalupe López Avilés, Dra. Diana Terán Valdez, Dra. Ramona Guadalupe Martínez Meza, Dra. María Teresa Certucha Barragán por todo su apoyo y consejos.

Muchas Gracias !!!

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### Introducción

La contaminación del agua y suelo, debido a las actividades antropogénicas ha ocasionado una gran problemática a la salud de la población (Huang et al., 2014; Reyes et al., 2016). Los tratamientos biológicos como la biorremediación tienen la gran ventaja de que son más amigables con el medio ambiente, debido a que utilizan microorganismos o metabolitos para reducir, eliminar o transformar los contaminantes presentes en sedimentos, suelo y agua (Pandey & Fulekar, 2012)

En los últimos años ha tenido una mayor atención los productos metabólicos, ya que la utilización de estos productos ha aumentado la remoción de metales en suelos y aguas contaminadas. Entre los productos metabólicos, los biosurfactantes han sido ampliamente estudiados debido a sus múltiples aplicaciones, incluida la remoción de metales pesados (Govarathan et al., 2017).

Los biosurfactantes son una clase de compuestos que son producidos por algunos microorganismos que en varios casos son excretados. Han sido investigados por su capacidad de formar complejos con los metales como cadmio (Cd), plomo (Pb) y zinc (Zn). El complejo biosurfactante puede aumentar la solubilidad aparente de los metales, por lo que no es tóxico para las células (Gomathy & Sabarinathan, 2010). Estos compuestos contienen restos hidrofílicos, que se puede componer de un ácido, cationes peptídicos o aniones, mono, di o polisacáridos, mientras que el resto hidrofóbico se compone de cadenas de hidrocarburos o ácidos grasos saturados o insaturados, por el tipo de estructura adquiere la propiedad de reducir la tensión superficial e interfacial de

los líquidos, lo cual puede formar micelas y microemulsiones entre dos fases (Banat et al., 2010).

La recuperación de compuestos inorgánicos como los metales involucra la quelación y eliminación de iones, se debe a las interacciones químicas entre los compuestos anfipáticos de los biosurfactantes y los iones metálicos (Banat et al., 2010). Así mismo se ha observado que los biosurfactantes promueven la desorción de metales como el cadmio, plomo, zinc o cobre de suelos. Una de las ventajas más importantes es que los metales que son atrapados por micelas a través de un proceso electrostático, se pueden recuperar fácilmente por técnicas de separación de membranas (Kitamoto et al., 2002)

## **Justificación**

El Estado de Sonora es el principal productor de cobre, grafito entre otros., los procesos de obtención de estos materiales generan muchos desechos tóxicos como es el drenaje ácido de mina, al tener contacto con suelos y aguas contaminan, esto ocasiona el deterioro de la calidad del agua y la fertilidad del suelo, de acuerdo a estas razones es importante investigar e implementar alternativas para la biorremediación de sitios contaminados como es el uso de productos metabólicos de microorganismos endógenos. Uno de los metabolitos de gran interés debido a sus propiedades son los biosurfactantes, ya que su estructura le da unas ciertas características que los hacen mejores que los surfactantes químicos, pero lo más importante es que no son tóxicos para los microorganismos, por lo que la investigación se centra en la detección de microorganismos productores de biosurfactantes que se encuentran en el laboratorio de biorremediación de la Universidad de Sonora, los cuales fueron previamente aislados de sitios contaminados con metales pesados. La detección de microorganismos productores consiste en identificar y seleccionar aquellos que muestren capacidad hemolítica, lipolítica en agar sangre y agar rodamina B respectivamente, posteriormente evaluar la producción del biosurfactante por el método del orcinol y realizar las pruebas de la gota colapsada, dispersión del aceite y el índice de emulsificación.



## **Objetivo General**

Evaluar la producción de biosurfactantes de microorganismos metalotolerantes como potencial para la eliminación de metales pesados.

## **Objetivos Específicos**

- Identificar y seleccionar microorganismos que muestren capacidad hemolítica en cultivos de agar sangre.
- Identificar y seleccionar microorganismos que muestren capacidad lipolítica en cultivos adicionado con aceite de oliva.
- Evaluar la producción de biosurfactantes por el método del orcinol y las pruebas de la gota colapsada, dispersión del aceite y el índice de emulsificación.

## CAPÍTULO 2

### ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

#### 2.1 Contaminación por Metales Pesados

Los metales pesados, son un grupo de metales y metaloides con una densidad atómica superior a  $4000 \text{ Kg}/\text{m}^3$ . Los metales no pueden degradarse ni desintoxicarse fácilmente, su existencia y destino en el suelo es una de las grandes preocupaciones, debido a su impacto potencial en las comunidades microbianas, también porque es una contaminación potencial para el agua subterránea, lo que puede ocasionar problemas a la salud humana por su gran toxicidad (Kim & Vipulanandan, 2006).

La contaminación del agua y suelo por metales pesados ocasionada por las actividades del hombre y de forma natural, está afectando drásticamente la seguridad alimentaria y salud pública (Huang et al., 2014; Reyes et al., 2016). Cuando los metales entran a los ecosistemas acuáticos, los metales son transformados por procesos biogeoquímicos y se distribuyen entre varias especies con distintas características físico-químicas como en material particulado ( $>0.45 \mu\text{m}$ ), coloidal ( $1 \text{ nm}-0.45 \mu\text{m}$ ) y especies disueltas ( $=1 \text{ nm}$ ) (Martorell, 2010). El tipo de materia orgánica, inorgánica tanto particulada o coloidal, tienen un papel fundamental en los procesos de coagulación, sedimentación y adsorción, lo cual determina el tiempo de residencia y el transporte de los metales trazas desde la fuente de agua hacia otros tipos de matrices (Reyes et al., 2016).

Los metales pesados de mayor preocupación debido a su fuente antropogénica son los siguientes: mercurio, plomo, cadmio, cromo, antimonio, manganeso, níquel y cobre (Rodríguez Heredia, 2017), siendo este último uno de los de mayor producción en la industria de la minería en el Estado de Sonora.

### **2.1.1 Cobre**

El cobre es un metal no ferroso, el cual tiene un número atómico 29. La utilización y aplicación de este metal se debe a sus propiedades químicas, eléctricas, físicas y mecánicas. La mayor parte del cobre se obtienen de los sulfuros minerales como la calcopirita, covelita, bornita y enargita. El compuesto más importante fabricado industrialmente es el sulfato de cobre (Londoño-Franco et al., 2016).

Es ampliamente utilizado en el cableado eléctrico, en los techos, diversas aleaciones, pigmentos, utensilios de cocina, tuberías y en la industria química. Las sales de cobre se utilizan en el suministro de agua para controlar crecimientos biológicos en depósitos y tuberías de distribución, también para catalizar la reacción de oxidación del manganeso (Association, 2012).

El cobre se considera un elemento traza esencial para las plantas y los animales. Algunos compuestos son tóxicos por ingestión o inhalación. Respirar altos niveles puede causar irritación en la nariz y garganta, por otra parte la ingestión puede causar náuseas, vómitos, diarrea y dosis muy altas de cobre pueden causar daños al hígado y riñones, e incluso puede causar la muerte (Atsdr, 2004).

## **2.2 Biorremediación**

La biorremediación se clasifica en un tratamiento biológico, debido a que es un proceso en donde se utilizan microorganismos para reducir, eliminar o transformar los contaminantes presentes en sedimentos, suelo y agua. Este proceso depende de utilizar los microorganismos específicos correctos y las condiciones ambientales apropiadas. Los microorganismos endógenos de ambientes contaminados a menudo están bien adaptados para sobrevivir en presencia de contaminantes y condiciones extremas de temperatura, pH y potencial de oxidación/reducción del sitio (Pandey & Fulekar, 2012).

### 2.2.1 Microorganismos

Los microorganismos endógenos utilizan los nutrientes y los aceptores de electrones disponibles en presencia de agua líquida, por lo que el agua actúa como vehículo para el transporte de microorganismos y sustancias disueltas, lo que incluye contaminantes y subproductos de descomposición (Pandey & Fulekar, 2012).

En la biorremediación se utilizan microorganismos resistentes a los metales, ya que tienen sistemas genéticos que contrarrestan los efectos tóxicos y que son capaces de sobrevivir en ambientes con altas concentraciones de estos elementos (Marrero-Coto et al., 2010). Por otra parte, los microorganismos tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia del metal. Tanto los microorganismos resistentes como tolerantes son de particular interés como captadores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes (Vullo, 2003).

Los microorganismos influyen directamente en el destino de los metales en el medio ambiente y puede proporcionar la clave para disminuir la contaminación ya existente. En respuesta a la presencia de los metales en el medio ambiente, los microorganismos han desarrollado mecanismos ingeniosos de resistencia al metal y detoxificación (Gomathy & Sabarinathan, 2010).

### 2.2.2 Sustancias producidas

Los microorganismos crecen y viven en aglomerados como biopelículas, gránulos o flóculos (Martínez, 2007), debido a que producen ciertas sustancias como son las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), los cuales son una mezcla compleja de polímeros de alto peso molecular, se constituye principalmente por polisacáridos, proteínas, sustancias de tipo húmico, ácidos nucleicos, lípidos y glicoproteínas (Perovano Filho et al., 2019).

El hierro es un nutriente esencial para casi todos los microorganismos. Sin embargo, en el ambiente aerobio, el hierro existe principalmente como  $Fe^{3+}$  y tiende a formar hidróxidos insolubles, por lo que no está disponible para los microorganismos. Las bacterias han desarrollado estrategias para solubilizar este metal para su eficiente

absorción. Una de las estrategias más comúnmente conocidas y desarrolladas por las bacterias es la producción de sideróforos, los cuales son quelantes de hierro de bajo peso molecular con altas constantes de asociación para la complejación de hierro. Por lo tanto, los sideróforos actúan como agentes solubilizantes para el hierro a partir de minerales o compuestos orgánicos en condiciones de limitación del hierro. Además, los sideróforos también pueden formar complejos estables con otros metales que son de gran preocupación para el medio ambiente, como son Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb, Zn. La unión del sideróforo a un metal aumenta la concentración de metal soluble (Miethke & Marahiel, 2007; Nair et al., 2007; Rajkumar et al., 2010).

Otra de las sustancias más importantes y de gran estudio actualmente son los biosurfactantes.

### **2.3 Biosurfactantes**

Los biosurfactantes son compuestos anfipáticos que contienen restos hidrófobos e hidrófilos, que reducen la tensión superficial y la tensión interfacial entre moléculas individuales en una superficie y en la interfase (Gautam & Tyagi, 2006). Estos compuestos pueden ensamblarse entre superficies y minimizar la tensión superficial entre ellos. Además, muestran una alta actividad de emulsificación, por otro lado, se producen sobre la superficie de las células microbianas o fuera de la célula (Alwaely et al., 2019). Los biosurfactantes son metabolitos secundarios con baja o nula toxicidad, los cuales son producidos por microorganismos, como bacterias, levaduras y hongos, cuando se cultivan en medios de cultivo que contienen compuestos orgánicos como fuente de carbono, que no son sustancias disueltas como los hidrocarburos, aceites, etc., los microorganismos producen muchos materiales, incluido el biosurfactante para propagar esa fuente de carbono dentro de la célula.

Las características que tienen en común la mayoría de los biosurfactantes, las cuales tienen mayores ventajas con respecto a los surfactantes sintéticos, son las siguientes:

**Actividad superficial e interfacial:** los biosurfactantes tienen mayor efectividad y eficiencia en comparación con los surfactantes sintéticos, debido a que bajan la tensión superficial a una concentración más baja (Desai & Banat, 1997).

**Tolerancia a la temperatura, pH, fuerza iónica:** muchos biosurfactantes y su actividad superficial no se ven afectados por condiciones ambientales como la temperatura y el pH, por lo que se pueden utilizar en condiciones ambientales extremas (Nitschke & Costa, 2007).

**Biodegradabilidad:** Los biosurfactantes son biodegradables, debido a que son compuestos producidos por microorganismos (Mohan et al., 2006) por lo que los surfactantes sintéticos no son biodegradables.

**Baja toxicidad:** Los biosurfactantes tienen mejor biodegradabilidad, debido a su estructura molecular específica y por su origen microbiano tienen menor toxicidad, lo que resulta en una ventaja, ya que es amigable con el medio ambiente y tiene aplicaciones en la industria de la comida, cosméticos y productos farmacéuticos (Poremba et al., 1991).

**Disponibilidad:** Los biosurfactantes se pueden producir a partir de materias disponibles o hasta residuos agroindustriales, ya que contienen altos niveles de hidratos de carbono o lípidos, los cuales son indispensables para el crecimiento y síntesis. Una de las ventajas de utilizar residuos agroindustriales es la eliminación de estos residuos y tratamientos (Nitschke & Costa, 2007).

**Especificidad:** Como los biosurfactantes son moléculas orgánicas complejas, los cuales tienen grupos funcionales específicos y por lo tanto también en su acción. Esta característica es de particular interés en la desintoxicación de contaminantes específicos (Kosaric, 1992).

