

Biosurfactantes en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos

Biosurfactants in the bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils

Jesús Ugaz-Hoyos¹, Hilda Vega-Cruz², Sebastian Iglesias-Osores³, Carmen Carreño-Farfan⁴

1. Jesús Ugaz-Hoyos, Biólogo, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Calle Juan XXIII, Lambayeque 14013, Perú. <https://orcid.org/0000-0002-0259-7866>
2. Hilda Vega-Cruz, Biólogo, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Calle Juan XXIII, Lambayeque 14013, Perú. <https://orcid.org/0000-0002-3096-8050>
3. Sebastian Iglesias-Osores, Biólogo, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Calle Juan XXIII, Lambayeque 14013, Perú. <https://orcid.org/0000-0002-4984-4656>
4. Carmen Carreño-Farfan, Doctora en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Calle Juan XXIII, Lambayeque 14013, Perú. <https://orcid.org/0000-0003-0238-2666>.

Autor corresponsal: Sebastian Iglesias-Osores sebasiglo@gmail.com

Contribuciones de los autores: JU, HV y CC fueron responsables de la concepción del estudio. JU y HV recolectó los datos. JU, HV, SI y CC contribuyeron al análisis de los datos. JU, HV y SI escribieron el borrador inicial con todos los autores proporcionando comentarios críticos y ediciones para revisiones posteriores. Todos los autores aprobaron el borrador final del manuscrito. Todos los autores son responsables de todos los aspectos del trabajo para garantizar que las preguntas relacionadas con la precisión o integridad de cualquier parte del trabajo se investiguen y resuelvan adecuadamente.

Declaración de intereses: Todos los demás autores declaran no tener intereses en competencia.

Fuentes de financiamiento: autofinanciado.

RESUMEN

La biorremediación de hidrocarburos de petróleo es favorecida por los biosurfactantes. El objetivo de la investigación fue determinar el rendimiento de surfactantes producidos por *Pseudomonas spp.* degradadoras de hidrocarburos de petróleo. Se colectaron muestras de suelo contaminado y *Pseudomonas spp.* se consideraron degradadoras cuando utilizaron el petróleo como fuente de carbono y energía. Las bacterias productoras de surfactantes se seleccionaron mediante la prueba de dispersión de gota en el medio mínimo salino de Davis con 1% de glicerol como fuente de carbono y con las tres bacterias que alcanzaron el mayor diámetro en el halo de emulsión se determinó el rendimiento. En el suelo con un HTP de 22 900 mg g⁻¹ se obtuvieron 78 aislados de *Pseudomonas spp.*, entre las que el 84,62% utilizó el petróleo como fuente de carbono y energía en 24-96 horas. El 92,42% de estas bacterias produjo biosurfactante evidenciado por los halos de emulsión de petróleo crudo liviano, con diámetros de 10-30 mm. La concentración de surfactantes producidos por *Pseudomonas spp.* fue de 1,0-1,5 gL⁻¹, con rendimiento de 35% (*Pseudomonas sp.* 2HI), 31% (*Pseudomonas sp.* 8JU) y 19% (*Pseudomonas sp.* 4CF). Se demostró la producción de surfactantes por *Pseudomonas spp.* degradadoras petróleo, y su potencial para la remediación de suelos contaminados.

Palabras claves: hidrocarburos de petróleo, surfactantes, *Pseudomonas*, biodegradación

ABSTRACT

Bioremediation of petroleum hydrocarbons is favored by biosurfactants. This research aimed to determine the performance of surfactants produced by *Pseudomonas spp.* degrading petroleum hydrocarbons. samples of contaminated soil and *Pseudomonas spp.* were collected. degradative were considered when they used oil as a source of carbon and energy. Producing bacteria surfactants were selected by testing dispersion drop in the salinity minimum Davis medium with 1% glycerol as carbon source and with the three bacteria reached the largest diameter in the halo emulsion performance was determined. On the floor with an HTP of 22 900 mg g⁻¹ was obtained 78 isolates of *Pseudomonas spp.*, Including 84.62% used the oil as a source of carbon and energy in 24-96 hours. The 92.42% of these bacteria produced biosurfactant evidenced by halos of light crude oil emulsion, with diameters of 10-30 mm. The concentration of surfactants produced by *Pseudomonas spp.* was 1.0-1.5 gL⁻¹, with 35% yield (*Pseudomonas sp.* 2HI), 31% (*Pseudomonas sp.* 8JU) and 19% (*Pseudomonas sp.* 4CF). surfactant production by *Pseudomonas spp.* demonstrated. degradative oil, and its potential for remediation of contaminated soils.

Keywords: petroleum hydrocarbons, surfactant, *Pseudomonas*, biodegradation

INTRODUCCIÓN

El rápido crecimiento de las industrias en los países en desarrollo conduce a la contaminación y otros peligros ambientales[1]. Uno de los riesgos ecológicos prevalentes es la contaminación por petróleo, que muestra efectos nocivos en los suelos[2]. La contaminación ambiental más extendida a nivel mundial se atribuye a los hidrocarburos del petróleo, causada principalmente por derrames en la explotación, accidentes de cargueros, ruptura de tanques de almacenamiento, fugas en tuberías y accidentes de transporte. Los daños ocasionados por los derrames de hidrocarburos en las fuentes hídricas, suelo, aire, fauna y vegetación son difícilmente reversibles, debido a que los procesos de descontaminación no cubren todas las áreas afectadas y en ocasiones se realizan mucho tiempo después que el crudo contaminó el ecosistema[3]. Los hidrocarburos en el suelo afectan las propiedades físicas y químicas como el pH, textura, permeabilidad, capacidad de soporte del crecimiento vegetal y causan impacto paisajístico [4].

