



# Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos

Isolation of biosurfactant producing microorganisms and lipases from wastewaters from slaughterhouses and soils contaminated with hydrocarbons

Lizzie Karen Becerra Gutiérrez<sup>1,2,\*</sup>; María Valeria Horna Acevedo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad de San Martín de Porres - Filial Norte, Av. Los Eucaliptos N° 300 - 304, Urb. La Pradera – Pimentel, Chiclayo, Perú.

<sup>2</sup> Departamento de Investigación y Desarrollo de SOLAGRO SAC, Av. Víctor Larco Herrera 1278, Santa Edelmira, Trujillo, Perú.

Received July 16, 2014. Accepted March 14, 2016.

### Resumen

Los biosurfactantes son moléculas anfipáticas que reducen la tensión en la interfase, incrementando así la solubilidad en agua y disponibilidad de compuestos orgánicos, son producidos por bacterias, hongos, y levaduras. Para el aislamiento de bacterias productoras de biosurfactante y lipasas, se sembró en medios inductores 10% de efluentes residuales procedentes de camales y suelos de grifos contaminados con hidrocarburos de la Provincia de Trujillo - Perú. Los cultivos aislados se sembraron en agar lecitina y agar rodamina para la determinación de productores de lipasas. Los microorganismos seleccionados se sembraron en agar sangre y agar Siegmund y Wagner (SW) para la selección preliminar de bacterias biosurfactantes. Posteriormente se determinó a aquellos microorganismos productores de surfactantes mediante Índice de Emulsificación (IE) y Medición de la Tensión superficial. Los cultivos positivos a estas pruebas fueron seleccionados e identificados mediante galerías API e identificación molecular por secuenciamiento de ADN. Los cultivos que redujeron en mayor medida la tensión superficial fueron *P. aeruginosa* y *B. amyloliquefaciens*, llegando a reducir la tensión superficial a  $27,2 \pm 0,4$  y  $31,03 \pm 0,4$  mN/m respectivamente, mientras que *P. stutzeri* y *Pseudomonas* sp. redujeron la tensión superficial a 48,3 y  $52,6 \pm 0,4$  mN/m respectivamente. Se concluye, por tanto, que se obtuvo 49 cultivos productores de lipasas de la provincia de Trujillo, de los cuales se determinó que *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas* sp, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus amyloliquefaciens* son productores de biosurfactantes y pueden aplicarse en el área de la biotecnología ambiental para la remoción y biodegradación de contaminantes.

**Palabras clave:** microorganismos productores de biosurfactantes; secuenciamiento de AND; efluentes residuales.

### Abstract

Surfactants are amphipathic molecules which reduce stress at the interface, thereby increasing water solubility and availability of organic compounds are produced by bacteria, fungi, and yeasts. For the isolation of biosurfactant producing bacteria and lipases, was plant in inducing means 10% of sewage effluent from slaughterhouses and soils contaminated with hydrocarbons Province taps Trujillo - Peru. Isolates were seed in agar cultures lecithin and rhodamine agar for determination of lipase producers. The selected microorganisms were plate on blood agar and agar Siegmund and Wagner (SW) for preliminary selection of biosurfactants bacteria. Later it determined to those microorganisms producing surfactants by Emulsification Index (EI) and measurement of surface tension. Positive cultures these tests were select and identified by API galleries and molecular identification by DNA sequencing. Crops further reduced surface tension were *P. aeruginosa* and *B. amyloliquefaciens*, reaching reduce surface tension to  $27.2 \pm 0.4$  and  $31.03 \pm 0.4$  mN / m respectively, while *P. stutzeri* and *Pseudomonas* sp. reduced surface tension to 48.3 and  $52.6 \pm 0.4$  mN / m respectively. We conclude, therefore, that 49 producing crops lipases province Trujillo, of which it was determined that *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas* sp, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus amyloliquefaciens* are producers of biosurfactants and can be applied in the area of biotechnology was obtained environmental for the removal and biodegradation of contaminants.

**Keywords:** Biosurfactant producing microorganisms; DNA sequencing; wastewaters.

\* Corresponding author  
E-mail: [lizzie\\_karen@hotmail.com](mailto:lizzie_karen@hotmail.com) (L. Becerra).