La función de la producción del biosurfactante es primero romper la tensión superficial e interfacial entre dos fases como: líquido/líquido, gas/líquido, sólido/líquido y por otro lado, es conocer la concentración de biosurfactante a la cual se forman las micelas, que es un parámetro que permite estudiar la actividad tensioactiva como es la Concentración

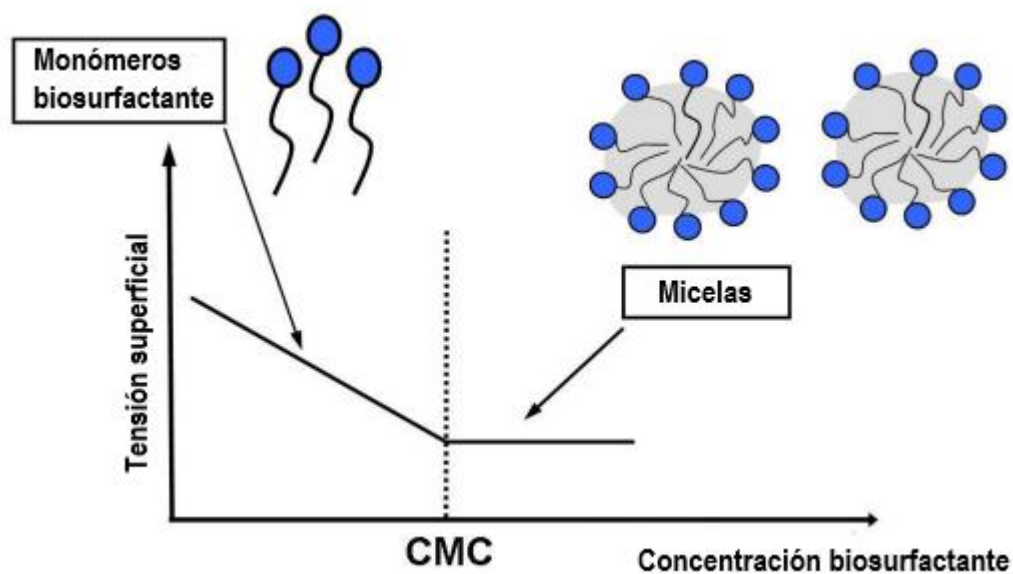
Micelar Crítica (CMC) (Yañez-Ocampo & Wong-Villarreal, 2013). Estas dos funciones permiten incrementar la transferencia de masa, por lo que hacen que las fuentes de carbono de baja solubilidad estén más disponibles para su biodegradación e incorporación al metabolismo para generación de energía y producción de biomasa microbiana. Los biosurfactantes favorecen la biodisponibilidad de los contaminantes, debido a que se establece el equilibrio de desorción-solubilización, por otro lado, desplazan el equilibrio hacia la fase acuosa, lo que hace que se lleven a cabo los diferentes procesos de transporte como el difusivo, convectivo y la biodegradación del contaminante, por lo que es uno de los aspectos más importantes de estos metabolitos microbianos (Kitamoto et al., 2002; Rosenberg & Ron, 1999; Yañez-Ocampo & Wong-Villarreal, 2013).

### **2.3.1 Clasificación y propiedades**

Los biosurfactantes se agrupan en biosurfactantes de bajo peso molecular y alto peso molecular, según su naturaleza bioquímica. Los de bajo peso molecular (lipopéptidos, glicolípidos, fosfolípidos) reducen eficazmente la tensión superficial e interfacial, por otro lado, los de alto peso molecular (biosurfactantes poliméricos y en partículas) es un agente estabilizador de una emulsión. De acuerdo con su composición química se clasifican en glicolípidos, por ejemplo: los ramnolípidos, soforolípidos, trehalolípidos, lípidos de manosilitrol. En el grupo de los lipopéptidos entran lo que es la surfactina, liquenina, iturina, fengycina, serrwettin. Otra de las agrupaciones es en ácidos grasos/fosfolípidos/lípidos neutros, por ejemplo: ácido fosfálico, fosfato de lípidos, fosfato de ácido fólico. Como biosurfactantes poliméricos están el emulsan, alasan, biodispesan, liposan y como biosurfactantes en partículas a las vesículas y células enteras (Fenibo et al., 2019; Pacwa-Płociniczak et al., 2011; Stancu, 2015).

Los biosurfactantes también se denominan biotensioactivos, debido a que son sustancias producidas por microorganismos que modifican la tensión superficial entre dos interfases, las cuales pueden ser agua/aire o aceite/agua y se mide por medio de tensiómetros (Jimenez Islas et al., 2010; Makkar & Cameotra, 1998). Los tensioactivos tienen diferentes propiedades que los caracterizan y se miden por medio de diferentes parámetros que se describirán a continuación.

**Concentración Micelar Crítica (CMC):** Es la concentración de tensioactivos que se requiere para que se alcance la mínima tensión superficial. Por otro lado, también es la concentración de tensioactivos, la cual por debajo de esta concentración las micelas se forman espontáneamente. A valores menores a la CMC los tensioactivos contenidos en una solución se presentan como monómeros que se ubican en la interfase agua-aire (Jiménez Islas et al., 2010) y a valores mayores, las moléculas de biosurfactantes se asocian para formar micelas, bicapas y vesículas. Los biosurfactantes reducen la tensión superficial e interfacial, y al mismo tiempo aumenta la solubilidad y la biodisponibilidad de compuestos orgánicos hidrófobos (Pacwa-Płociniczak et al., 2011; Whang et al., 2008). La CMC se utiliza para medir la eficiencia del tensioactivo, es decir los biosurfactantes son más eficientes cuando tienen una CMC baja, debido a que se utiliza una menor cantidad de biosurfactante para reducir la tensión superficial (Desai & Banat, 1997). En la Figura 1. Se muestra la relación que tiene la Concentración Micelar Crítica (CMC), concentración de biosurfactante y la tensión superficial en la formación de micelas.



**Figura 1.** Relación de la tensión superficial, concentración de biosurfactante en la formación de micelas. Adaptada de Pacwa-Płociniczak et al., 2011.



**Número de agregación (N):** Es la cantidad de moléculas (monómeros) de tensoactivo que se necesitan para formar micelas. Los agregados *micelares* se conforman por lo general aproximadamente de 20 a 100 monómeros (Chu, 2003; JimÉnez Islas et al., 2010).

**Balance hidrofílico-lipofílico (HLB):** Los tensoactivos pueden actuar como emulsionante, detergente o solubilizante de un aceite. Esta capacidad depende del HLB, el cual es el equilibrio de la fuerza y tamaño de los grupos hidrofílicos y lipofílicos de un emulsionante (Griffin, 1949), en otras palabras es la capacidad que tiene un tensoactivo para formar emulsiones estables en los sistemas agua-aceite o aceite-agua (Jimenez Islas et al., 2010). Un emulsionante de carácter lipofílico, es decir que es más soluble en aceites y grasas, se le asigna un valor bajo de HLB, por lo que el emulsionante es adecuado para sistemas agua-aceite. Al contrario de un emulsionante de carácter hidrofílico, el cual tiene mayor solubilidad en agua, se le asigna un valor alto de HLB, por lo tanto el emulsionante es adecuado para sistemas aceite-agua, según la Regla de Bancroft (Griffin, 1949). La aplicación de los tensoactivos depende del valor de HLB como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Aplicación de los tensoactivos dependiendo del valor de HLB (Jimenez Islas et al., 2010).

HLB	Aplicación
4-6	Emulsificante para sistemas agua-aceite
7-9	Humectante
8-18	Emulsificante para sistemas aceite-agua
13-15	Detergentes
10-18	Solubilizadores

**Punto de nube (PN):** La mayoría de los tensoactivos no iónicos se observa una relación inversa de temperatura y solubilidad, debido al aumento de la temperatura de la solución, disminuye la solubilidad en agua, por lo que precipitan y a nivel macroscópico se observa cierta turbidez en forma de nube (Mu et al., 2001; Myers, 2005).

Los biosurfactantes son producidos por una gran variedad de microorganismos bajo diferentes condiciones de cultivo como fuente de carbono, nutrientes, entre otros factores, por lo que define su estructura, propiedades y por consecuencia su aplicación en diferentes nichos ecológicos, por lo tanto es importante conocer las propiedades del tensoactivo para su adecuada aplicación (Ron & Rosenberg, 2001).

### 2.3.2 Pruebas de detección

La actividad hemolítica, el método de la gota colapsada, dispersión del aceite y el índice de emulsificación son unas de las pruebas preliminares que se realizan para confirmar si tiene actividad superficial. Los resultados positivos o negativos de estas pruebas no nos confirman totalmente la presencia de compuestos que tengan la capacidad de disminuir la tensión superficial e interfacial, por lo que se necesitan técnicas cuantitativas, como por ejemplo la medición de la tensión superficial e interfacial por medio de tensiómetros (Camacho Moreno, 2018).

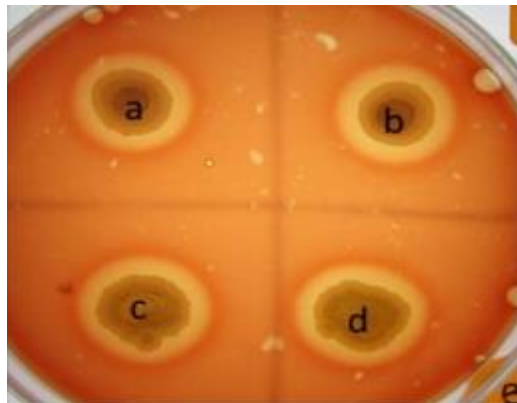
**Actividad hemolítica:** La estructura de la membrana de los eritrocitos (glóbulos rojos) se compone principalmente por lípidos (40%), proteínas (52%) y carbohidratos (8%), estas sustancias permiten un perfecto ensamblaje, lo que constituye el citoesqueleto celular (Dodge & Mitchell). Las proteínas y los lípidos se mantienen unidos por la fuerza de cohesión, esto se debe a interacciones no covalentes como los enlaces de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, fuerzas de Van der Waals y efectos hidrofóbicos (Sheet & Singer, 1974).

La lisis de los eritrocitos (hemólisis) por surfactantes puede ocurrir por solubilización de la membrana y lisis por vía osmótica. La solubilización de la membrana ocurre a medida que aumenta la concentración de surfactante, se da una interacción entre los monómeros de surfactante con los lípidos que conforman la bicapa. Los monómeros penetran en la bicapa hasta que se da la saturación, por lo que se forman micelas mixtas

de surfactante y lípido, trae como consecuencia la remoción de los componentes de la membrana y por consiguiente su solubilización (Jones, 1999).

La lisis por vía osmótica se reporta que se lleva a cabo en cuatro etapas: primero los monómeros de surfactante se adsorben en la membrana del eritrocito, posteriormente se introducen en la red que forma la bicapa lipídica y provocando un desorden en las interacciones entre los lípidos y proteínas que conforman la membrana. En la tercera etapa se da una alteración al equilibrio de Donnan, por lo que provoca cambios en la fluidez y la permeabilidad de la membrana, debido a esto inducen flujos de iones transmembrana, esto conlleva una pérdida de K y una entrada Na. En la última etapa se da una penetración de agua para que se dé un equilibrio en la presión osmótica, debido a la entrada y salida de estos iones, ocasiona un cambio en la morfología de la membrana de una forma bicóncava a esferoide, por otra parte, las fuerzas de cohesión de la membrana no son lo suficientemente fuertes para poder equilibrar los cambios en la presión por lo que ocurre la lisis (Kova et al., 1997; Manaargadoo-Catin et al., 2016; Nozaki et al., 1974; Seeman, 1974).

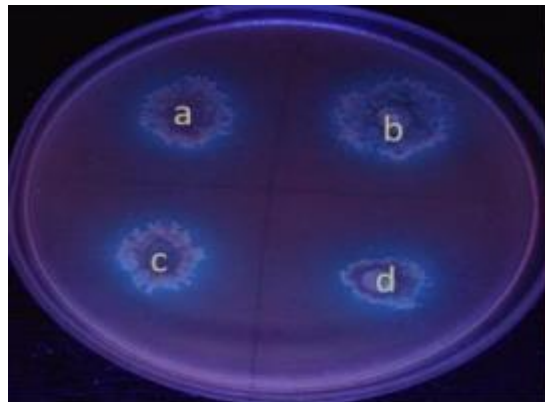
El comportamiento y resistencia que presentan los eritrocitos con la presencia de surfactantes depende del tipo de surfactante, condiciones de cultivo y del tipo de eritrocito que se utilice (Bielawski, 1990).



**Figura 2.** Actividad hemolítica positiva para a) *Pseudomonas stutzeri*, b) *Pseudomonas sp.*, c) *Pseudomonas aeruginosa* (Becerra Gutiérrez & Horna Acevedo, 2016)

**Actividad lipolítica:** Cuando los microorganismos se ponen en contacto con sustratos insolubles en agua producen lipasas y biosurfactantes, debido a que no pueden metabolizar estos compuestos, por lo que requieren de este tipo de sustancias para que tengan un mejor contacto o en su caso hidrolizar estos compuestos para su posterior degradación y asimilación (Desai & Banat, 1997).