Se requieren el uso de técnicas para su eliminación, entre las que se considera la biorremediación con microorganismos capaces de degradar el petróleo y derivados; sin embargo, los contaminantes presentes en la fase líquida no acuosa (NAPL, por sus siglas en inglés) o absorbidos en la matriz del suelo no están disponibles, por lo que la tasa de degradación microbiana es a menudo limitada por problemas de transferencia de masa[5]. Para favorecer la degradación de los hidrocarburos del petróleo y derivados, así como para facilitar su extracción de los yacimientos es importante aumentar su movilización y solubilización en medio acuoso, proponiéndose el uso de surfactantes[6]. Por su composición química pueden ser aniónicos, catiónicos y no iónicos, poseen propiedades emulsificantes y dispersantes y ayudan a disminuir los contaminantes del medio porque permiten la desorción de éstos en suelo y agua; no obstante, la mayoría son tóxicos y resistentes a la biodegradación[7].

Ya se ha informado que algunas poblaciones bacterianas exhibieron resistencia al transporte de petróleo y también pocas poblaciones bacterianas degradan eficientemente los aceites / hidrocarburos. Dos tipos diferentes de interacciones normalmente observadas en los procesos de biodegradación de aceites / hidrocarburos. La adhesión al aceite, la pseudo solubilización y la degradación de los hidrocarburos para formar pequeñas gotas de aceites son los pasos secuenciales involucrados en uno de los mecanismos. Las células microbianas se adhieren a las gotas de hidrocarburos cuyo tamaño era menor que las células y la absorción del sustrato se produjo por transporte activo o por difusión en el punto de interferencia entre las células y los hidrocarburos[8]. Los bioemulsionantes que reducen la tensión superficial se denominan biosurfactantes. Los biosurfactantes pueden ubicarse dentro de las células (intracelular) o secretarse fuera de las células (extracelular)[9].

Los agentes tensioactivos microbianos (biosurfactantes) son productos biotecnológicos importantes, con una amplia gama de aplicaciones en muchas industrias. Sus propiedades de interés son: en el cambio de fenómenos de superficie activa, como la disminución de las tensiones superficiales e interfaciales, acciones de humectación y penetración, propagación, acciones de hidrofiliidad e hidrofobicidad, crecimiento microbiano mejora, secuestro de metal y acción antimicrobiana[10]. Los surfactantes, sintetizados por las bacterias presentan bajos valores de concentración micelar crítica (CMC), gran actividad superficial, con adsorción gradual y actividad continuada, por lo que su eficacia se equipara y en algunos casos supera a los surfactantes químicos[11]. Además, son biocompatibles, de baja toxicidad y biodegradables; sin embargo, la producción es un proceso que no compite económicamente, por lo que se requiere aislar bacterias con un elevado rendimiento para disminuir los costos[12]. Una eficiente

estrategia es el aislamiento y caracterización de estas bacterias en lugares contaminados. Las especies de *Pseudomonas* son ubicuas, con versatilidad nutricional, simplicidad en las condiciones de cultivo y producen surfactantes reconocidos industrialmente; no obstante, en la región Lambayeque no existe disponibilidad de estos microorganismos que puedan ser utilizados para mejorar la biorremediación de ambientes impactados con petróleo o para la producción de biosurfactantes a gran escala y bajo costo. Hay muchos informes disponibles sobre biosurfactantes bacterianos, pero el espectro de actividad depende de su composición química. Se informó que una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* producía el biosurfactante de tipo ramnolípido que era mono y di-ramnolípido[13].

Los lugares contaminados con petróleo como el lote IV de la empresa Interoil Perú S.A. en Talara, tienen una diversidad biológica que no ha sido investigada, para la búsqueda de *Pseudomonas spp.* degradadoras de petróleo productoras de surfactantes[14], [15], se presenta una importante oportunidad para obtener estas bacterias, que posteriormente puedan formar parte de un paquete tecnológico propio, permitiendo la disminución de la dependencia técnica-económica del país y el desarrollo de las capacidades de la población peruana. El objetivo de la investigación fue determinar el rendimiento de surfactantes producidos por *Pseudomonas spp.* degradadoras de hidrocarburos de petróleo.

MÉTODOS

Se estuvo suelo contaminado con petróleo en el lote IV de la Empresa Interoil Perú S.A. en la provincia de Talara, región Piura y se investigaron 54 muestras, colectadas en agosto de 2014. El número de muestras fue calculado, tomando en cuenta un estudio piloto realizado por los investigadores, en el que se determinó una prevalencia de 90%. La investigación descriptiva se ejecutó en dos fases. En la primera fase se determinaron las características del suelo contaminado, se aislaron e identificaron *Pseudomonas spp.* y se caracterizaron las *Pseudomonas spp.* degradadoras de petróleo. En la segunda fase se determinó el rendimiento de surfactantes producidos por *Pseudomonas spp.* degradadoras de hidrocarburos de petróleo.