## 1. Introducción

Los tensioactivos son moléculas anfipáticas que reducen la tensión en la interfase. Debido a esta propiedad, las moléculas de los tensioactivos se ubican en la interfase de fluidos como son los sistemas aceite-agua y aire-agua (Stoyanov *et al.*, 2003). Además, la presencia de tensioactivos en un medio acuoso incrementa la solubilidad en agua y disponibilidad de compuestos orgánicos, siendo ésta una de sus principales propiedades para su aplicación en el área de la biotecnología ambiental para la remoción y biodegradación de contaminantes (Jiménez *et al.*, 2010).

Se ha estudiado la aplicación de estas moléculas en la biorremediación de agua o suelos contaminados con alta cantidad de compuestos grasos, que interfieren con la biodegradación y por tanto su tratamiento. Técnicas como instalación de trampas de grasas, flotadores y tratamiento con adición de álcalis son utilizadas ahora con muy poca eficiencia. La utilización de estos tensioactivos biológicos y enzimas específicas como las hidrolasas, lipasas, puede ser de gran interés para favorecer el tratamiento biológico de ambientes con alto tenor de lípidos (Rigo, 2004).

La industria de extracción y transformación del petróleo emplea tensioactivos en la limpieza de los tanques de almacenamiento para incrementar la solubilidad de hidrocarburos no miscibles en fases acuosas, tales como pentano, hexano, ciclohexano, octano, dodecano, hexadecano, tolueno y naftaleno (Mulligan, 2005). Los tensioactivos son producidos vía química o biológica. Los tensioactivos fabricados por la industria química se utilizan para estas aplicaciones, pero plantean problemas medioambientales debido a su toxicidad y resistencia a la degradación (Karanth *et al.*, 1999)

En la actualidad existe interés en la sustitución de estos tensioactivos químicos con agentes tensioactivos de origen biológico. Estos "biosurfactantes" suelen ser menos tóxico y más fácilmente biodegradable (Costa *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2010).

Los biosurfactantes son producidos por una variedad de microorganismos, ya sea secretada extracelularmente o unidos a componentes celulares, principalmente durante su crecimiento en sustratos inmiscibles en agua (Camilios *et al.*, 2008). Los biosurfactantes producidos por bacterias, hongos, y levaduras incluyen glicolípidos, lipoaminoácidos, lipopéptidos, lipoproteínas, lipopolisacáridos, fosfolípidos, monoglicéridos y diglicéridos. El interés por los biotensioactivos se ha incrementado considerablemente en años recientes por sus aplicaciones en la industria y el ambiente (Costa *et al.*, 2006).

Actualmente se sabe que el tipo de biosurfactante producido depende del tipo de microorganismo que lo produce. Una clase importante de biosurfactantes es los glicolípidos, que incluye ramnolípidos, trehalolípidos y soforolípidos. Los ramnolípidos son producidos por *P. aeruginosa* (Maier y Soberón-Chávez, 2000); los lípidos de la trehalosa son producidos por un número de géneros estrechamente relacionados, incluyendo *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Tsukamurella*, *Gordonia*, *Mycobacterium* y *Arthrobacter*; todos pertenecientes a la división *Firmicutes*; y los soforolípidos son producidos por varias especies de *Candida*. Un grupo recientemente identificado de glicolípidos llamado lípidos de manosil-eritriol son producidas por *Candida antartica* y *Ustilago maydis*. Una segunda clase importante de biosurfactante son las lipoproteínas como surfactina, iturina, fengicina y lichenisina, las cuales son producidas por *Bacillus* sp. Otros géneros que producen lipoproteínas incluyen *Actinoplanes*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia*. Organismos productores de biosurfactantes poliméricos incluyen los siguientes géneros: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Candida*, *Halomonas*, *Methanobacterium*, *Phormidium*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces* y *Sulfolobus* (Bodour *et al.*, 2003; Bouchotroch *et al.*, 2000; Cortés-Camargo y Barragán-Huerta, 2013; Henriksen *et al.*, 2000; Yañez-Ocampo y Wong-Villarreal, 2013).