La selección de microorganismos productores de lipasas se puede observar con el método de la placa con agar rodamina B, ya que no le afecta los cambios de pH. El aceite de oliva se utiliza como un sustituto barato de la trioleína, el cual es el triglicérido del ácido oleico. La producción de la enzima lipasa se observa irradiando las cajas Petri con luz ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 350 nm, después del tiempo de incubación si las colonias bacterianas muestran halos fluorescentes de color naranja alrededor de la colonia, esto quiere decir que este microorganismo es productor de lipasa. En el caso contrario cuando no producen la enzima, la colonia se observa de color rosa, debido a que acumulan la rodamina B y no se muestra fluorescencia de color naranja (Kouker & Jaeger, 1987). Las lipasas catalizan la hidrólisis de los triglicéridos en ácidos grasos, mono-diglicéridos y glicerol, ya que es un sustrato que es insoluble en agua y lo realizan en la interface aceite-agua (Jette & Ziomek, 1994).



**Figura 3.** Actividad lipolítica positiva para a) *Pseudomonas stutzeri*, b) *Pseudomonas sp.*, c) *Pseudomonas aeruginosa* (Becerra Gutiérrez & Horna Acevedo, 2016)

**Método del orcinol:** Se basa en el uso de un colorante para la cuantificación del contenido de ramnolípidos en una muestra mediante medidas de absorción a 421 nm. La molécula de ramnosa de los ramnolípidos reacciona con ácido sulfúrico y orcinol a altas temperaturas (30 min a 80°C) y se mide la intensidad del color que aparece (Chandrasekaran, 1980; Heyd et al., 2008).

**Gota colapsada:** Se basa en la capacidad de los surfactantes para desestabilizar las gotas líquidas en una superficie que contiene aceite, por lo que se relaciona con la tensión superficial. Sobre la superficie del aceite se agregan una determinada cantidad de un sobrenadante, por lo que puede pasar dos cosas: si el líquido no contiene tensoactivos (biosurfactante), las moléculas de agua son repelidas de la superficie hidrofóbica (aceite) y las gotas permanecen estables. Cuando el líquido contiene biosurfactantes, las gotas se extienden hasta que colapsan debido a la reducción de la tensión interfacial entre la gota de líquido y la superficie del aceite. La concentración de tensoactivo es importante en la estabilidad de las gotas de líquido, por lo que se correlaciona con la tensión superficial e interfacial (Jain et al., 1991; Walter et al., 2010).

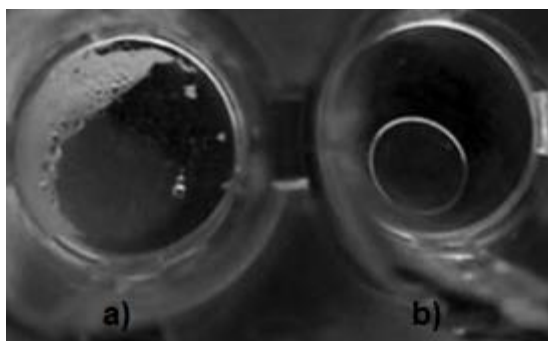


Figura 4. Gota colapsada, a) Positivo y b) Control negativo (Tugrul & Cansunar, 2005)

**Dispersión del aceite:** En una caja Petri se coloca una cierta cantidad de agua y en su superficie se agregan ciertos microlitros de un hidrocarburo, posteriormente sobre la superficie del hidrocarburo se le añade tantos microlitros de sobrenadante en el centro del hidrocarburo. Cuando en el sobrenadante hay presencia de biosurfactantes, el aceite se desplaza y se forma una zona clara (Morikawa et al., 2000).



**Figura 5.** Dispersión del aceite (Guatemala Hernández & Barrera Cortés, 2018)

**Índice de emulsificación:** La estabilización de una emulsión, se requiere disminuir la tensión superficial e interfacial entre dos fases, por lo que se utilizan biosurfactantes y bioemulsionantes. La evaluación de la actividad emulsificante es cuando una sustancia estabiliza y forma una emulsión de una mezcla de sustancias inmiscibles. Se calcula con el índice de emulsificación (E24), el cual consiste en medir la altura de la emulsión dividido por la altura total de la columna de líquido, a su vez es un método de detección que nos indica la producción de biosurfactantes y se correlaciona con la concentración de tensoactivo (Becerra Gutiérrez & Horna Acevedo, 2016; Cooper & Goldenberg, 1987; Walter et al., 2010).



**Figura 6.** Índice de Emulsificación (E24) (Martínez, 2011)

## 2.4 Producción de Biosurfactantes

La producción de biosurfactantes por fermentación depende de los microorganismos productores y de la naturaleza del biosurfactante, por lo que son posibles los siguientes patrones de producción: 1.- producción asociada al crecimiento, 2.- producción en condiciones limitantes del crecimiento, 3.- producción en reposo/no crecimiento de células, y 4.- producción asociada con el aumento de precursores (Rodrigues et al., 2006).

En la producción asociada al crecimiento, se puede observar que existe una estrecha relación entre el sustrato, el crecimiento y la producción del biosurfactante (Desai & Banat, 1997), por lo que el crecimiento celular y la acumulación de productos metabólicos se ven influenciados por la composición del medio de cultivo como son la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, factores ambientales o de crecimiento y sales inorgánicas (Li et al., 2002) que se describen a continuación.

En la Tabla 2. se muestran los microorganismos productores de diferentes tipos de biosurfactantes.

**Tabla 2.** Microorganismos productores de biosurfactantes (Desai & Banat, 1997)

<b>Biosurfactante</b>	<b>Microorganismo</b>
<b>Glicolípidos</b>	
Ramnolípidos	<i>P. aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp</i>
Trehalolípidos	<i>R. erythropolis</i> <i>N. erythropolis</i>
Soforolípidos	<i>T. bombicola</i>
Cellobiolípidos	<i>U. zeae</i> <i>U. maydis</i>
<b>Lipopéptidos y Lipoproteínas</b>	
Péptido-lípido	<i>B. licheniformis</i>
Serrawettin	<i>S.marcescens</i>
Viscosin	<i>P. fluorescens</i>
Surfactin	<i>B. subtilis</i>
Subtilisin	<i>B. subtilis</i>
Gramicidinas	<i>B. brevis</i>

Polimixinas	<i>B. polymyxa</i>
<b>Ácidos grasos, lípidos neutros y fosfolípidos</b>	
Ácidos grasos	<i>C. lepus</i>
Lípidos neutros	<i>N. erythropolis</i>
Fosfolípidos	<i>T. thiooxidans</i>
<b>Surfactantes poliméricos</b>	
Emulsan	<i>A. calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>
Mannan-lípido-proteína	<i>C. tropicalis</i>
Liposan	<i>C. lipolytica</i>
Carbohidrato-proteína-lípido	<i>P. fluorescens</i>
	<i>D. polymorphis</i>
Proteína PA	<i>P. aeruginosa</i>
<b>Partículas biosurfactantes</b>	
Vesículas y fimbrias	<i>A. calcoaceticus</i>
Células enteras	Variedad de bacterias

**Fuente de carbono:** La fuente de carbono influye en la síntesis de biosurfactantes por inducción o represión. La adición de un sustrato inmiscible en agua da como resultado la inducción de la producción de biosurfactantes (Nitschke et al., 2005). En la producción de ramnolípidos, cuando se utilizan como fuente de carbono solubles en agua como glicerol, glucosa, manitol y etanol, se obtiene una producción menor que cuando se utilizan sustratos inmiscibles en agua como *n*-alcanos y otros tipos de hidrocarburos (Robert et al., 1989; Sylatk et al., 1985). Mata-Sandoval *et al.*, 2001 Cultivaron *Pseudomona aeruginosa* UG2 en sustratos inmiscibles en agua como aceite de maíz, manteca y alcoholes de cadena larga, obtuvieron una producción de 100-165 mg de ramnolípidos/ g de sustrato, por otra parte cuando usaron sustratos solubles en agua como son la glucosa y el ácido succínico obtuvieron 12-36 g ramnolípidos/g de sustrato (Mata-Sandoval et al., 2001), por lo que se confirma el efecto que tiene la fuente de carbono en la producción de biosurfactantes.

**Fuente de nitrógeno:** La fuente de nitrógeno es esencial para la producción de biosurfactantes, ya que el nitrógeno es muy importante en el metabolismo de los microorganismos, debido a que es un elemento indispensable para la producción de



aminoácidos y enzimas, por lo que son muy importantes en la degradación de hidrocarburos y entre otros compuestos (Ercoli et al., 2001). García *et al.*, 2017 evaluaron el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas sp.*, utilizando como sustrato el petróleo diésel 2. Obtuvieron la mayor producción de ramnolípidos cuando emplearon el sulfato de amonio con 0.0593 mg%, seguido del nitrato de sodio con 0.0418 mg% y la menor producción se observó cuando utilizaron urea, lo cual se obtuvo 0.0260 mg% (García et al., 2017). Estos resultados nos confirman que la naturaleza de la fuente de nitrógeno es muy importante.

**Factores ambientales:** Los factores ambientales y las condiciones de cultivo como son la temperatura, pH, agitación y la disponibilidad de oxígeno afectan la producción de biosurfactantes debido a que influyen en el crecimiento, el metabolismo (Cameotra & Makkar, 1998).

El efecto de la temperatura es un factor importante en el crecimiento microbiano y en la producción de biosurfactantes. Arora *et al.*, 2019 utilizaron la bacteria hipertermófilo clostridium para la producción de una glicoproteína como el biosurfactante. Las condiciones de cultivo fueron a una temperatura de 80, 90, 96, 101 °C y evaluaron el índice de emulsificación. Observaron una emulsificación comparable del petróleo crudo (100%) a 96 y 101°C, donde los valores del índice de emulsificación fueron de  $97.4 \pm 2.2$  y  $94.4 \pm 2.4\%$  respectivamente. Concluyeron que la actividad del biosurfactante a alta temperatura es aplicable para la recuperación mejorada de aceite microbiano en depósitos de petróleo a alta temperatura. El efecto del pH lo evaluaron a pH-5, 6, 7, 8 y 9, por lo que obtuvieron un pH óptimo de 7 para la producción de biosurfactantes por N-4, por lo que fue consistente con estudios anteriores de Liu *et al.*, (2017) y Nayarisseri *et al.*, (2018), lo cual mostraron un pH neutro para la producción de biosurfactantes. El ultimo efecto que evaluaron fue el de la salinidad en concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) de 4, 7, 10, 13 % y obtuvieron que se puede producir en un amplio rango de salinidad, por lo que el óptimo fue de 4%. Las condiciones óptimas de producción de la glicoproteína (1.0 g/L) fueron 96°C, pH-7 y 4% de salinidad (Arora et al., 2019; Liu et al., 2017; Nayarisseri et al., 2018).

Moussa *et al.*, evaluaron el efecto de la agitación en la producción de biosurfactantes por *Nocardia amarae*. El cultivo fue estudiado en estático y con agitación de 100, 120, 150, 200 y 250 rpm durante 14 días a 30°C, observaron que al aumentar la velocidad de agitación, aumentaba la producción del metabolito y obtuvieron la mayor producción a 150 rpm (Moussa *et al.*, 2006).

## 2.5 Eliminación de Metales Pesados por Biosurfactantes

Las tecnologías para la eliminación de metales pesados se dividen en tres categorías: 1) químico, 2) biológico/bioquímico/biosorción y 3) fisicoquímico (Hashim *et al.*, 2011). En las tecnologías biológicas, se encuentra la biorremediación, la cual utilizan microorganismos, ya que pueden ejercer una influencia indirecta sobre la movilidad de un metal, debido a que pueden modificar el pH o mediante la producción o liberación de sustancias (Bruins *et al.*, 2000).

La utilización de biosurfactantes en la descontaminación de compuestos orgánicos (hidrocarburos), es aumentar su biodisponibilidad o movilizar y eliminar los contaminantes del medio por pseudo solubilización y emulsificación durante un tratamiento específico. En la recuperación de compuestos inorgánicos involucra la quelación y eliminación de iones, debido a las interacciones químicas entre los compuestos anfipáticos de los biosurfactantes y los iones metálicos (Banat *et al.*, 2010).