Para el aislamiento de bacterias degradadoras de petróleo se tomaron muestras de 1 Kg de suelo contaminado en la provincia de Talara, Piura, las cuales se depositaron en bolsas de plástico debidamente etiquetadas e inmediatamente se transportaron en un envase térmico ($10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), para su procesamiento en el laboratorio de Microbiología y Parasitología, de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, en Lambayeque. En el análisis químico se determinó la concentración, de hidrocarburos totales (HTP) en el laboratorio de la empresa Quimpetrol Perú, EIRL, en Piura, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). En el análisis microbiológico se determinó el número de microorganismos totales y degradadores de hidrocarburos o hidrocarbonoclasticos mediante la técnica del número más probable.

La toxicidad de los contaminantes de las muestras de suelo investigado se determinó en semillas de rabanito, considerándose la fitotoxicidad (IG): $\text{IG} \geq 80\%$ indica que no hay sustancias fitotóxicas o están en muy baja concentración, $80\% > \text{IG} > 50\%$ se interpreta como presencia moderada de estas sustancias y un $\text{IG} \leq 50\%$ indica una fuerte presencia de sustancias fitotóxicas, criterios correspondientes a niveles de fitotoxicidad bajo, moderado y severo, respectivamente. Las bacterias del género *Pseudomonas* se identificaron con las bacterias heterótrofas cultivables aisladas en agar nutritivo y Mac Conkey, considerándose degradadoras aquellas que utilizaron el petróleo como fuente de carbono y energía en caldo Bushnell Haas con púrpura de bromocresol.

La selección de bacterias productoras de surfactantes se realizó mediante la prueba de dispersión de gota. Los cultivos de *Pseudomonas spp.* degradadoras de hidrocarburos de petróleo se sembraron por triplicado en 1 mL de medio mínimo salino de Davis con 1 % v/v de glicerol. La incubación se realizó a $30^{\circ}\text{C} \pm 2$, durante 24 horas, con agitación manual (5') cada 4 horas, obteniéndose el inóculo bacteriano. Éste fue inoculado por triplicado en 5 mL del mismo medio, incubándolos a 30°C , durante 72 horas, con agitación manual (5') cada 12 horas. Los medios cultivados se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos y los sobrenadantes se utilizaron para la prueba de dispersión de gota, observándose un halo de emulsión sobre una capa de hidrocarburo a los 0, 5 y 30 minutos.

Las 25 bacterias con los mayores halos se seleccionaron para la determinación de rendimiento. Se cultivaron en matraces de 1 L con 300 mL del medio mínimo salino de Davis con 1% v/v de glicerol como fuente de carbono, incubándose durante 4 días a $30^{\circ}\text{C} \pm 2$, con agitación constante manual (5') cada 12 horas. Diariamente, se realizó la prueba de gota y se cuantificó la biomasa, el surfactante y se calculó el coeficiente de rendimiento Y_p/x .

Para cuantificar la biomasa por turbidimetría a 600 nm (DO600), inicialmente se obtuvo la curva patrón entre densidad óptica y biomasa seca. La concentración de biomasa de cada bacteria fue determinada por turbidimetría, registrándose la densidad óptica de los cultivos bacterianos a 600 nm. Los valores de biomasa (x) se calcularon en la curva patrón entre densidad óptica y biomasa seca, previamente obtenida.

Para la recuperación del surfactante producido, el cultivo bacteriano de 4 días se centrifugó a 3500 rpm, durante 20 minutos. El extracto crudo libre de células se acidificó hasta alcanzar un pH 2, mediante la adición de HCl 1N. El biosurfactante se recuperó en una pera de decantación, en la cual se vertieron inicialmente 100 mL del sobrenadante, añadiéndose inmediatamente 150 mL de acetato de etilo. Se realizaron tres extracciones sucesivas con intervalos de 1 hora. En cada extracción se recuperó el sobrenadante o acetato de etilo conteniendo el biosurfactante que fue depositado en un vaso de precipitación, luego evaporado a 40°C , hasta alcanzar peso constante y finalmente pesado.

Con los tres cultivos de *Pseudomonas spp.* que alcanzaron los mayores valores en el diámetro del halo de emulsión, se calculó el $Y (p/x)$ y se investigó la actividad detergente y emulsificante de los biosurfactantes. El $Y (p/x)$ o coeficiente de rendimiento del producto en relación con la biomasa o cantidad del producto obtenido por cantidad de biomasa formada (gg^{-1}), se calculó dividiendo los gramos de biosurfactante entre los gramos de biomasa.

La actividad detergente del biosurfactante obtenido o capacidad para remover petróleo crudo liviano adherido a las placas de vidrio se determinó en tubos con tapa rosca, en los que se depositaron 10 mL de una solución 10% del biosurfactante en bicarbonato de sodio 0,1 M y se agregaron 10 mL de petróleo crudo liviano, teniendo como testigo un tubo con 10 mL de bicarbonato de sodio 0,1 M sin biosurfactante y 10 mL de petróleo crudo liviano. Los tubos se agitaron manualmente por 5 minutos para homogenizar el contenido. Transcurrida 1 hora de reposo, el contenido de los tubos se vertió rápidamente a placas de Petri y después de 5 minutos se observó la superficie de las paredes para calificar la actividad detergente según el petróleo remanente adherido a las paredes. Con base a una escala convencional elaborada por los autores, se determinó: (+): Mínima cantidad de petróleo adherido a las paredes o marcada actividad, (++) : Regular cantidad de petróleo o mediana cantidad y (+++) : Abundante cantidad de petróleo o mínima actividad detergente.