El objetivo de la presente investigación es aislar bacterias productoras de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos procedentes de la provincia de Trujillo – Perú.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Área de muestreo

El área de muestreo para el aislamiento de bacterias productoras de biosurfactantes comprendió los distritos de Trujillo, Salaverry, El Porvenir, Huanchaco, La Esperanza y Víctor Larco Herrera, pertenecientes a la Provincia de Trujillo – La Libertad. Las muestras fueron colectadas de suelos de grifos y talleres de automóviles así como de lagunas de sedimentación de aguas residuales de camales con alto contenido de grasas.

### 2.2. Muestreo

Las muestras de suelo fueron recolectadas de las zonas donde hubo aceite derramado en los grifos o talleres de automóviles. Las muestras se recolectaron en bolsas de polietileno estériles y se llevaron al laboratorio para el aislamiento. Las muestras de aguas residuales se recolectaron de lagunas de sedimentación de camales donde había gran cantidad de grasas. Las muestras se recolectaron en frascos de vidrio ámbar estéril es y se llevaron al laboratorio para el aislamiento.

### 2.3. Aislamiento de bacterias productoras de biosurfactantes y lipasas

Se agregó 10 mL de efluente residual de camales o 10 g de suelo con residuos de hidrocarburos (10%) en 100mL de 3 caldos inductores: caldo Luria Bertani (LB) más emulsión de yema de huevo al 5%, caldo LB más petróleo al 5% y caldo LB más glicerol al 5%. Se dejó incubar a 30°C durante 72 horas y a 120 rpm. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de cada uno de los caldos y se sembró en placas Petri con Agar Caso. Posteriormente se seleccionaron aquellas colonias morfológicamente diferentes para su posterior análisis.

### 2.4. Evaluación de la actividad lipolítica

Cada colonia aislada se sembró en Agar Lecitina (agar nutritivo + 5% emulsión yema de huevo) y Agar Rodamina (Agar LB + 25 mL/L aceite vegetal + 0,0001 g/L Rodamina B) para observar la producción de enzimas lipasas mediante la formación de un halo translúcido en Agar Lecitina y fluorescencia en Agar Rodamina. Se seleccionaron aquellos cultivos que dieron positivos y se conservaron para su posterior análisis.

### 2.5. Evaluación preliminar de la actividad biosurfactante

#### Actividad hemolítica

Los cultivos seleccionados se sembraron en agar sangre conteniendo 5% (v/v) de sangre de carnero y Agar Base Sangre; y se incubaron a 30 °C durante 24 a 48 horas. La actividad hemolítica se determinó por la presencia de una zona clara alrededor de la colonia.

#### Halo azul en Agar Siegmund y Wagner (SW)

Los cultivos seleccionados se sembraron en Agar Siegmund y Wagner constituido por una base mínima de sales (NaNO<sub>3</sub>, 1g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 g/L; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g/L; CaCl<sub>2</sub>, 0,1 g/L; extracto de levadura, 0,2 g/L; pH 6,5) con glicerol al 2% (Deziel *et al.*, 2000), bromuro de cetiltrimetilamonio (CETAB) 0,2 g/L y azul de metileno 0,005 g/L (Siegmund y Wagner, 1991); la presencia de biosurfactantes se constató por la presencia de un halo azul alrededor de las colonias después de 48 horas de incubación a 30 °C.

### 2.6. Producción de biosurfactante en medio líquido

La producción de biosurfactante por cada uno de los cultivos seleccionados se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250mL conteniendo 50mL de un Medio Mínimo de Sales compuesto por: NaNO<sub>3</sub>: 4g/L; NaCl: 1/L; KCl: 1g/L; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O: 0,1g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 3g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O: 3g/L; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,2g/L; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,001g/L y 2mL de una solución de elementos traza (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O: 0,08g/L; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,75g/L; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O:

0,075 g/L;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : 0,75 g/L y  $\text{H}_3\text{BO}_3$ : 0,15 g/L); y como fuente de carbono glicerol al 4% v/v. El pH fue ajustado a 7,0. El medio fue inoculado con el 5% del cultivo bacteriano de 18 horas cultivadas en Caldo Caso. Se incubó a 30 °C y 120 rpm en una incubadora con agitación (Lab Companion, SI-600R, Corea) durante 72 horas. Posteriormente se procedió a centrifugar el contenido de cada matraz con el fin de obtener un caldo libre de células para su evaluación posterior.