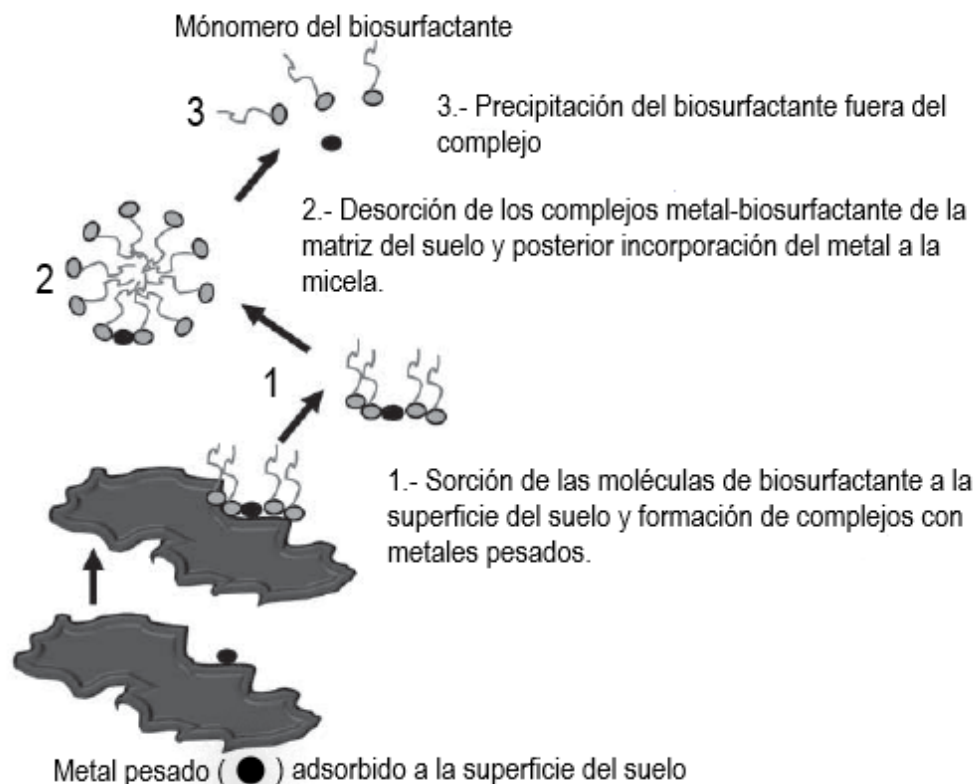
Los tensoactivos reducen la tensión superficial del líquido, debido a los grupos hidrófilos e hidrófobos, esto hace que los metales pesados estén más disponibles para la remediación de suelos contaminados (Ron & Rosenberg, 2001). Mulligan & Wang en el 2006, realizaron experimentos utilizando una espuma generada por soluciones de ramnolípidos al 0.5% a diferentes valores de pH (6.8, 8, 10) para investigar las eficiencias de eliminación de metales como el cadmio (Cd) y níquel (Ni), las mejores tasas de eliminación fueron del 73.2% y 68.1% respectivamente, estas eficiencias se obtuvieron a un pH de 10 de la solución. Los metales se eliminaron formando complejos con los tensoactivos en la superficie del suelo, debido a que se separaron de la solución del

suelo debido a la disminución de la tensión interfacial, por lo tanto, se asociaron a las micelas del biosurfactante (Mulligan & Wang, 2006).

### **2.5.1 Mecanismos de eliminación**

Los biosurfactantes se utilizan en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados, debido a la capacidad que tienen de formar complejos con metales. Los biosurfactantes aniónicos forman complejos con los metales a través de enlaces iónicos, ya que este tipo de enlace es más fuerte que el enlace entre el suelo y el metal, posteriormente el complejo metal-biosurfactante se desorbe de la matriz del suelo, debido a la disminución de la tensión interfacial. Los biosurfactantes catiónicos pueden reemplazar los mismos iones cargados a través de la competencia con algunas, pero no todas las superficies cargadas negativamente (intercambio iónico)(Aşçı et al., 2008; Sarubbo et al., 2015; Singh & Cameotra, 2004).

La eliminación de metales por biosurfactantes iónicos sigue los siguientes pasos: 1) sorción del biosurfactante a la superficie del suelo y formación de complejos con el metal, 2) desorción del metal a la solución y 3) adsorción a las micelas del biosurfactante. Los metales pesados se unen a las micelas por interacciones electrostáticas, como se muestra en la Figura 2 (Mulligan, 2009; Sarubbo et al., 2015).



**Figura 7.** Mecanismo de remoción de metales pesados por biosurfactantes iónicos. Adaptada de Sarubbo et al., 2015.

En las últimas décadas se han realizado estudios de la utilización de biosurfactantes para la eliminación de metales a continuación, se mencionarán algunos estudios:

En 1995 Mulligan *et al.*, realizaron experimentos de lavado de suelo por lotes para evaluar la viabilidad del uso del biosurfactante surfactin producido por *Bacillus subtilis*, para la eliminación de metales pesados en suelo. El suelo contaminado contenía altos niveles de metales como 890 mg zinc/kg, 420 mg cobre/kg. El suelo se enriqueció para aumentar los niveles de cobre, zinc y cadmio a 550 mg/kg, 1200 mg/kg y 2000 mg/kg respectivamente. Obtuvieron que 0.25% surfactin/1% NaOH podría eliminar el 25% de cobre y 6% de zinc del suelo, por lo que hicieron cinco lavados del suelo con 0.25% surfactin/1% NaOH y fue capaz de eliminar el 70% de cobre y el 22% de zinc (Mulligan *et al.*, 1999).

Massara *et al*; en el 2007 estudiaron el efecto de la adición de biosurfactantes cargados negativamente (ramnolípidos) sobre la kaolinite contaminada con cromo. Los resultados mostraron que los ramnolípidos tienen la capacidad de extraer una porción del 25% de Cr (III) de la kaolinite. El procedimiento de extracción secuencial mostró que los ramnolípidos eliminan Cr (III) principalmente de las porciones de carbonato y oxido/hidróxido de la kaolinite, también tienen la capacidad de reducir cerca del 100% de los Cr (VI) a Cr (III) (Massara et al., 2007).

Wang *et al*; en el 2009 realizaron experimentos en columna para evaluar la viabilidad de utilizar el biosurfactante ramnolípidos (JBR425) para mejorar la eliminación de arsénico y metales pesados de una muestra de relaves de una mina oxidada. Obtuvieron que una solución de ramnolípidos al 0.1% (pH 11) podría mejorar significativamente la eliminación de arsénico y metales pesados como cobre, plomo y zinc simultáneamente. Los resultados mostraron que la eliminación acumulativa de arsénico, cobre, plomo y zinc alcanzó 148 mg/kg, 74 mg/kg, 2379 mg/kg y 259 mg/kg después de un enjuague de 70 poros respectivamente (Wang & Mulligan, 2009).

En el 2018 Karnwal investigó el efecto de biorremediación de biosurfactantes producidos por *Pseudomonas fluorescencia* RE1 y RE17 endófitos sobre metales pesados como el zinc (zn), cromo (Cr), cadmio (Cd) y níquel (Ni). El análisis de biorremediación mostró que los aislamientos RE1 y RE17 redujeron la concentración de Zn hasta en un 92% y 90% a pH 7.5 respectivamente, por otra parte, para el Ni, el % de eliminación para las dos cepas fue del 95% a pH 7.5. Los resultados de biosorción para Cr y Cd arrojaron que la mayor eficiencia de eliminación de metales por la cepa RE17 a pH 8 fue de 92% y 98% respectivamente (Karnwal, 2018).

## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales y Equipos

El material y el equipo que se utilizó en esta investigación se encuentra en el Laboratorio de Biorremediación de la Universidad de Sonora.

##### 3.1.1 Materiales

- Puntas estériles de 1000  $\mu$ L
- Agitador magnético
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Cajas Petri estériles desechables
- Papel aluminio
- Probeta
- Asa bacteriológica
- Taponés de algodón
- Vasos de precipitado

##### 3.1.2 Equipos

- Balanza analítica OHAUS ADVENTURER AR2140
- Placa de calentamiento con agitación
- Medidor de pH Thermo Scientific Orion
- Agitador Vortéx
- Campana de flujo laminar LABCONCO Purifier logic+

- Incubadora *Shaker Incubator CVP-500 CScientific®*
- Espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 10S UV-Vis
- Centrífuga Eppendorf 5424
- Micropipeta de 1000 µl
- Incubadora estacionaria *Thermo Scientific™ Lindberg/Blue M™ Modelo GI200A-1*
- Microtubos para centrífuga Eppendorf de 1.5 mL

### 3.1.3 Medios de cultivo

En las tablas 3, 4 y 5 se muestran los medios de cultivo utilizados, los cuales fueron utilizados para la reactivación de las cepas y para las pruebas de producción de biosurfactantes. Estos medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C por 15 minutos.

**Tabla 3.** Agar LB

Reactivo	Concentración
Cloruro de sodio	5.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Peptona de caseína	10.0 g
Agar	15.0 g
Agua	1.0 L

**Tabla 4.** Agar nutritivo

Reactivo	Concentración
Extracto de res	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agar	15.0 g
Agua	1.0 L

**Tabla 5.** Medio mínimo mineral

Reactivo	Concentración
NaNO <sub>3</sub>	4.0 g
NaCl	1.0 g
KCl	1.0 g
CaCl <sub>2</sub>	0.075 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.189 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.409 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub>	0.001 g

## 3.2 Metodología

### 3.2.1 Resiembra

Se seleccionaron las siguientes bacterias del cepario del laboratorio de biorremediación de la Universidad de Sonora: *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas rhodesiae*.

Se resembraron en placas con agar nutritivo con excepción de *Pseudomonas rhodesiae*, la cual se inoculó en agar LB. Cada medio de cultivo se preparó en 150 mL de agua destilada, para aproximadamente entre 5 y 6 cajas Petri, posteriormente se esterilizó a 121°C por 15 minutos, se dejó enfriar por 20 minutos aproximadamente y se distribuyó en las cajas Petri en una campana de flujo laminar. Con un asa bacteriológica se procedió a sembrar con la técnica de estría para cada bacteria, se incubaron a 30°C durante 24 a 48 horas.

### 3.2.2 Pruebas de detección y producción de biosurfactantes

Una vez comprobada la viabilidad de las cepas, se procedió a realizar las pruebas de detección de biosurfactantes.



### ***Actividad hemolítica***

Las bacterias seleccionadas se sembraron en agar sangre al 5%. La preparación del medio de cultivo consistió en disolver 40 g/L del agar base sangre en agua destilada, se esterilizó en autoclave por 15 minutos y se dejó enfriar hasta una temperatura aproximadamente de 40°C, posteriormente se agregó despacio la sangre y con un movimiento suave se agitó para homogenizar y por último se vertió en las cajas Petri en la campana de flujo laminar.

Cada una de las bacterias se sembró en el agar sangre y se incubó a 30°C durante 24 a 48 horas. La actividad hemolítica positiva se determinó por la presencia de un halo transparente alrededor de la colonia o zona de crecimiento (Becerra Gutiérrez & Horna Acevedo, 2016).

### ***Actividad lipolítica***

Esta actividad se realizó en agar rodamina B, para ello se preparó el agar LB en agua destilada y se le añadió 3% de aceite de oliva, se ajustó el pH a 7, se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos y se dejó enfriar hasta una temperatura de 60 °C, posteriormente se le añadió 1% de Tween 80 y 10 mg/mL de rodamina B (sigma®), la cual se pasó por un filtro estéril de 2 µm. El medio completo se agitó vigorosamente por 1 minuto y se dejó reposar por 10 min para después vaciar a las cajas Petri (Cartagena-Luna et al., 2020; Kouker & Jaeger, 1987).

Los microorganismos seleccionados se sembraron en las placas con agar rodamina B, se incubaron a 30°C durante 24 a 48 horas, se monitoreó a las 24 horas el crecimiento, para después observar las colonias bajo luz UV a 350 nm. Un resultado positivo se observa cuando hay presencia de un halo anaranjado alrededor de la colonia cuando se expone a luz ultravioleta (Kouker & Jaeger, 1987).

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

Para las pruebas de producción de biosurfactantes, como la gota colapsada, dispersión del aceite y el Índice de emulsificación, se utilizó el sobrenadante del cultivo libre de células, por lo que las bacterias fueron crecidas en medios líquidos.

Se utilizó el medio mínimo mineral, suplementado con 3 % (v/v) de glicerol como fuente de carbono y se ajustó el pH a 6.8 (Giraldo et al., 2014; Guo-Liang et al., 2005). Los matraces inoculados con el microorganismo seleccionado fueron incubados en un agitador orbital CScientific CVP-500 a 30°C, se monitoreó el crecimiento por densidad óptica (DO) a 620 nm por medio del espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 10S UV-Vis cada 2 horas durante las primeras 12 horas y posteriormente cada 12 horas.

Para conocer la densidad de bacterias con respecto al tiempo, se realizó la escala de McFarland, la cual consiste en realizar una serie de tubos con diferentes concentraciones de cloruro de bario y ácido sulfúrico, como se muestra en el Anexo B en la Tabla 6. Se realizó la lectura de los tubos con la turbidez de McFarland a una densidad óptica de 620 nm, debido a que es la longitud de onda en la cual se monitoreó el crecimiento del microorganismo (Arcos et al., 2004; Li et al., 1993).

El sobrenadante se centrifugó para separar la biomasa, posteriormente al sobrenadante libre de células se le realizó las pruebas de producción y detección de biosurfactantes.

### ***Método del Orcinol***

La producción de biosurfactantes se cuantificó por triplicado mediante la determinación colorimétrica de azúcares por orcinol (Chandrasekaran, 1980). El biosurfactante se purificó separando primero las células del sobrenadante mediante centrifugación (10,000 g). Se realizó la extracción del sobrenadante con cloroformo y etanol. La muestra de 0.5 mL de sobrenadante se extrajo con 1 mL cloroformo: etanol (2:1, v/v), posteriormente la fase orgánica se evaporó a sequedad y se le añadieron 0.5 mL de agua destilada. A 0.1 mL de cada muestra con la dilución adecuada, se le añadieron 0.9 mL de una solución que contenía orcinol al 0.19 % (en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 53%). Después de calentar durante 30 min a 80°C, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se midió la DO 421. La concentración de ramnolípidos se calculó a partir de curvas estándar con L-ramnosa (0-100 mg/L) y se expresó como equivalente de ramnosa (Wang et al., 2007). Se expresaron en valores de ramnolípidos (g/L) de acuerdo a lo indicado por Guo-Liang *et al.*, 2005 (Guo-Liang et al., 2005). Los valores de ramnosa se multiplican por un coeficiente de 3.4, obtenido de la correlación de ramnolípidos puros/ramnosa (Chandrasekaran, 1980).