La actividad emulsificante del biosurfactante se determinó en tubos con tapa rosca en los que se depositaron 10 mL de una solución 10% (p/v) del biosurfactante en agua destilada y se agregaron 0,2 mL de petróleo crudo liviano. Los tubos se agitaron manualmente durante 5 minutos para favorecer la emulsión y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 540 nm. Los valores de absorbancia fueron convertidos a Unidades de Actividad Emulsificante por mL (UAE mL⁻¹), considerando 0,816 de absorbancia igual a una Unidad de Actividad Emulsificante por mL.

Los valores obtenidos en el tiempo para la utilización del petróleo como fuente de carbono y energía, diámetro del halo de emulsión, concentración de biomasa y biosurfactante fueron ordenados en tablas y figuras que permitieron analizar el rendimiento de surfactantes producidos por *Pseudomonas spp.* degradadoras de petróleo. Se utilizaron los programas Excel versión 2013 e InfoStat.

RESULTADOS

Las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo crudo liviano del lote IV presentaron un contenido de hidrocarburos totales, HTP de 22 900 mg kg⁻¹. El número más probable de microorganismos totales fue de $1,1 \times 10^7$ NMP g⁻¹, población que superó a la hidrocarbonoclástica de $1,5 \times 10^4$ NMP g⁻¹. En cuanto al nivel de toxicidad, fue severo en el índice de germinación de rabanito.

En todas las muestras de suelo contaminado se aislaron bacterias heterótrofas cultivables, obteniéndose 113 aislados con agar nutritivo y 135 con agar Mac Conkey, con un total de 248 aislados bacterianos. El género *Pseudomonas* se identificó en el 15,93% de bacterias identificadas con agar nutritivo y 44,44% de aislados en agar Mac Conkey, obteniéndose 78 aislados de *Pseudomonas spp.*

El 55,56% de *Pseudomonas spp.* aisladas en agar nutritivo y 93,33% aisladas en agar Mac Conkey utilizaron petróleo crudo liviano como fuente de carbono y energía, durante 24 - 96 horas, considerándose degradadoras de hidrocarburos de petróleo el 84,62% de aislados.

En el medio mínimo de Davis con glicerol como fuente de carbono, el 92,42% de cultivos de *Pseudomonas spp.* degradadores de petróleo desarrollaron durante 72 horas con producción de surfactante, evidenciado en la prueba de dispersión de gota, en la que se observaron halos de emulsión del petróleo crudo liviano cuyos diámetros fueron de 1,0- 22,0 mm (Figura 1), después de 5 minutos. Con los 25 cultivos de *Pseudomonas spp.* que alcanzaron los mayores halos, se repitió la prueba de dispersión de gota, observándose halos de 10,0 - 16,0 mm al inicio y 12,0 - 30,0 mm después de 30 minutos.

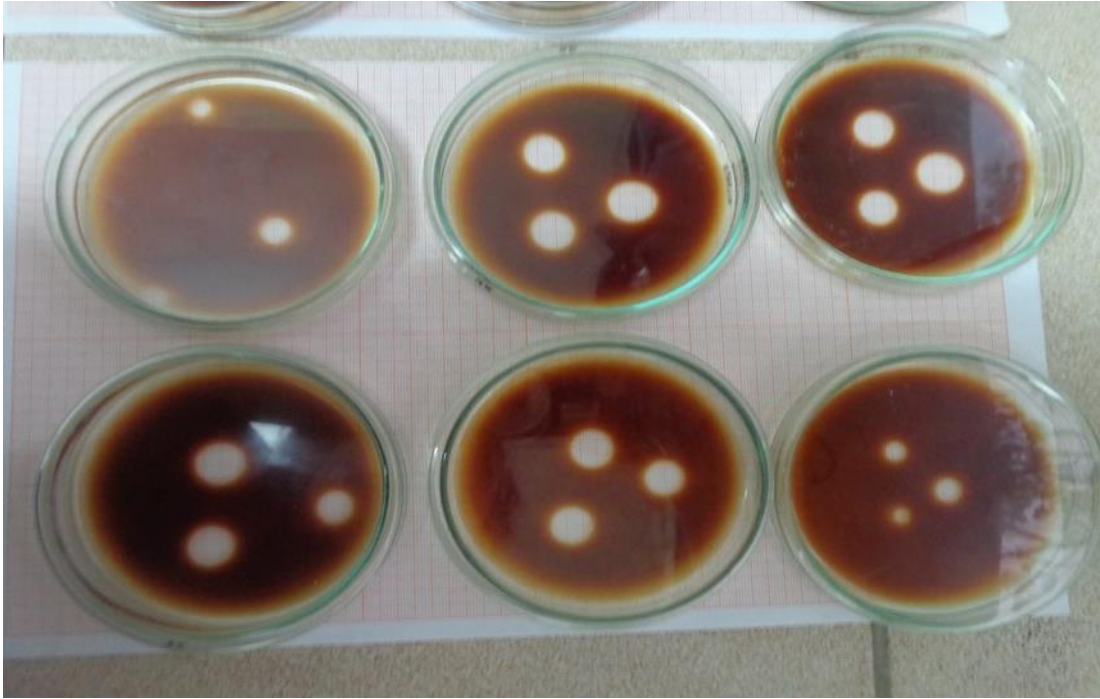


Figura 1. Halos de emulsión de petróleo crudo liviano por efecto de medio mínimo salino cultivado con *Pseudomonas* spp. productoras de surfactantes.