## 2.7. Evaluación cuantitativa de la actividad biosurfactante

### Evaluación de la capacidad emulsificante

La capacidad de emulsificante fue evaluada por medio del índice de emulsificación (IE). El índice de emulsificación de los cultivos aislados se determinó mediante la adición de 2mL de gasolina, diésel y aceite vegetal, y se adicionó a cada tubo 2mL del caldo libre de células, se agitó a alta velocidad durante 2 min en vórtex (Thermo Scientific, M37610-33Q, USA) y se dejó reposar durante 24 h. 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 de índice de emulsificación se calculó utilizando la siguiente ecuación:

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

### Medición de la Tensión superficial

Para la determinación de la tensión superficial, el caldo libre de células fue sujeto a medición según método de ascensión por capilar. Para ello se midió la densidad del líquido utilizando un picnómetro, y posteriormente se agregó la solución a medir en la probeta del equipo de medición, se colocó el capilar con la tapa de jebes a la probeta. Con ayuda de una propipeta (UNI-Sci, USA) se insufló aire a la probeta por medio del vástago lateral con el fin de que el líquido ascienda en el interior del capilar graduado y

posteriormente se dejó reposar hasta que se mantuvo a una altura constante. Se anotó la altura (cm) del líquido en el capilar. La tensión superficial se halló mediante la siguiente fórmula:

$$y = \frac{h \times r \times d \times g}{2}$$

Dónde y: Tensión Superficial (din/cm); h: Distancia entre meniscos (cm); r: Radio del capilar (cm); d: Densidad de la muestra ( $\text{g/cm}^3$ ); g: Aceleración de la Gravedad ( $\text{cm/s}^2$ ). Posteriormente se procedió a realizar la conversión de la Tensión superficial en mN/m.

### Identificación de los microorganismos

Las colonias seleccionadas por su capacidad lipolítica y biosurfactante se identificaron mediante kits de galeras API 20 NE Biomerieux 20050 USA para identificación de bacilos Gram negativos no Enterobacteriaceae y API 50 CH Biomerieux 50430 USA, para identificación de *Bacillus* usando el medio API 50 CHB en aproximadamente 48 horas. La identificación final de los microorganismos fue realizada por empresa Bionoma (Perú), mediante Biología molecular se realizó el secuenciamiento parcial del gen ribosomal 16S amplificado a partir del ADN extraído de los cultivos bacterianos. El procedimiento comprendió: la extracción de ADN genómico de la muestras de cultivos bacteriano; el examen de calidad del ADN genómico mediante pruebas de espectrofotometría y electroforesis; la amplificación del gen 16S ribosomal con cebadores específicos; el chequeo de la cantidad y calidad de los productos de amplificación por PCR mediante electroforesis; el secuenciamiento en dos direcciones de los productos de amplificación en un analizador genético automatizado ABI 3130 (Applied Biosystems™), la generación de elect-roferogramas curados de la secuencia de cada bacteria en archivos de formatos FSA y el análisis bioinformático y genético de las secuencias de ADN para la identificación de las bacterias por homología y filogenia con las secuencias presentes en la base de datos de 3 bancos genéticos.

### 3. Resultados y discusión

Los aislados bacterianos se obtuvieron a partir de muestras de efluentes residuales de camales, caracterizados por su alto contenido de grasa, y muestras de suelo de grifos y talleres de automóviles contaminados con hidrocarburos ubicados en los distritos de Trujillo, Salaverry, El Porvenir, Huanchaco, La Esperanza y Víctor Larco Herrera, pertenecientes a la Provincia de Trujillo – La Libertad. Se obtuvieron 160 cultivos, de los cuales, según las características morfológicas halladas, el 67,5% de cultivos fueron gram negativos y el 32,5% fueron gram positivos (Tabla 1).

Como se puede observar la mayor cantidad de microorganismos gram negativos provinieron de los efluentes residuales, mientras que los microorganismos gram positivos prevalecieron en los suelos estudiados. Esta distribución puede representar la capacidad de los microorganismos para sobrevivir en estos suelos o puede ser una respuesta para el tipo de contaminante presente.

Para determinar la capacidad de producir lipasas de los cultivos aislados, éstos se

sembraron en agar lecitina y agar rodamina (Figura 1). Se consideraron positivos aquellos cultivos donde se observó un halo traslúcido alrededor de la colonia en agar lecitina, y/o fluorescencia bajo luz UV en agar rodamina. Se obtuvieron 49 cultivos productores de lipasas, de los cuales 25 procedieron de los efluentes residuales, y 24 de los suelos contaminados con hidrocarburos (Tabla 2).