***Gota colapsada***

Se colocó una gota del sobrenadante de un cultivo sobre una superficie recubierta de aceite. Las gotas de sobrenadante que contienen biosurfactantes colapsan, mientras que las gotas que no tienen biosurfactantes permanecen estables. Se usa como control negativo el agua destilada. El aceite utilizado en esta prueba fue el aceite de oliva (Tugrul & Cansunar, 2005).

***Dispersión del aceite***

En una caja Petri se le añaden 40 mL de agua destilada teñida con colorante cristal violeta, en el centro se colocó 50  $\mu$ L de aceite o hidrocarburo (Queroseno). Posteriormente se le añadió a la superficie del aceite 10  $\mu$ L del sobrenadante de un cultivo (Camacho Moreno, 2018; Olteanu et al., 2011).

***Índice de emulsificación ( $E_{24}$ )***

Se determinó mediante la adición de 2 mL de aceite vegetal, a cada tubo que contiene 2 mL del sobrenadante libre de células, posteriormente se agitó a alta velocidad durante 2 minutos en vórtex y se dejó reposar durante 24 horas. El índice de emulsificación se determinó como el porcentaje de la altura de la capa emulsionada (cm) dividido por la altura total de la columna de líquido (cm). El porcentaje del índice de emulsificación se calcula con la Ec. (1) (Becerra Gutiérrez & Horna Acevedo, 2016).

$$\%E_{24} = \frac{\text{Altura de emulsión formada (cm)}}{\text{Altura Total de la solución (cm)}} \times 100 \quad (1)$$

## CAPÍTULO 4

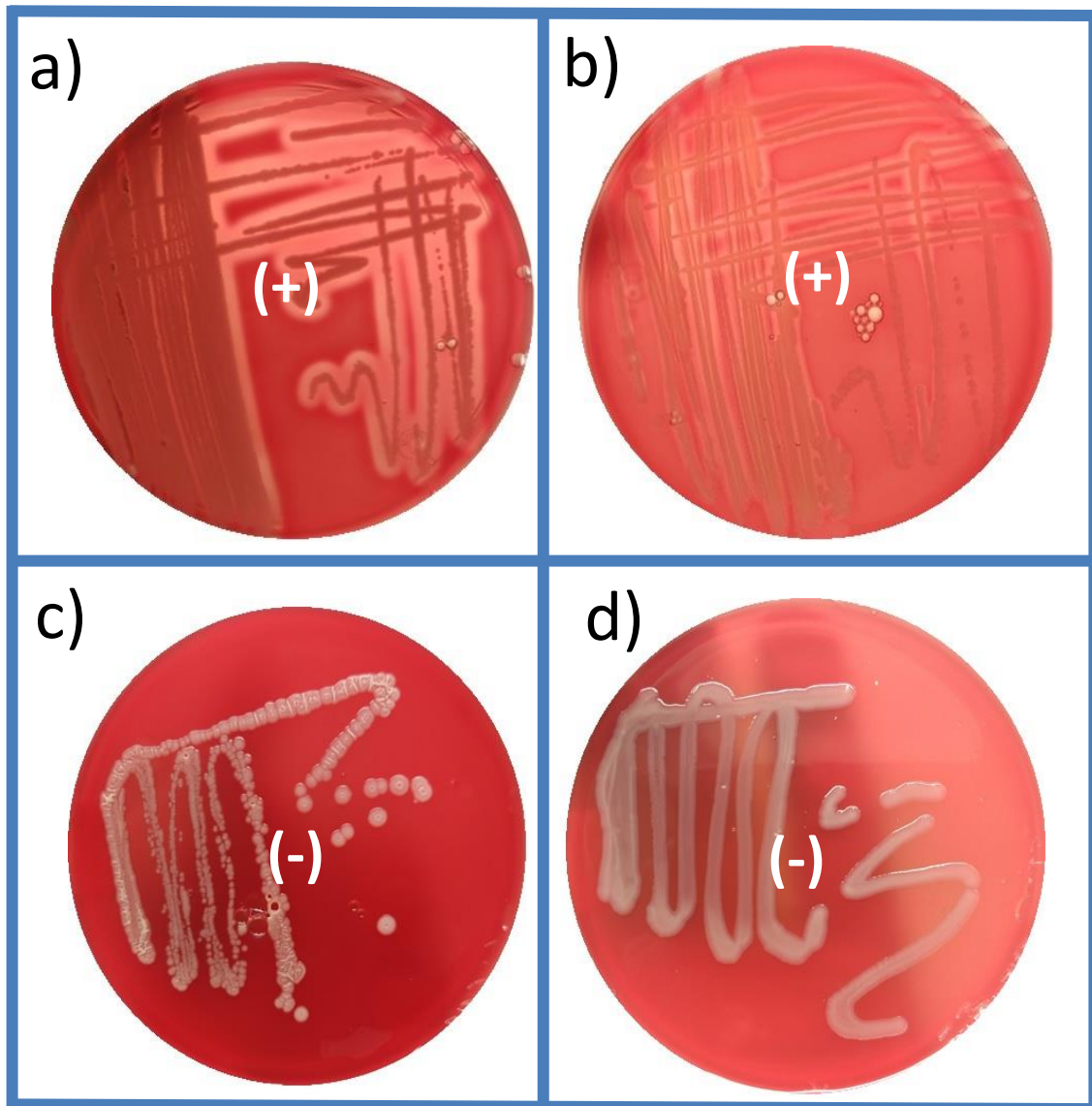
### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Pruebas de detección

Una vez que se comprobó la viabilidad de los microorganismos *Bacillus cereus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus megaterium* y *Pseudomona rhodesiae*, se procedió a realizar las pruebas de detección y producción de biosurfactantes.

##### **Actividad hemolítica**

En la Figura 8 se muestra el crecimiento en agar sangre de los microorganismos *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *B. megaterium*, y *P. rhodiseae*. En la Figura 8a y 8b se observa un halo claro alrededor del crecimiento lo que indica que estas bacterias poseen actividad hemolítica. La lisis de los glóbulos rojos puede indicar la presencia de biosurfactantes, ya que estos pueden solubilizar la parte lipídica de la membrana (Jain et al., 1991; Mulligan et al., 1984). Otro punto importante también es que los microorganismos pueden excretar enzimas como por ejemplo la lipasa (Rabbani et al., 2013), la cual hidroliza las grasas, esto podría ocurrir debido a la composición de la membrana de los eritrocitos, ya que es una bicapa lipídica, esta hipótesis se podría corroborar con la actividad lipolítica (Pedroza-Padilla et al., 2017). Cabe señalar que la actividad hemolítica no es definitiva para señalar que un microorganismo es productor de biosurfactantes, por lo que se debe complementar con más ensayos.

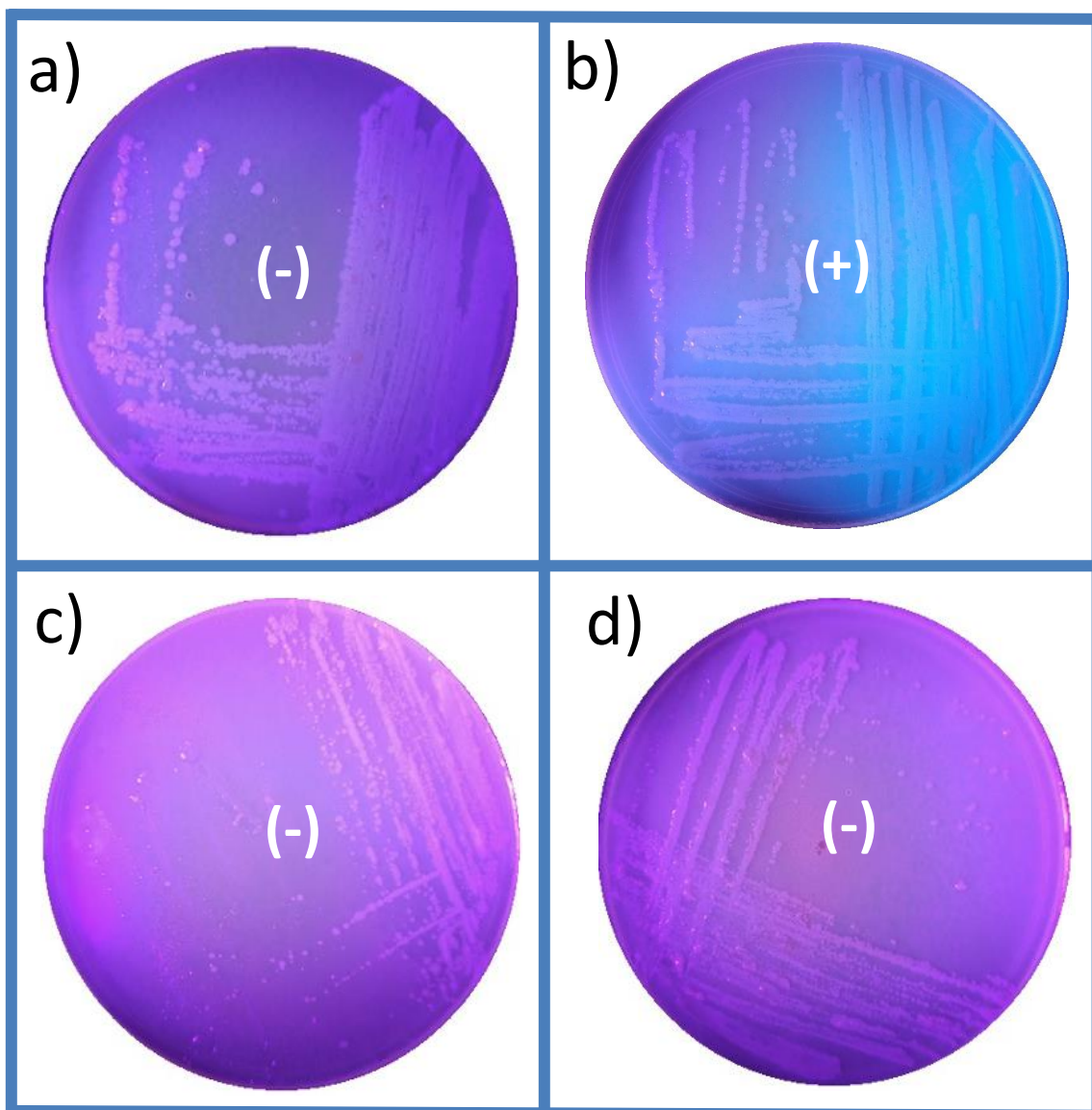


**Figura 8.** Crecimiento en agar sangre de a) *Bacillus cereus*, y b) *Pseudomonas aeruginosa*, c) *Bacillus megaterium* y d) *Pseudomonas rhodesiae*.

### **Actividad lipolítica**

En la Figura 9 se muestra el crecimiento en agar LB suplementado con aceite de oliva y Rodamina B de los microorganismos *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *B. megaterium*, y *P. rhodiseae*. En la Figura 9b con la bacteria *P. aeruginosa* se observó fluorescencia, la cual no fue captada por la fotografía digital, sin embargo, si se observa un cambio de color a transparente en la parte con más tiempo de cultivo, lo que indica una hidrólisis positiva del aceite de oliva. En las placas a, c y d no se observó el cambio de color a transparente, por lo que en estos cultivos la prueba de actividad lipolítica se consideró negativa.

La fluorescencia y transparencia de color en el cultivo con *P. aeruginosa*, fue una prueba positiva de la producción de lipasas como enzimas extracelulares, las cuales hidrolizaron los enlaces éster carboxil de las moléculas de triacilglicerol del aceite de oliva, con lo cual se generaron ácidos grasos y glicerol que se acomplejaron con la Rodamina B para generar la fluorescencia. La actividad lipolítica es importante debido a que los microorganismos a veces no pueden asimilar los compuestos complejos insolubles en agua, por lo que esto estimula al microorganismo para excretar este tipo de enzimas. Las enzimas lipasas son importantes en la elaboración de detergentes (Rabbani et al., 2013).



**Figura 9.** En agar LB suplementado con aceite de oliva y Rodamina B de: a) *Bacillus cereus* y b) *Pseudomonas aeruginosa*, c) *Bacillus megaterium* y d) *Pseudomonas rhodesiae*.

## 4.2 Producción de Biosurfactantes

Después de comprobar que *P. aeruginosa* presentó tanto actividad hemolítica como actividad lipolítica, se procedió a realizar las pruebas de producción de biosurfactantes con esta bacteria. Estas actividades se relacionan a la secreción de fosfolipasas tipo C, las cuales hidrolizan los fosfolípidos que contienen grupos amonio cuaternario (Ostroff et al., 1990).