La absorbancia del medio mínimo salino de Davis cultivado con *Pseudomonas* spp. productoras de surfactantes osciló entre 0,226 a las 24 horas y 0,916 a las 120 horas, valores correspondientes a concentraciones de biomasa de 1,414 y 5,704 gL⁻¹, respectivamente. La concentración máxima de biomasa (Tabla 1) se alcanzó a las 48 horas (*Pseudomonas* sp. 36Z), 72 horas (*Pseudomonas* sp. 17R, 4CF, 5Y, 10K, 1A, 4M, 8H, 15L), 96 horas (*Pseudomonas* sp. 91B) y 120 horas (*Pseudomonas* sp. 55B, 2HI, 16Q, 18S, 19T, 20U, 21V, 7D, 6I, 8F, 8X, 4J, 8JU, 2B, 11K, 19C, 9R, 24A).

Tabla 1. concentración (g/L) de biomasa de *Pseudomonas spp.* productoras de surfactantes en medio mínimo salino de Davis.

<i>Pseudomonas spp.</i> UNPRG	Biomasa*(g/L ⁻¹)/horas				
	24	48	72	96	120
55B	1,507	2,067	2,710	3,687	4,042
2HI	2,559	2,839	3,792	4,035	4,328
17R	1,582	2,852	5,025	4,928	4,253
91B	1,663	2,628	4,459	4,496	4,323
7D	1,613	2,603	2,522	3,195	3,824
19T	1,968	3,624	3,587	4,322	5,162
11K	1,719	2,4227	3,674	3,736	4,154
36Z	2,012	5,611	4,390	4,147	3,961
8JU	1,663	2,896	3,961	4,272	4,839
4CF	2,005	3,992	5,393	5,094	5,063
5Y	1,707	2,416	3,238	3,083	3,139
10K	1,819	3,587	3,936	3,929	3,905
20U	1,414	1,987	2,254	3,207	4,029
8F	2,136	2,952	3,786	4,129	4,129
1A	2,585	2,416	3,842	3,375	3,251
6I	1,856	2,491	3,543	3,562	4,814
18S	1,875	2,485	3,126	3,487	3,873
4J	1,931	2,734	3,967	3,786	3,929
21V	1,426	1,825	2,715	3,512	4,141
8H	2,024	2,647	4,888	4,359	4,048
15L	1,968	2,784	3,543	3,325	3,481
8X	1,482	2,124	2,509	2,541	3,587
4M	1,538	2,342	2,759	4,054	5,281
16Q	1,931	2,186	2,946	4,465	5,704
2B	1,476	2,541	3,232	4,758	5,586

*Promedio de tres repeticiones

Con todas las bacterias de *Pseudomonas spp.* se verificó la producción de surfactante desde las 24 horas, evidenciado por el halo de emulsión de petróleo crudo liviano (Tabla 2), con rangos de valores de 1-13 mm (24 horas), 10-18 mm (48 horas), 9-25 mm (72 horas), 11-28 mm (96 horas) y 12-30 mm (120 horas). En este contexto, los mayores valores en el diámetro del halo de emulsión para todas las *Pseudomonas spp.* se alcanzaron a las 120 horas y en el 40% de bacterias investigadas, no correspondieron a la concentración máxima de biomasa.

Tabla 2. Diámetro del halo de emulsión de petróleo liviano por efecto de medio mínimo salino cultivado con *Pseudomonas spp.* productoras de surfactantes

<i>Pseudomonas</i> spp. UNPRG	*Diámetro de halo(mm)/horas				
	24	48	72	96	120
55B	13,0	15,0	15,0	18,0	20,0
2HI	13,0	16,0	20,0	25,0	30,0
17R	9,0	10,0	13,0	16,0	23,0
91B	13,0	14,0	13,0	15,0	18,0
7D	9,0	13,0	13,0	15,0	15,0
19T	9,0	12,0	12,0	13,0	17,0
11K	9,0	13,0	14,0	15,0	20,0
36Z	9,0	12,0	13,0	16,0	18,0
8JU	14,0	18,0	25,0	28,0	28,0
4CF	15,0	16,0	23,0	28,0	29,0
5Y	9,0	12,0	13,0	20,0	24,0
10K	1,0	13,0	14,0	22,0	23,0
20U	9,0	12,0	10,0	17,0	20,0
8F	7,0	10,0	12,0	13,0	14,0
1A	10,0	10,0	13,0	17,0	18,0
6I	14,0	14,0	13,0	14,0	22,0
18S	10,0	8,0	13,0	17,0	20,0
4J	9,0	13,0	18,0	14,0	19,0
21V	9,0	10,0	14,0	13,0	14,0
8H	12,0	14,0	12,0	18,0	20,0
15L	10,0	12,0	18,0	16,0	18,0
8X	10,0	9,0	9,0	12,0	18,0
4M	15,0	13,0	16,0	15,0	16,0
16Q	13,0	12,0	14,0	12,0	13,0
2B	12,0	11,0	12,0	11,0	12,0

*Promedio de tres repeticiones

Los mayores valores en el halo del diámetro del halo de emulsión correspondieron a *Pseudomonas spp.* 2 HI (30 mm), 4CF (29 mm) y 8JU (28 mm), con biomásas máximas de 4,328 gL-1 (120 horas), 5,393 gL-1 (72 horas) y 4,839 gL-1 (120 horas), respectivamente. Estas bacterias

seleccionadas alcanzaron 1,0-1,5 gL⁻¹ de surfactante (Tabla 3), con rendimientos de 35% (*Pseudomonas sp.* 2HI), 31% (*Pseudomonas sp.* 8JU) y 19% (*Pseudomonas sp.* 4CF).