Para la determinación preliminar de cepas productoras de biosurfactante, se sembraron los cultivos productores de lipasas en Agar Sangre (Figura 1), el cual permite observar la formación de halos de hemólisis provocada por la disminución de la tensión superficial y el rompimiento de la membrana de los hematíes del medio a causa de los biosurfactantes secretados (Tuleva *et al.*, 2002), y en Agar SW (Figura 1), constatándose la presencia de biosurfactantes por la formación de un halo azul alrededor de las colonias después de 48 h de incubación a 30°C. Este método permite evaluar semicuantitativamente la presencia de glicolípidos extracelulares u otros tensioactivos aniónicos.

**Tabla 1**

Características, en base a la Tinción de Gram, de los microorganismos aislados a partir de efluentes y suelos contaminados

Fuente		Gram Positivo				Gram Negativo			
		Bacilo	Coco	Cocobacilo	Total	Bacilo	Coco	Cocobacilo	Total
Agua residual	Cantidad	6	20	5	31	79	4	12	95
	Porcentaje (%)	3,8	12,5	3,1	19,4	49,4	2,5	7,5	59,4
Suelo contaminado	Cantidad	18	2	1	21	10	1	2	13
	Porcentaje (%)	11,3	1,3	0,6	13,1	6,3	0,6	1,3	8,1
Total	Cantidad	52				108			
	Porcentaje (%)	32,5				67,5			

**Tabla 2**

Cantidad y Porcentaje de microorganismos seleccionados según su capacidad lipolítica y biosurfactante

	Actividad lipolítica			Actividad biosurfactante				
	Agar Lecitina	Agar Rodamina	Seleccionados	Agar Sangre	Agar SW	IE	TS	Seleccionados
Cantidad	35	25	49	24	13	9	4	4
Porcentaje (%)	21,9	15,6	30,6	15	8,1	5,6	2,5	2,5

Fue desarrollado por Siegmund y Wagner, donde los microorganismos de interés son cultivados en una placa con este medio de cultivo. Si los microorganismos secretan tensioactivos aniónicos, se forma un complejo insoluble, de color azul oscuro, observándose colonias rodeadas de un halo color azul oscuro (Tuleva *et al.*, 2002).

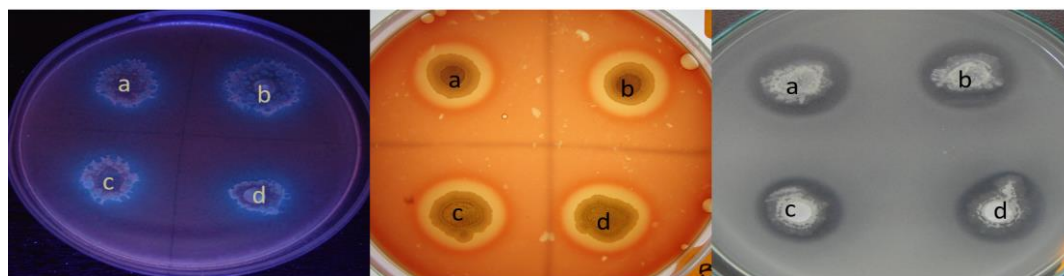
Según Mulligan *et al.* (1984), la selección de bacterias productoras de biosurfactantes mediante agar sangre es un método útil para la selección preliminar de estos microorganismos (Mulligan *et al.*, 1984; Schulz *et al.*, 1991; Plaza *et al.*, 2006; Youssef *et al.*, 2004); más no se considera un método definitivo debido a las limitaciones que tiene (Jain *et al.*, 1991) Este método no es específico, ya que algunas enzimas líticas también pueden provocar halos de hidrólisis, además no se pueden utilizar sustratos hidrofóbicos como única fuente de carbono; de tal manera que induzcan la producción de biosurfactantes. Por tanto, este método es recomendable para detección preliminar que debe ser apoyado por otras técnicas basadas en mediciones de la actividad superficial (Mulligan *et al.*, 1984).