*P. aeruginosa* es una bacteria ambiental que puede aislarse de muchos hábitats diferentes, incluido el agua, el suelo y las plantas, por otra parte, también es un patógeno humano oportunista que causa infecciones nosocomiales graves (Lyczak et al., 2000; Soberón-Chávez et al., 2005).

Jarvis y Johnson (1949) demostraron que esta bacteria produce biotensioactivos de tipo ramnolípidos, los cuales son moléculas anfifílicas compuestas por un resto de ácido graso hidrofóbico y una parte hidrofílica compuesta por una o dos ramnosa (Jarvis & Johnson, 1949; Soberón-Chávez et al., 2005), la estructura del biosurfactante se muestra en el Anexo A en la Figura 16.

La bacteria se inoculó en tubos de ensayo con 10 ml de caldo nutritivo, una vez crecida se pasó a un volumen de 100 ml del medio anterior y este sirvió como inóculo (10% v/v) para las pruebas de crecimiento en matraz con 250 ml del medio mineral mínimo.

Los datos del crecimiento de *P. aeruginosa* se ajustaron al modelo logístico de Verhulst-Pearl (Pearl & Reed, 1920; Verhulst, 1838) mediante la Ec. (2), utilizando el programa OriginPro® 9.1 y seleccionando Slogistic 1, como se muestra en la Figura 10.



$$X(t) = \frac{X_{max}}{1+e^{-\mu_{max}(t-t_m)}} \quad (2)$$

Donde:

$X(t)$  = Concentración máxima de microorganismo en el tiempo  $t$   $\left(\frac{UFC}{ml}\right)$

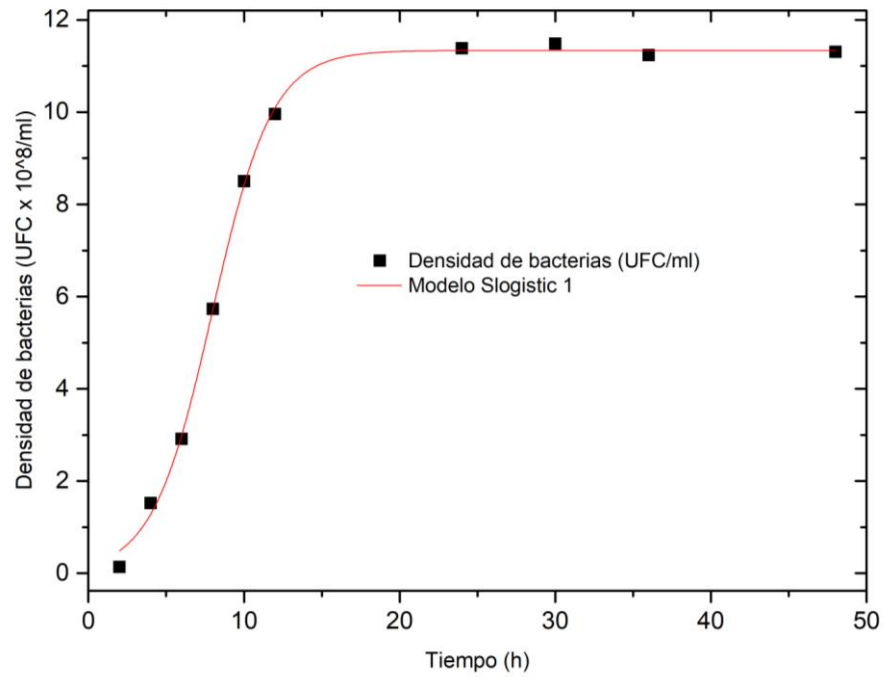
$t$  = Tiempo (h)

$X_{m\acute{a}x}$  = Concentración máxima de microorganismo  $\left(\frac{UFC}{ml}\right)$

$\mu_{m\acute{a}x}$  = Velocidad de crecimiento específica máxima ( $h^{-1}$ )

$t_m$  = Tiempo a la mitad de la concentración máxima de microorganismo (h)

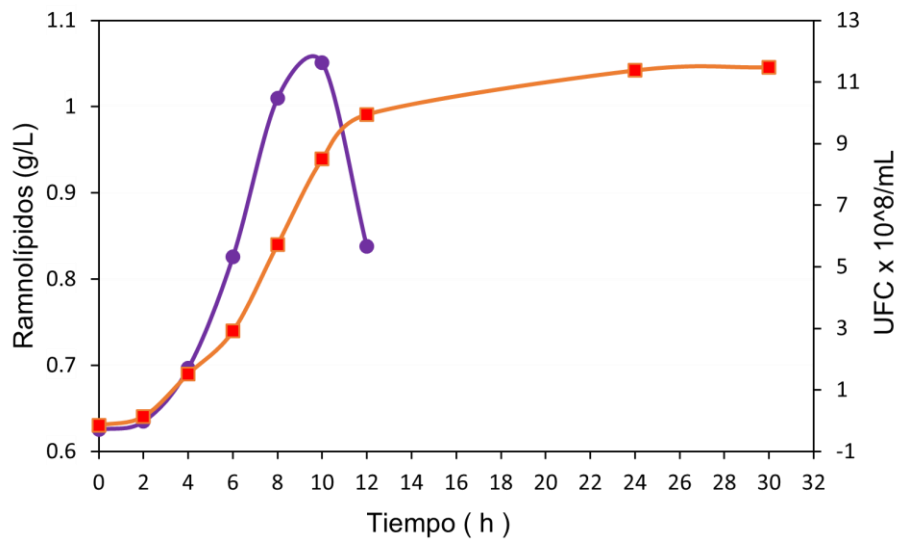
Después del período de incubación a condiciones estáticas, a una temperatura de 30°C y de acuerdo con los parámetros del modelo logístico, se obtuvo una concentración máxima de microorganismos ( $X_{m\acute{a}x}$ ) de  $11.33 \times 10^8$  UFC/mL a un tiempo ( $t_m$ ) de 7.96 h y un tiempo de duplicación celular de 1.33 h en base a la  $\mu_{m\acute{a}x}$  de  $0.52006 h^{-1}$  obtenida. Este tiempo de duplicación encontrado concuerda con lo reportado por Lavauve y Wargo (2015), quienes reportan que *P. aeruginosa* crece con un  $t_d$  de 1.5 horas en medio mineral, aunque este puede variar de acuerdo a los medios utilizados y condiciones de cultivo (Gibson et al., 2018). El ajuste del modelo tuvo un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 0.99.



**Figura 10.** Cinética de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en el medio mínimo mineral

### Cuantificación de Ramnolípidos por el método del orcinol

En la Figura 11 se observa el crecimiento de *P. aeruginosa*, así como la producción de biosurfactante en medio mineral suplementado con glicerol (3% v/v) como fuente de carbono. La cuantificación de los ramnolípidos se realizó mediante el método del orcinol tomando una muestra cada dos horas.



**Figura 11.** Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* (■) y producción de ramnolípidos (●)

Los resultados muestran que el biosurfactante del tipo ramnolípidos es un metabolito asociado al crecimiento de la bacteria debido a que se producen simultáneamente con el crecimiento microbiano (Shuler, 2002). A un tiempo de 10 horas, se observó la mayor producción de biosurfactante de 1.0514 g/L. Después del máximo observado a las 10 horas se observó un decremento en la concentración de ramnolípidos, esto se puede deber a que la bacteria a las 12 horas aunque disminuye su velocidad de crecimiento, esta sigue en desarrollo por lo que posiblemente el biosurfactante fue utilizado como fuente de carbono, ya que este ramnolípidos en su estructura tiene el azúcar ramnosa (Brandenburg et al., 2010), el cual después de una hidrólisis puede ser utilizado como una fuente de carbono.

Los ramnolípidos son producidos predominantemente por el género *Pseudomonas sp*, pero principalmente por *P. aeruginosa*, también otra de las especies de *Pseudomonas* de las que se ha informado que producen estos biosurfactantes son *P. chlororaphis*, *P. plantarii*, *P. putida* y *P. fluorescens*, por otra parte, se clasifican en: mono y di-ramnolípidos (Sekhon Randhawa & Rahman, 2014).

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los reportados por Cámara *et al.*, (2020), quienes obtuvieron una producción máxima de ramnolípidos de 0.908 g/L con una concentración inicial de glicerol de 126 g/L, por lo que los resultados muestran que diferentes concentraciones de sustrato afectan el crecimiento y la producción de ramnolípidos en la fermentación (Cámara *et al.*, 2020), además de las condiciones de incubación como son la temperatura y agitación.

### ***Gota colapsada y Dispersión del aceite/hidrocarburo***

Después de la prueba del Orcinol, así como para comprobar que el biosurfactante es un metabolito extracelular, se realizaron las pruebas de gota colapsada y dispersión de queroseno como confirmación de la producción de biosurfactantes por *Pseudomonas* y para ello se utilizó el sobrenadante del cultivo en glicerol.

La prueba de la dispersión del queroseno se muestra en la Figura 12, se observa que el sobrenadante del cultivo de *Pseudomonas* dispersó hacia las paredes al hidrocarburo debido a que se formó una zona clara, esto indica que el sobrenadante libre de células contiene biosurfactantes (Panjiar *et al.*, 2015).

El cambio de la tensión superficial producido por el biosurfactante es capaz de desplazar el aceite, también el diámetro de la zona clara en la superficie del aceite o en este caso queroseno se correlaciona con la capacidad para producir biosurfactante (del Carmen Lara-Severino *et al.*, 2017; Morikawa *et al.*, 1993)

Morikawa *et al.*, 2000 reportaron que el método fue eficaz para medir la actividad de los biosurfactantes, especialmente cuando la actividad y la cantidad de biosurfactantes no eran lo suficientemente altas, por otro lado, la prueba de dispersión se relaciona con la concentración de biosurfactantes, debido a que el área desplazada de aceite formada

por la actividad de los tensioactivos mostró relaciones lineales con la cantidad de tensioactivos ensayados.

El resultado positivo de la dispersión del aceite concuerda con Guatemala *et al.*, 2018 donde utilizaron un medio suplementado con glicerol, en el cual se obtuvo mayor dispersión del aceite de motor que con el medio implementado con glucosa (Guatemala Hernández & Barrera Cortés, 2018), por otro lado Priya *et al.*, 2009 reportan que las cepas aisladas de *Pseudomas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* producen actividad biosurfactante en aceite vegetal, queroseno, gasolina y diésel, ya que desplazaron estas sustancias antes mencionadas (Priya & Usharani, 2009).



**Figura 12.** Dispersión del aceite utilizando sobrenadante libre de células de *Pseudomonas aeruginosa*.

En la Figura 13 se muestra la prueba de la gota colapsada y se considera como un resultado negativo, debido a que la gota de sobrenadante permanece estable en la superficie del aceite por lo que no colapsa (Tugrul & Cansunar, 2005), sin embargo, se puede interpretar que el sobrenadante no contiene biosurfactantes, no obstante, Youssef *et al.*, en el 2004 indicaron que el método de la gota colapsada puede no ser tan sensible como la prueba de la dispersión del aceite para detectar niveles bajos de producción de biosurfactantes (Youssef *et al.*, 2004), De acuerdo a esto para que la gota colapsara necesitaría una mayor concentración de biosurfactantes para que fuera un resultado positivo, en conclusión esta prueba se tiene que complementar con las pruebas anteriores para corroborar si hay producción de biosurfactantes, por lo que no es una prueba definitiva.



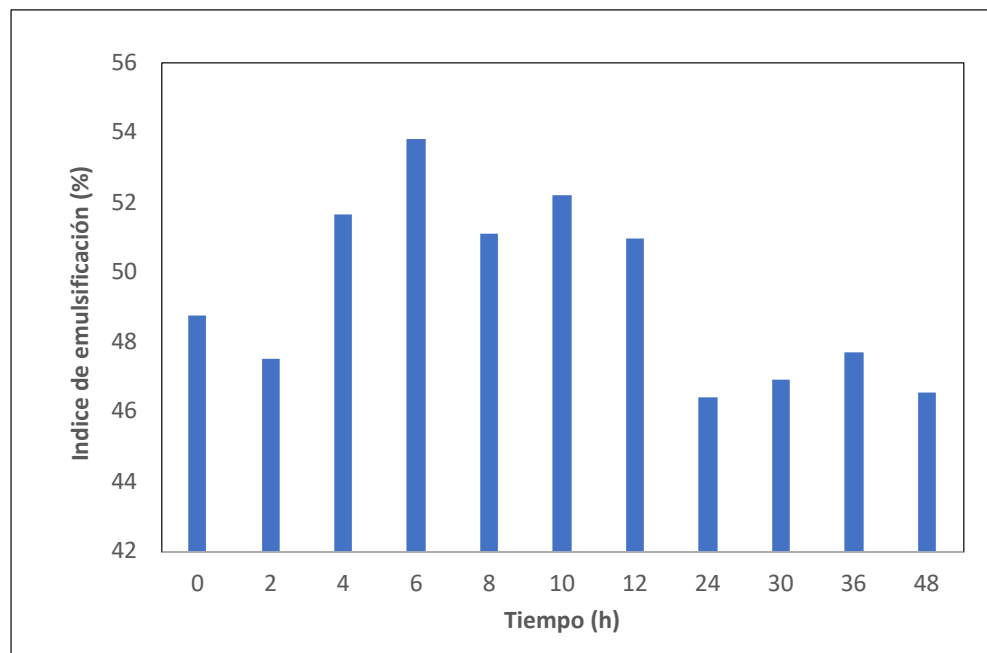
**Figura 13.** Gota colapsada utilizando sobrenadante libre de células de *Pseudomonas aeruginosa*

### Índice de emulsificación (E<sub>24</sub>)

Por último, se procedió a comprobar el índice de emulsificación utilizando aceite vegetal con el sobrenadante.