La actividad detergente de los biosurfactantes obtenidos o capacidad para facilitar la remoción del crudo de petróleo, se determinó visualmente al observar las paredes de los tubos de ensayo con una mínima (*Pseudomonas spp.* 8JU y 2HI) y regular cantidad de petróleo remanente (*Pseudomonas spp.* 4CF), comparado con los tubos del control que presentaron abundante petróleo adherido a las paredes. La actividad emulgente de los surfactantes obtenidos se determinó mediante espectrofotometría, alcanzando 2,364 UAE mL⁻¹; 2,337 UAE mL⁻¹ y 1,304 UAE mL⁻¹ con *Pseudomonas spp.* 8JU, 2HI y 4CF respectivamente.

Tabla 3. Rendimiento Y (p/x) de surfactantes producidos por *Pseudomonas spp.* degradadoras de hidrocarburos de petróleo

<i>Pseudomonas</i> spp. UNPRG	x Biomasa (gL ⁻¹)	p Surfactante (gL ⁻¹)	Y (p/x) Rendimiento	
			gg ⁻¹	%
2HI	4,328	1,50	0,35	35
8JU	4,839	1,50	0,31	31
4CF	5,393	1,00	0,19	19

DISCUSIÓN

Debido al gran daño causado por la contaminación del suelo, existe un creciente interés en aplicar surfactantes para la remediación de una variedad de suelos contaminados en todo el mundo [12]. La contaminación por hidrocarburos es un problema ambiental de creciente importancia. Los microorganismos que degradan los hidrocarburos, adaptados para crecer y prosperar en ambientes que contienen petróleo, tienen un papel importante en el tratamiento biológico de esta contaminación[16].

Las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo presentaron un contenido de hidrocarburos de petróleo, HTP de 22 900 mg kg⁻¹, una población microbiana y toxicidad de los contaminantes en el índice de germinación de rabanito, condiciones que comprobaron la presencia del contaminante y por tanto la idoneidad para el aislamiento de bacterias del género *Pseudomonas*, capaces de metabolizar los hidrocarburos de petróleo[6]. En las muestras de suelo contaminado se aislaron bacterias heterótrofas, que utilizan sustratos orgánicos como fuente de carbono y energía, coincidiendo con Deyab [7]. El género *Pseudomonas* se identificó en las bacterias heterótrofas aisladas, por cuanto estas bacterias son ubicuas y son comúnmente aisladas de suelo [6], agua y sedimentos marinos[17].

El 84,62 % de los cultivos de *Pseudomonas spp.* se consideraron degradadores de hidrocarburos de petróleo porque utilizaron el contaminante como fuente de carbono y energía[18]. Estos microorganismos oxidan las fracciones del petróleo, generando ácidos grasos que finalmente son degradados hasta dióxido de carbono y agua [17]. El tiempo mínimo requerido por las bacterias para la utilización del petróleo fue 24 horas, coincidiendo con Calva et al. (2010), quienes determinaron que en el periodo de 24 - 72 horas *P. aeruginosa* degradó los hidrocarburos más sencillos, n alcanos de cadenas cortas y posteriormente a las 96 – 480 horas

las fracciones más pesadas como isoprenoides, alcanos de cadenas de más de 20 carbonos, cicloalcanos y aromáticos.

Las bacterias degradadoras de petróleo se utilizan en la biorremediación de ambientes contaminados[10], no obstante, la degradación microbiana es a menudo limitada por problemas de transferencia de masa[20]. En este contexto, se investigó la producción de surfactantes, que incrementan la biodisponibilidad de los hidrocarburos mediante la acción paralela de la desorción y solubilización del contaminante. El 92,42% de cultivos de *Pseudomonas spp.* degradadoras de hidrocarburos de petróleo se reconocieron como productoras de surfactantes, una amplia gama de microorganismos incluyendo bacterias, levaduras y hongos filamentosos son capaces de sintetizar biotensoactivos; no obstante, las bacterias son las principales productoras, destacando especies de *Pseudomonas* como *P. putida* [21], *P. fluorescens* [22], *P. aeruginosa* [23] y *P. alcaligenes*[24].