De los 49 cultivos productores de lipasas, 24 cultivos formaron halo de hemólisis en agar sangre y 13 formaron halos color azul en agar SW (Tabla 2). A pesar de que no todos los cultivos que presentaron hemólisis dieron resultados positivos en agar SW, no se consideró un precepto para seleccionar cepas con actividad surfactante y, por lo tanto, se consideró aquellos que mostraron capacidad emulsificante.

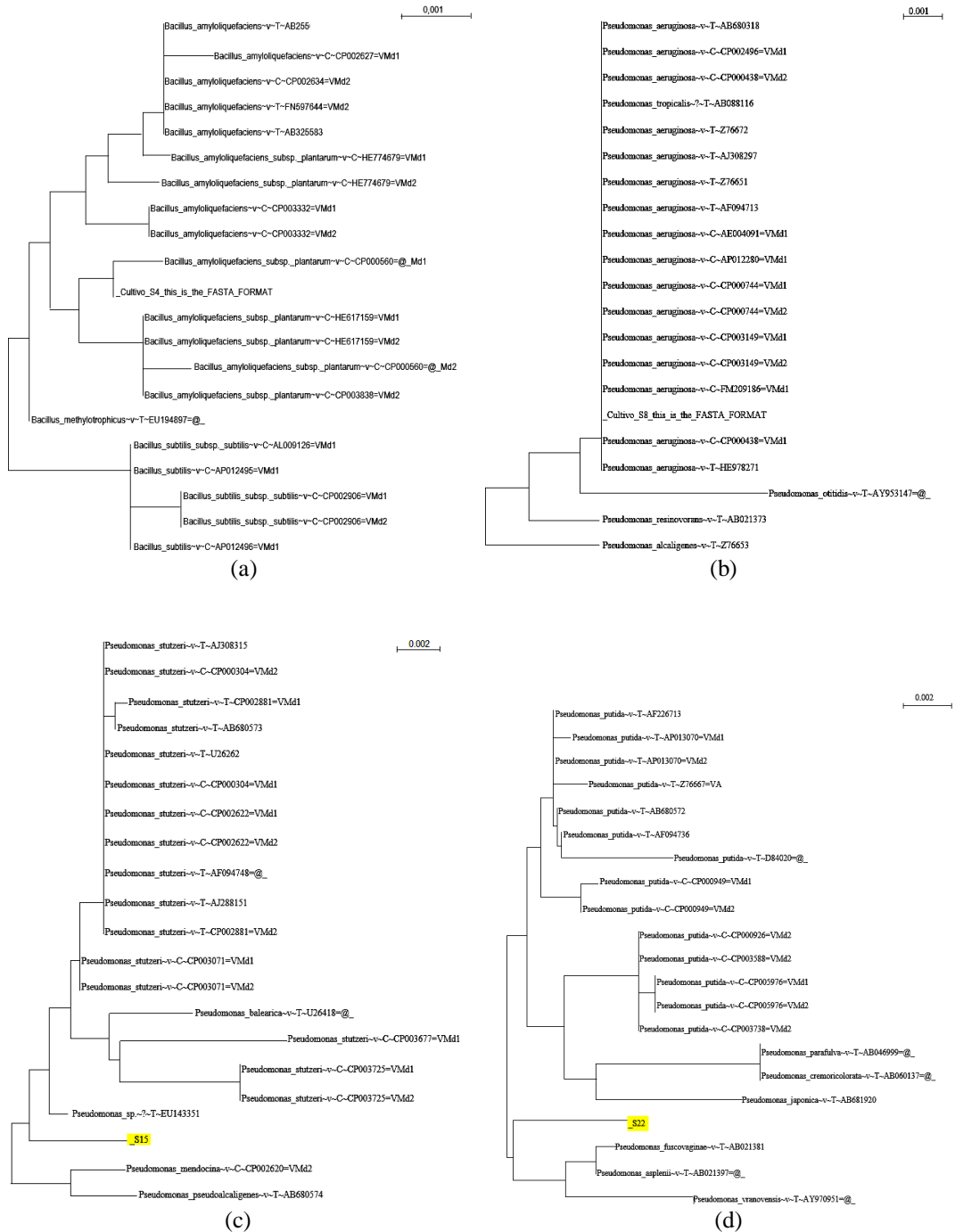
La producción de biosurfactante en medio líquido se realizó utilizando un Medio Mínimo de Sales más glicerol como fuente de carbono, para las pruebas de índice de Emulsificación y Tensión Superficial.