Los resultados del índice de emulsificación (E<sub>24</sub>) se muestran en la Figura 14. Se obtuvo aproximadamente 52.22% de índice de emulsificación a las 10 horas, posteriormente decrece el porcentaje, por lo que concuerda con los resultados de la producción de ramnolípidos. El índice de emulsificación se realizó por triplicado, se obtuvo el promedio y se reportó como porcentaje, con respecto a las alturas se obtuvo el promedio de las tres alturas para que sea ilustrativo.

En la Figura 15 se observa la altura de la emulsión y la altura total del líquido.



**Figura 14.** Índice de emulsificación de *Pseudomonas aeruginosa*

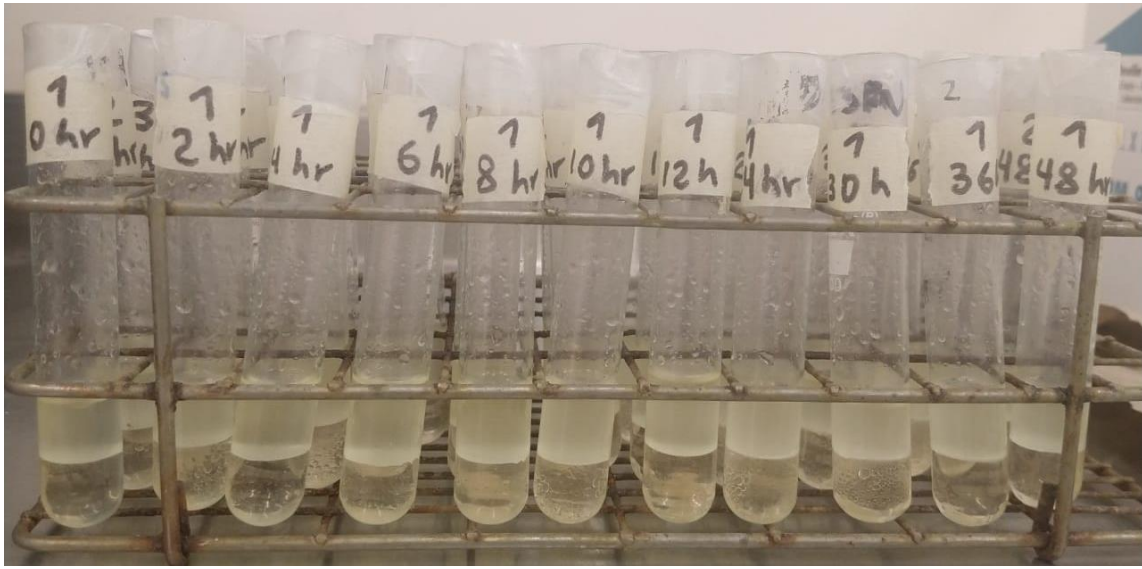


Figura 15. Tubos del Índice de emulsificación

Priya *et al.*, 2009 reportaron que obtuvieron el valor más alto del índice de emulsificación ( $E_{24}$ ) para *Pseudomonas aeruginosa* (PS3) en aceite vegetal, queroseno, petróleo y diésel de 48%, 55%, 58%, 68% respectivamente. Entre los cuatro aceites utilizados el valor de  $E_{24}$  más alto se observó en diésel y PS3 muestra mejor valor de  $E_{24}$  que *Bacillus subtilis* (BS3) (Priya & Usharani, 2009). El valor del índice de emulsificación más alto en este estudio fue de 53.87% a las 6 horas, por otro lado, cuando se obtiene la mayor concentración de biosurfactante (1.0514 g/L) se obtiene 52.22% por lo que concuerda con el estudio de Priya *et al.*, 2009.



## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos se estableció una metodología confiable para la detección y cuantificación de biosurfactantes los cuales pueden tener una potencial utilización en la eliminación de metales pesados de aguas de la industria minera.

*Bacillus megaterium* y *Pseudomonas rhodesiae* no presentaron actividad hemolítica y lipolítica, por otro lado, *Bacillus cereus* presentó actividad hemolítica pero no lipolítica, esto pudo deberse al aceite vegetal empleado en la prueba.

*Pseudomonas aeruginosa* fue el microorganismo que presentó tanto actividad lipolítica como hemolítica, ya que se ha reportado que este microorganismo como productor de biosurfactante, por lo que se seleccionó para la producción de biosurfactantes y las pruebas de detección.

Se obtuvo una concentración máxima de 1.0514 g ramnolípidos/L con una concentración inicial de 37.5 g/L de glicerol como fuente de carbono con resultado positivo para la prueba de detección de dispersión del aceite y resultado negativo para la gota colapsada pero no es una prueba definitiva, por lo que se corrobora la producción de biotensioactivos, por otro lado, se obtuvo un índice de emulsificación ( $E_{24}$ ) de aproximadamente 52.22 % a las 10 horas en donde se obtuvo la mayor concentración obtenida de ramnolípidos.

Se recomienda optimizar las condiciones de cultivo para obtener la mayor producción de biosurfactantes, también realizar los análisis necesarios para verificar si se da una acumulación de ramnolípidos en la célula cuando se agota el sustrato.

También se recomienda cultivar los microorganismos *Pseudomonas rhodesiae*, *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium* en glicerol como fuente de carbono para estimular la producción de biosurfactantes y realizar la prueba de la tensión superficial.

Por último, se recomienda realizar los experimentos de adsorción para obtener el porcentaje de remoción de metales como el cobre y la capacidad de adsorción del biosurfactante.

## CAPÍTULO 6

### BIBLIOGRAFÍA

- Alwaely, W. A. S., Ghadban, A. K., & Alrubayae, I. M. N. (2019). Production and properties of biosurfactant from the local isolation of *Candida* spp. *Drug Invention Today*, 12(5).
- Arcos, M. L., Ossa, F., & Díaz, T. E. (2004). Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 5(1), 60-63.
- Arora, P., Kshirsagar, P. R., Rana, D. P., & Dhakephalkar, P. K. (2019). Hyperthermophilic *Clostridium* sp. N-4 produced a glycoprotein biosurfactant that enhanced recovery of residual oil at 96° C in lab studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 182, 110372.
- Association, A.-A. P. H. (2012). Standard methods for the examination the water and waste water, 22<sup>a</sup>. *APHA, AWWA, WEF, Washington DC*.
- Atsdr, U. (2004). Toxicological profile for copper. *Agency Toxic. Subst. Dis. Regist.*
- Aşçı, Y., Nurbaş, M., & Açikel, Y. S. (2008). A comparative study for the sorption of Cd (II) by soils with different clay contents and mineralogy and the recovery of Cd (II) using rhamnolipid biosurfactant. *Journal of Hazardous Materials*, 154(1-3), 663-673.
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., . . . Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(2), 427-444.
- Becerra Gutiérrez, L. K., & Horna Acevedo, M. V. (2016). Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 23-31.
- Bielawski, J. (1990). Two types of haemolytic activity of detergents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1035(2), 214-217.
- Brandenburg, K., Garidel, P., & Gutschmann, T. (2010). Physicochemical properties of microbial glycopolymers. In *Microbial Glycobiology* (pp. 759-779). Elsevier.
- Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 45(3), 198-207.
- Camacho Moreno, M. (2018). Evaluación de *Bacillus* sp. Como potencial productor de un exopolímero con actividad surfactante.
- Cameotra, S. S., & Makkar, R. S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied microbiology and Biotechnology*, 50(5), 520-529.
- Cartagena-Luna, A., Gayosso-Mexia, A. R., Anducho-Reyes, M. A., López-Villegas, E. O., & Mercado-Flores, Y. (2020). *Hypomyces chrysospermus* ACL-01 isolated

- from *Boletus edulis* and its effect against fungal cereal pathogens. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(3), 1277-1290.
- Chandrasekaran, E. V. (1980). Constituent analysis of glycosaminoglycans. *Methods in Carbohydrate Chemistry, volIII*, 89-96.
- Chu, W. (2003). Remediation of contaminated soils by surfactant-aided soil washing. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, 7(1), 19-24.
- Cooper, D. G., & Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(2), 224-229.
- Câmara, J. M. D. A., Sousa, M. A. S. B., & Barros Neto, E. L. (2020). Modeling of Rhamnolipid Biosurfactant Production: Estimation of Kinetic Parameters by Genetic Algorithm. *Journal of Surfactants and Detergents*, 23(4), 705-714.
- del Carmen Lara-Severino, R., Oliván, L. M. G., Trujillo, Á. H. S., Isaac-Olive, K., & Ramírez-Durán, N. (2017). BÚSQUEDA DE CAPACIDAD PRODUCTORA DE BIOSURFACTANTES EN ACTINOBACTERIAS HALOALCALÓFILAS Y HALOALCALOTOLERANTES. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(3), 529-539.
- Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61(1), 47-64.
- Dodge, J. T., & Mitchell, C. Han~ han, DJ (1963). *Arch. Biochem. Biophys*, 100, 119-130.
- Ercoli, E., Gálvez, J., Di Paola, M., Cantero, J., Videla, S., Medaura, M., & Bauzá, J. (2001). Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo. *Laboratorio de Bioprocesos, reporte especial. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza*.
- Fenibo, E. O., Ijoma, G. N., Selvarajan, R., & Chikere, C. B. (2019). Microbial Surfactants: The Next Generation Multifunctional Biomolecules for Applications in the Petroleum Industry and Its Associated Environmental Remediation. *Microorganisms*, 7(11), 581.
- García, N. M. O., Benites, S. M., & Castillo, H. R. (2017). Efecto de la fuente nitrogenada sobre la producción de rhamnolípidos por *Pseudomonas* sp, empleando petróleo diésel 2 como sustrato. *UCV-SCIENTIA*, 9(1), 67-72.
- Gautam, K. K., & Tyagi, V. K. (2006). Microbial surfactants: a review. *Journal of Oleo Science*, 55(4), 155-166.
- Gibson, B., Wilson, D. J., Feil, E., & Eyre-Walker, A. (2018). The distribution of bacterial doubling times in the wild. *Proceedings of the Royal Society B*, 285(1880), 20180789.
- Giraldo, J. D., Gutiérrez, S., & Merino, F. (2014). Actividad emulsificante y de remoción de metales pesados del rhamnolípidos producido por *Pseudomonas aeruginosa* PB 25. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(1), 35-44.
- Gomathy, M., & Sabarinathan, K. G. (2010). Microbial mechanisms of heavy metal tolerance-A review. *Agricultural Reviews*, 31(2), 133-138.
- Govarathanan, M., Mythili, R., Selvankumar, T., Kamala-Kannan, S., Choi, D., & Chang, Y.-C. (2017). Isolation and characterization of a biosurfactant-producing heavy metal resistant *Rahnella* sp. RM isolated from chromium-contaminated soil. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 22(2), 186-194.
- Griffin, W. C. (1949). Classification of surface-active agents by "HLB". *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1, 311-326.

- Guatemala Hernández, C., & Barrera Cortés, J. (2018). Effect of the carbon source in the production of rhamnolipids by pseudomonas aeruginosa. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 9(21): 1226-1237.
- Guo-Liang, Z., Yue-ting, W. U., Xin-ping, Q., & Qin, M. (2005). Biodegradation of crude oil by Pseudomonas aeruginosa in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University Science B*, 6(8), 725-730.
- Hashim, M. A., Mukhopadhyay, S., Sahu, J. N., & Sengupta, B. (2011). Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater. *Journal of environmental management*, 92(10), 2355-2388.
- Heyd, M., Kohnert, A., Tan, T. H., Nusser, M., Kirschhöfer, F., Brenner-Weiss, G., . . . Berensmeier, S. (2008). Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 391(5), 1579-1590.
- Huang, Z., Pan, X.-D., Wu, P.-G., Han, J.-L., & Chen, Q. (2014). Heavy metals in vegetables and the health risk to population in Zhejiang, China. *Food Control*, 36(1), 248-252.
- Jain, D. K., Collins-Thompson, D. L., Lee, H., & Trevors, J. T. (1991). A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 13(4), 271-279.
- Jarvis, F. G., & Johnson, M. J. (1949). A glyco-lipide produced by Pseudomonas aeruginosa. *Journal of the American Chemical Society*, 71(12), 4124-4126.
- Jette, J.-F., & Ziomek, E. (1994). Determination of lipase activity by a rhodamine-triglyceride-agarose assay. *Analytical biochemistry*, 219(2), 256-260.
- Jimenez Islas, D., Medina Moreno, S. A., & Gracida Rodriguez, J. N. (2010). Biosurfactant properties, applications and production: a review. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 26(1), 65-84.
- Jiménez Islas, D., Medina Moreno, S. A., & Gracida Rodríguez, J. N. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos: una revisión. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 26(1), 65-84.
- Jones, M. N. (1999). Surfactants in membrane solubilisation. *International journal of pharmaceuticals*, 177(2), 137-159.
- Karnwal, A. (2018). Use of Bio-Chemical Surfactant Producing Endophytic Bacteria Isolated from Rice Root for Heavy Metal Bioremediation. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 41(2).
- Kim, J., & Vipulanandan, C. (2006). Removal of lead from contaminated water and clay soil using a biosurfactant. *Journal of Environmental Engineering*, 132(7), 777-786.
- Kitamoto, D., Isoda, H., & Nakahara, T. (2002). Functions and Potential Applications of Glycolipid Biosurfactants. From Energy-Saving Materials to Gene Delivery Carriers. *Journal of bioscience and bioengineering*, 94(3), 187-201.
- Kosaric, N. (1992). Biosurfactants in industry. *Pure and Applied Chemistry*, 64(11), 1731-1737.
- Kouker, G., & Jaeger, K.-E. (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(1), 211-213.
- Kova, M. D. Č., Kiselev, M., Kutuzov, S., & Nsky, F. (1997). Effect of N-lauryl-N, N-dimethylamine N-oxide on dimyristoyl phosphatidylcholine bilayer thickness: A small-angle neutron scattering study. *Gen Physiol Biophys*, 16, 175-188.