Los cultivos de las bacterias investigadas en medio líquido por 72 horas se utilizaron para seleccionar aquellos productores de surfactantes, mediante la prueba de dispersión de gota en la que se observa un halo de emulsión formado sobre una capa de hidrocarburo de petróleo. En la búsqueda de nuevos biosurfactantes se requiere encontrar productos con algunas de las siguientes propiedades: alta capacidad emulsionante, elevada actividad superficial e interfacial, baja CMC, buena solubilidad y actividad en un amplio rango de pH. La capacidad emulsionante permite estabilizar o desestabilizar emulsiones aceite con agua y agua con aceite[25]. En la selección de bacterias productoras de surfactantes, el diámetro de los halos de dispersión de gota osciló entre 10 – 30 mm, rango similar a 7-35 mm, reportado por Mondragón (2011) para bacterias cultivadas durante 48 horas. El halo de emulsión está directamente relacionado con la actividad de biosurfactante producido. La biomasa bacteriana fue cuantificada por turbidimetría, se alcanzó una concentración máxima de 5,704 gL⁻¹, valor que se encuentra en el rango de biomasa de 3 -11 gL⁻¹, reportado por Rosero et al. (2002) para *P. aeruginosa* cultivada con parafina como fuente de carbono.

La producción de surfactantes se verificó en los cultivos bacterianos seleccionados de 24–20 horas de incubación, Santa Anna et al. (2002) concluyeron que la producción de surfactantes ramnolípidos por especies de *Pseudomonas* es típica de un metabolismo secundario y se incrementa considerablemente en la fase estacionaria[27].

La producción del biosurfactante en la fase estacionaria explica que los valores mayores en el diámetro del halo de emulsión de petróleo crudo se registraron en todos los caldos cultivados con las bacterias a las 120 horas; no obstante, las concentraciones máximas de biomasa se alcanzaron en el 40% de las bacterias, a las 42,72 y 96 horas.

Para la obtención del biosurfactante los cultivos bacterianos fueron centrifugados, porque el metabolito es extracelular y luego se recuperó mediante extracción con acetato de etilo, así como también se puede utilizar otro solvente orgánico. Se obtuvo 1,0 – 1,5 gL⁻¹ de surfactante, superando 0,190 gL⁻¹. Diferenciándose de los resultados obtenidos, Rosero et al. (2002) reportaron 6,5 – 15 gL⁻¹ de ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* a nivel de planta piloto, calculando un rendimiento de biomasa en producto de 1,36 gramos de ramnolípidos por cada gramo de biomasa; sin embargo, bajo condiciones de laboratorio el rendimiento fue de 0,45 gg⁻¹. En este contexto, las bacterias investigadas en la presente investigación: *Pseudomonas sp.* 2H1 y 8JU con 0,35 y 0,31 gg⁻¹ son consideradas promisorias para la producción de surfactantes, por cuanto con la optimización del medio de cultivo y condiciones de fermentación será posible incrementar el rendimiento inicial[28]. Se concluye con que *Pseudomonas spp.* degradadoras de

hidrocarburos de petróleo sintetizaron biosurfactantes, destacando *Pseudomonas* sp. 2HI con un Yp/x de 35% y *Pseudomonas* sp. 8JU con un Yp/x de 31, rendimientos que evidencian su potencial para la biorremediación de suelo contaminado.

REFERENCIAS

- [1] H. Hettige, M. Mani, y D. Wheeler, «Industrial pollution in economic development: The environmental Kuznets curve revisited», *J. Dev. Econ.*, vol. 62, n.º 2, pp. 445-476, ago. 2000, doi: 10.1016/S0304-3878(00)00092-4.
- [2] J. Tang, M. Wang, F. Wang, Q. Sun, y Q. Zhou, «Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated soil», *J. Environ. Sci.*, vol. 23, n.º 5, pp. 845-851, may 2011, doi: 10.1016/S1001-0742(10)60517-7.
- [3] P. Arellano, K. Tansey, H. Balzter, y M. Tellkamp, «Plant family-specific impacts of petroleum pollution on biodiversity and leaf chlorophyll content in the Amazon rainforest of Ecuador», *PLoS One*, vol. 12, n.º 1, ene. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0169867.
- [4] M. F. Ortega, «Modelización de un proceso de biorremediación de suelos contaminados con gasoil», *Esc. técnica Super. Ing. minas*, pp. 1-124, 2012.
- [5] H. W. Meinardus *et al.*, «Performance assessment of NAPL remediation in heterogeneous alluvium», *J. Contam. Hydrol.*, vol. 54, n.º 3-4, pp. 173-193, feb. 2002, doi: 10.1016/S0169-7722(01)00161-9.
- [6] T. M. S. Lima, L. C. Procópio, F. D. Brandão, B. A. Leão, M. R. Tótola, y A. C. Borges, «Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms», *Bioresour. Technol.*, vol. 102, n.º 3, pp. 2957-2964, feb. 2011, doi: 10.1016/j.biortech.2010.09.109.
- [7] M. A. Deyab, «Effect of cationic surfactant and inorganic anions on the electrochemical behavior of carbon steel in formation water», *Corros. Sci.*, vol. 49, n.º 5, pp. 2315-2328, may 2007, doi: 10.1016/j.corsci.2006.10.035.
- [8] E. Paleček, J. Tkáč, M. Bartošík, T. Bertók, V. Ostatná, y J. Paleček, «Electrochemistry of nonconjugated proteins and glycoproteins. Toward sensors for biomedicine and glycomics», *Chemical Reviews*, vol. 115, n.º 5. American Chemical Society, pp. 2045-2108, 11-mar-2015, doi: 10.1021/cr500279h.
- [9] E. Antoniou, S. Fodelianakis, E. Korkakaki, y N. Kalogerakis, «Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strains using crude oil as carbon source», *Front. Microbiol.*, vol. 6, n.º APR, p. 274, 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.00274.
- [10] N. Kosaric, «Biosurfactants and Their Application for Soil Bioremediation», *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 39, n.º 4, pp. 295-304, 2001.
- [11] K. Michocka, K. Staszak, D. Gwiazdowska, y D. Wiczorek, «Synthesis, surface and antimicrobial activity of new lactose-based surfactants», *Molecules*, vol. 24, n.º 21, nov. 2019, doi: 10.3390/molecules24214010.
- [12] X. Mao, R. Jiang, W. Xiao, y J. Yu, «Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review», *Journal of Hazardous Materials*, vol. 285. Elsevier, pp. 419-435, 01-mar-2015, doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.12.009.
- [13] J. Patel, S. Borgohain, M. Kumar, V. Rangarajan, P. Somasundaran, y R. Sen, «Recent