El Índice de Emulsificación es un método adecuado que permite evaluar la producción de surfactantes por ciertos microorganismos. La actividad emulsificante se correlaciona con la concentración de surfactante pero no siempre con su actividad superficial, por lo cual este método es útil para indicar la presencia de surfactante. Solo 6 cultivos dieron positivo en la prueba de Emulsificación en compuestos inmiscibles (Tabla 2). De los 6 cultivos que dieron positivo en la prueba de Emulsificación, se midió la Tensión superficial del caldo libre de células, mediante una probeta y capilar graduado, obteniendo solo 4 cultivos con capacidad de disminuir la tensión superficial de manera significativa. Estos microorganismos fueron identificados mediante galerías API e identificación molecular por secuenciamiento de ADN, encontrándose a *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus amyloliquefaciens*, siendo *P. aeruginosa* y *B. amyloliquefaciens* (Figura 2) quienes presentaron mejores resultados en cuanto a la disminución de la tensión superficial.

En muchas publicaciones se hace referencia a distintas *Pseudomonas sp.* capaces de sobrevivir e incluso degradar una amplia variedad de compuestos orgánicos, como pesticidas, diversos compuestos halógenados, e hidrocarburos derivados del petróleo (Isken *et al.*, 1999; Hubert *et al.*, 1999).



**Figura 01.** Crecimiento de *Pseudomonas stutzeri* (a), *Pseudomonas sp.* (b), *Pseudomonas aeruginosa* (c) y *Bacillus amyloliquefaciens* (d) en Agar Rodamina (izquierda), Agar Sangre (centro) y Agar Lecitina (derecha).



**Figura 02.** Árbol filogenético de *Pseudomonas aeruginosa* (a), *Pseudomonas stutzeri*, (b), *Pseudomonas* sp. (c) y *Bacillus amyloliquefaciens* (d).

En cuanto a la disminución de la tensión superficial, se encontró que *B. amyloliquefaciens*, redujo la tensión superficial de 72 mN/m (agua) a  $31,03 \pm 0,4$  mN/m, mientras que las especies de *Pseudomonas* obtenidas disminuyeron la tensión superficial a  $27,2 \pm 0,4$  mN/m,

considerada activa, mientras que *P. stutzeri*, y *Pseudomonas* sp. redujeron la tensión superficial a  $48,3$  y  $52,6 \pm 0,4$  mN/m respectivamente (Tabla 3). La diferencia radica en la composición del ramnolípido que producen, si solamente mono-ramnolípido, o una mezcla de mono

- y di-ramnolípido. Las propiedades fisicoquímicas del mono-ramnolípido son bastante diferentes de los de la mezcla de mono - y di-ramnolípido. Debido a que el mono-ramnolípido es menos soluble, se adsorbe más fuertemente a las superficies, solubilizando así hidrocarburos en mayor medida y es capaz de unir metales catiónicos hasta 10 veces más fuertemente (Ochoa-Loza, 1998; Zhang y Miller, 1995; Zhang *et al.*, 1997), haciendo posible su aplicación industrial de manera muy diversa (Bodour y Maier, 2002).

**Tabla 03**

Identificación de los microorganismos aislados con capacidad lipolítica y surfactante

Código	Procedencia	Identificación	Tensión superficial (mN/m)
5MES	Agua residual	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	48,3 ± 0,4
5-14MB	Suelo	<i>Pseudomonas sp.</i>	52,6 ± 0,4
Y4-MA	Suelo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	31,03 ± 0,4
Y5A-MA	Suelo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27,2 ± 0,4

### Acknowledgements

A Fincyt por el apoyo brindado para la realización de la presente investigación a través del Convenio N° 012 – FYNCYT - FIDECOM - PIPEA – 2012.

### 5. References

Bodour, A.; Maier, R. 2002. Biosurfactants: types, screening methods, and applications, p. 750-770. In G. Bitton (ed.), *Encyclopedia of environmental microbiology*, 1st ed. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, N.J.

Bodour, A.; Drees, K.; Maier, R. 2003. Distribution of Biosurfactant-Producing Bacteria in Undisturbed and Contaminated Arid Southwestern Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 69(6): 3280-87.