- Li, C., Bai, J., Cai, Z., & Ouyang, F. (2002). Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *Journal of Biotechnology*, 93(1), 27-34.
- Li, R. C., Nix, D. E., & Schentag, J. J. (1993). New turbidimetric assay for quantitation of viable bacterial densities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(2), 371-374.
- Liu, C., You, Y., Zhao, R., Sun, D., Zhang, P., Jiang, J., . . . Liu, W. (2017). Biosurfactant production from *Pseudomonas taiwanensis* L1011 and its application in accelerating the chemical and biological decolorization of azo dyes. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 145, 8-15.
- Londoño-Franco, L. F., Londoño-Muñoz, P. T., & Muñoz-García, F. G. (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Bioteconología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145-153.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., & Pier, G. B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and infection*, 2(9), 1051-1060.
- Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (1998). Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 48-52.
- Manaargadoo-Catin, M., Ali-Cherif, A., Pougna, J.-L., & Perrin, C. (2016). Hemolysis by surfactants—a review. *Advances in colloid and interface science*, 228, 1-16.
- Marrero-Coto, J., Díaz-Valdivia, A., & Coto-Pérez, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41(1), 67-78.
- Martorell, J. J. V. (2010). Biodisponibilidad de metales pesados en dos ecosistemas acuáticos de la costa Suratlántica andaluza afectados por Contaminación difusa.
- Martínez, D. C. C. (2007). Estado del arte de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) en sistemas de tratamiento anaerobio de aguas residuales.
- Martínez, G. X. (2011). Producción de biosurfactantes por microorganismos aislados de sitios extremos y contaminados con hidrocarburos. *Instituto Politécnico Nacional*.
- Massara, H., Mulligan, C. N., & Hadjinicolaou, J. (2007). Effect of rhamnolipids on chromium-contaminated kaolinite. *Soil & Sediment Contamination*, 16(1), 1-14.
- Mata-Sandoval, J. C., Karns, J., & Torrents, A. (2001). Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. *Microbiological research*, 155(4), 249-256.
- Miethke, M., & Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71(3), 413-451.
- Mohan, P. K., Nakhla, G., & Yanful, E. K. (2006). Biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic, and anaerobic conditions. *Journal of Environmental Engineering*, 132(2), 279-283.
- Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y., & Imanaka, T. (1993). A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *Journal of bacteriology*, 175(20), 6459-6466.
- Morikawa, M., Hirata, Y., & Imanaka, T. (2000). A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(3), 211-218.

- Moussa, T. A. A., Ahmed, G. M., & Abdel-Hamid, S. M. S. (2006). Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Nocardia amarae*. *J. Appl. Sci. Res*, 2(11), 844-850.
- Mu, J.-H., Li, G.-Z., Zhang, W.-C., & Wang, Z.-W. (2001). Determination of the second CMCs of dodecyl polyoxyethylene polyoxypropylene ether by the methods of cloud point, fluorescence, and viscosity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 194(1-3), 1-6.
- Mulligan, C. N. (2009). Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14(5), 372-378.
- Mulligan, C. N., Cooper, D. G., & Neufeld, R. J. (1984). Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *Journal of fermentation technology*, 62(4), 311-314.
- Mulligan, C. N., & Wang, S. (2006). Remediation of a heavy metal-contaminated soil by a rhamnolipid foam. *Engineering Geology*, 85(1-2), 75-81.
- Mulligan, C. N., Yong, R. N., Gibbs, B. F., James, S., & Bennett, H. P. J. (1999). Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. *Environmental Science & Technology*, 33(21), 3812-3820.
- Myers, D. (2005). *Surfactant science and technology*. John Wiley & Sons.
- Nair, A., Juwarkar, A. A., & Singh, S. K. (2007). Production and characterization of siderophores and its application in arsenic removal from contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 180(1-4), 199-212.
- Nayariseri, A., Singh, P., & Singh, S. K. (2018). Screening, isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus subtilis* strain ANSKLAB03. *Bioinformation*, 14(6), 304.
- Nitschke, M., & Costa, S. (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 252-259.
- Nitschke, M., Costa, S. G., & Contiero, J. (2005). Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnology Progress*, 21(6), 1593-1600.
- Nozaki, Y., Reynolds, J. A., & Tanford, C. (1974). The interaction of a cationic detergent with bovine serum albumin and other proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 249(14), 4452-4459.
- Olteanu, V., Siciua, O., Ciuca, M., Carstea, D. M., Voaides, C., Campeanu, G., & Cornea, C. P. (2011). Production of biosurfactants and antifungal compounds by new strains of *Bacillus* spp. isolated from different sources. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(1 Suppl.), 84-91.
- Ostroff, R. M., Vasil, A. I., & Vasil, M. L. (1990). Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 172(10), 5915-5923.
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International journal of molecular sciences*, 12(1), 633-654.
- Pandey, B., & Fulekar, M. H. (2012). Bioremediation technology: a new horizon for environmental clean-up. *Biology and Medicine*, 4(1), 51.
- Panjiar, N., Sachan, S. G., & Sachan, A. (2015). Screening of bioemulsifier-producing micro-organisms isolated from oil-contaminated sites. *Annals of Microbiology*, 65(2), 753-764.

- Pearl, R., & Reed, L. J. (1920). On the rate of growth of the population of the United States since 1790 and its mathematical representation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 6(6), 275.
- Pedroza-Padilla, C. J., Romero-Tabarez, M., & Orduz, S. (2017). Actividad lipolítica de microorganismos aislados de aguas residuales contaminadas con grasas. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(1), 36-44.
- Perovano Filho, N., Morais, I. L. H., Silva, L. C. F., Silva, C. M., Dias, J. C. T., da Silva, C. C., & de Paula, S. O. (2019). Production of Extracellular Polymeric Substances by Isolate Consortia Obtained from Mesophilic Aerobic Granules from the Treatment of Paper Mill Effluent. *BioResources*, 14(3), 5845-5861.
- Poremba, K., Gunkel, W., Lang, S., & Wagner, F. (1991). Toxicity testing of synthetic and biogenic surfactants on marine microorganisms. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6(2), 157-163.
- Priya, T., & Usharani, G. (2009). Comparative study for biosurfactant production by using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Botany Research International*, 2(4), 284-287.
- Rabbani, M., Bagherinejad, M. R., Sadeghi, H. M., Shariat, Z. S., Etemadifar, Z., Moazen, F., . . . Zaghian, S. (2013). Isolation and characterization of novel thermophilic lipase-secreting bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1113-1119.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M. N. V., & Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in biotechnology*, 28(3), 142-149.
- Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Lagos, M. D., & Jimenez, E. E. G. (2016). Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Ingeniería Investigación y Desarrollo: I2+ D*, 16(2), 66-77.
- Robert, M., Mercade, M. E., Bosch, M. P., Parra, J. L., Espuny, M. J., Manresa, M. A., & Guinea, J. (1989). Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnology Letters*, 11(12), 871-874.
- Rodrigues, L., Teixeira, J., Oliveira, R., & Van Der Mei, H. C. (2006). Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. *Process biochemistry*, 41(1), 1-10.
- Rodríguez Heredia, D. (2017). Intoxicación ocupacional por metales pesados. *MediSan*, 21(12), 3372-3385.
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants: Minireview. *Environmental microbiology*, 3(4), 229-236.
- Rosenberg, E., & Ron, E. Z. (1999). High-and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 52(2), 154-162.
- Sarubbo, L. A., Rocha Jr, R. B., Luna, J. M., Rufino, R. D., Santos, V. A., & Banat, I. M. (2015). Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. *Chemistry and Ecology*, 31(8), 707-723.
- Seeman, P. (1974). Ultrastructure of membrane lesions in immune lysis, osmotic lysis and drug-induced lysis.
- Sekhon Randhawa, K. K., & Rahman, P. K. S. M. (2014). Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in microbiology*, 5, 454.
- Sheet, M. P., & Singer, S. J. (1974). Biological membranes as bilayer couples. A mechanism of dry-erythrocyte interaction. *Proc Natl Acad Sci*, 71, 4457-4461.



- Shuler, M. L. (2002). *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. In K. Fikret (Ed.), (Second ed.): Prentice Hall.
- Singh, P., & Cameotra, S. S. (2004). Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. *Biochemical and biophysical research communications*, 319(2), 291-297.
- Soberón-Chávez, G., Lépine, F., & Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology*, 68(6), 718-725.
- Stancu, M. M. (2015). Response of *Rhodococcus erythropolis* strain IBBPo1 to toxic organic solvents. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4), 1009-1018.
- Syldatk, C., Lang, S., Matulovic, U., & Wagner, F. (1985). Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 40(1-2), 61-67.
- Tugrul, T., & Cansunar, E. (2005). Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(6-7), 851-853.
- Verhulst, P.-F. (1838). Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. *Corresp. Math. Phys.*, 10, 113-126.
- Vullo, D. L. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*, 2(3), 93-104.
- Walter, V., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2010). Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. In *Biosurfactants* (pp. 1-13). Springer.
- Wang, Q., Fang, X., Bai, B., Liang, X., Shuler, P. J., Goddard Iii, W. A., & Tang, Y. (2007). Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnology and bioengineering*, 98(4), 842-853.
- Wang, S., & Mulligan, C. N. (2009). Rhamnolipid biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of arsenic and heavy metals from mine tailings. *Process Biochemistry*, 44(3), 296-301.
- Whang, L.-M., Liu, P.-W. G., Ma, C.-C., & Cheng, S.-S. (2008). Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of hazardous materials*, 151(1), 155-163.
- Yañez-Ocampo, G., & Wong-Villarreal, A. (2013). Biosurfactantes microbianos, producción potencial con residuos agroindustriales de Chiapas. *Bio Tecnología*, 17(3), 12-28.
- Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 56(3), 339-347.

## ANEXOS

## Anexo A:

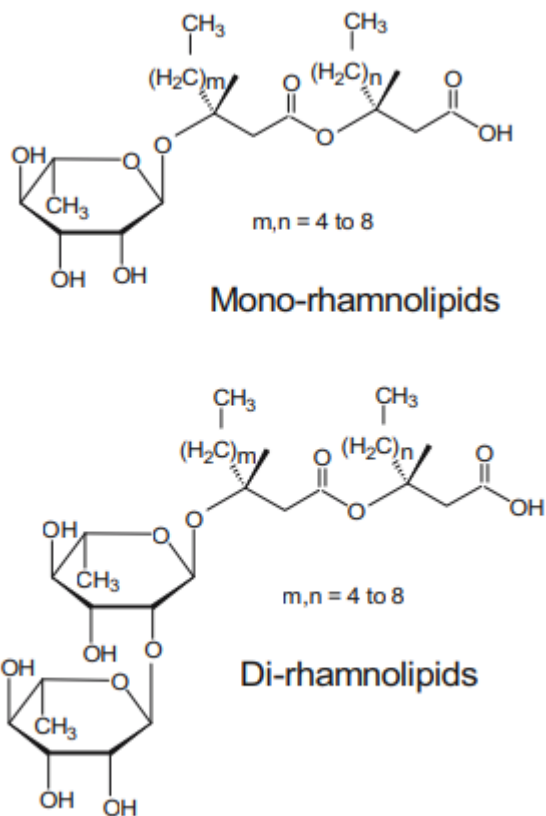


Figura 16. Estructura del ramnolípido (Soberón-Chávez et al., 2005)

## Anexo B:

Tabla 6. Turbidez estándar de McFarland

Número de la turbidez estándar	Cloruro de bario dihidratado (1.175%) (mL)	Ácido sulfúrico (1%) (mL)	Densidad de bacterias aproximada correspondiente (x 10 <sup>8</sup> UFC/ mL)
0	0.0	10.00	0
0.5	0.05	9.95	1
1	0.10	9.90	3
2	0.20	9.80	6
3	0.30	9.70	9
4	0.40	9.60	12
5	0.50	9.50	15
6	0.60	9.40	18
7	0.70	9.30	21
8	0.80	9.20	24
9	0.90	9.10	27
10	1.00	9.00	30