developments in microbial enhanced oil recovery», *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 52. Elsevier Ltd, pp. 1539-1558, 01-dic-2015, doi: 10.1016/j.rser.2015.07.135.

- [14] L. Guerra-Santos, O. Kappeli, y A. Fiechter, «Pseudomonas aeruginosa biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 48, n.º 2, pp. 301-305, ago. 1984, doi: 10.1128/aem.48.2.301-305.1984.
- [15] E. Deziel, G. Paquette, R. Villemur, F. Lepine, y J. Bisaillon, «Biosurfactant production by a soil pseudomonas strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons.», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 62, n.º 6, pp. 1908-12, jun. 1996.
- [16] E. Z. Ron y E. Rosenberg, «Biosurfactants and oil bioremediation», *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 13, n.º 3. Elsevier Ltd, pp. 249-252, 01-jun-2002, doi: 10.1016/S0958-1669(02)00316-6.
- [17] H. Yin *et al.*, «Characteristics of biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa S6 isolated from oil-containing wastewater», *Process Biochem.*, vol. 44, n.º 3, pp. 302-308, mar. 2009, doi: 10.1016/j.procbio.2008.11.003.
- [18] W. Guo, C. Song, M. Kong, W. Geng, Y. Wang, y S. Wang, «Simultaneous production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates and alginate oligosaccharides by Pseudomonas mendocina NK-01», *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 92, n.º 4, pp. 791-801, nov. 2011, doi: 10.1007/s00253-011-3333-0.
- [19] G. Calva-Calva, O. Reza, J. Perez Vargas, I. L. Membrillo Venegas, C. Solís, y J. Araujo, «Producción de biosurfactantes por bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno crecidas en hidrocarburos», *Rev. CENIC. Ciencias Químicas*, vol. 41, pp. 1-9, 2010.
- [20] G. L. Ghurye, C. Vipulanandan, y R. C. Willson, «A practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures», *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 44, n.º 5, pp. 661-666, ago. 1994, doi: 10.1002/bit.260440514.
- [21] M. Cha, N. Lee, M. Kim, M. Kim, y S. Lee, «Heterologous production of Pseudomonas aeruginosa EMS1 biosurfactant in Pseudomonas putida», *Bioresour. Technol.*, vol. 99, n.º 7, pp. 2192-2199, may 2008, doi: 10.1016/j.biortech.2007.05.035.
- [22] M. Abouseoud, R. Maachi, A. Amrane, S. Boudergua, y A. Nabi, «Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by Pseudomonas fluorescens», *Desalination*, vol. 223, n.º 1-3, pp. 143-151, mar. 2008, doi: 10.1016/j.desal.2007.01.198.
- [23] H. S. El-Sheshtawy y M. M. Doheim, «Selection of Pseudomonas aeruginosa for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity», *Egypt. J. Pet.*, vol. 23, n.º 1, pp. 1-6, mar. 2014, doi: 10.1016/j.ejpe.2014.02.001.
- [24] F. J. S. Oliveira, L. Vazquez, N. P. de Campos, y F. P. de França, «Production of rhamnolipids by a Pseudomonas alcaligenes strain», *Process Biochem.*, vol. 44, n.º 4, pp. 383-389, abr. 2009, doi: 10.1016/j.procbio.2008.11.014.
- [25] R. Zolfaghari, A. Fakhru'l-Razi, L. C. Abdullah, S. S. E. H. Elnashaie, y A. Pendashteh, «Demulsification techniques of water-in-oil and oil-in-water emulsions in petroleum industry», *Separation and Purification Technology*, vol. 170. Elsevier B.V., pp. 377-407, 01-oct-2016, doi: 10.1016/j.seppur.2016.06.026.
- [26] N. G. Rosero, F. Dugarte, A. L. Pimienta, M. P. Díaz, y F. G. Carvajal, «Producción de un tensoactivo biológico», *Rev. Colomb. Biotechnol.*, vol. 4, n.º 1, pp. 22-28, 2002.

- [27] L. M. Santa Anna *et al.*, «Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments», *Brazilian J. Chem. Eng.*, vol. 19, n.º 2, pp. 159-166, 2002, doi: 10.1590/S0104-66322002000200011.
- [28] C. Burgos Díaz, «Biotensioactivos producidos por *Sphingobacterium detergens* sp. nov.: Producción, caracterización y propiedades», Universitat de Barcelona, 2012.