Bouchotroch, S.; Quesada, E.; Izquierdo, I.; Rodriguez, M.; Béjar, V. 2000. Bacterial exopolysaccharides produced by newly discovered bacteria belonging to the genus *Halomonas*, isolated from hypersaline habitats in Morocco. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 24:374-378.

Camilios, D.; Meira, J.; de Araújo, J.; Mitchell, D.; Krieger, N. 2008. Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 81(3): 441-8

Cortés-Camargo, S.; Barragán-Huerta, B. 2013. Producción de biosurfactantes por microorganismos halófilos. *Revista Sistemas Ambientales* 6(1): 1-8.

Costa, S.; Nitschke, M.; Haddad, R.; Eberlin, M.; Contiero, J. 2006. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process Biochem* 41:483-488.

Deziel, E.; Lepine, F.; Milot S.; Villemur, R. 2000. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochim Biophys Acta* 1485 (2-3): 145-152.

Henriksen, A.; Anthoni, U.; Nielsen, T.; Sørensen, J.; Christophersen, C.; Gajhede, M. 2000. Cyclic lipoundecapeptide tension from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *Acta Crystallogr C* 56:113-115.

Hubert, C.; Shen, Y.; Voordouw, G. 1999. Composition of toluene degrading microbial communities from soil at different concentrations of toluene. *Appl. Environ. Microbiol* 65 (7): 3064-70.

Isken, S.; Derks, A.; Wolffs, P.; de Bont, J. 1999. Effect of organic solvents on the yield of solvent tolerant *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Environ. Microbiol* 65 (6): 2631-35.

Jain, D.; Collins-Thompson, D.; Lee, H.; Trevors, J.T. 1991. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Methods* 13(4): 271-279.

Jiménez, D.; Medina, S.; Gracida, J. 2010. Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Rev. Int. Contam. Ambient* 26(1): 65-84

Karant, N.; Deo, P.; Veenanadig, N. 1999. Microbial production of biosurfactants and their importance. *Curr Sci* 77: 116-126.

Maier, R.; Soberón-Chávez, G. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential environmental applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 54: 625-633.

Mulligan, C.; Cooper, D.; Neufeld, R. 1984. Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *J Fermentation Technol* 62(4): 311-314.

Mulligan, C. 2005. Environmental application for biosurfactants. *Environ Pollut* 133:183-198.

Ochoa-Loza, F. 1998. Physico-chemical factors affecting rhamnolipid (biosurfactant) application for removal of metal contaminants from soil. Ph.D. dissertation. University of Arizona, Tucson.

Plaza, G.; Zjawiony, I.; Banat, I. 2006. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated bioremediated soils. *J Petro Science Eng* 50(1): 71-77.

Rigo, E. 2004. Aplicação de lipases como auxiliary no pré-tratamento de efluentes de frigoríficos de suínos e bovinos. *Dissertação (Maestría)*, URI, Erechim. RS.

Schulz, D.; Passeri, A.; Schmidt, M.; Lang, S.; Wagner, F.; Wray, V.; Gunkel, W. 1991. Marine biosurfactants. I. Screening for biosurfactants among crude-oil degrading marine microorganisms from the North-Sea. *Z Naturforsch* 46(3-4): 197-203.

Siegmund, I.; Wagner, F. 1991. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas Swinburne* species during growth on mineral agar. *Biotechnol. Tech* 5: 265-268.

Stoyanov, S.; Rehage, H.; Paunov, V. 2003. Novel surface tension isotherm for surfactants based on local density functional theory. *Phys. Rev. Lett* 91(8): 86-102



- Tuleva, B.; Ivanov, G.; Christova, N. 2002. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. Z. Naturforsch 57: 356-360.
- Yañez-Ocampo, G.; Wong-Villarreal, A. 2013. Biosurfactantes Microbianos, Producción Potencial con Residuos Agroindustriales de Chiapas. Bio Tecnología 17(3): 12-28.
- Youssef, N.; Duncan, K.; Nagle, D.; Savage, K.; Knapp, R.; McInerney, M. 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. J Microbiol Methods 56(3): 339–347.
- Zhang, Y.; Miller, R. 1995. Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. Appl. Environ. Microbiol 61: 2247-2251.
- Zhang, Y.; Maier, W.; Miller, R. 1997. Effects of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene. Environ. Sci. Technol 31: 2211-2217.