

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Producción de ramnolípidos por pseudomonas
aeruginosa Pb 25: evaluación de su actividad
emulsificante y de remoción de metales pesados**

TESIS

Para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en Microbiología
y Parasitología

AUTOR

Johnny Daniel Giraldo Zambrano

ASESOR

Susana Gutiérrez Moreno

Lima – Perú

2012



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRODUCCIÓN DE RAMNOLÍPIDOS POR
Pseudomonas aeruginosa PB 25:
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD EMULSIFICANTE Y DE
REMOCIÓN DE METALES PESADOS

Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo con Mención en
Microbiología y Parasitología

Bach. JOHNNY DANIEL GIRALDO ZAMBRANO

Asesora: Mg. Susana Gutiérrez Moreno

Lima - Perú

2012

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento por todas las enseñanzas recibidas y su valiosa amistad al profesor Fernando Merino y muy en especial a la profesora Susana Gutiérrez por su asesoría, el apoyo y la confianza que me ha otorgado a lo largo de mi vida universitaria y profesional. A ellos mis mejores deseos y mi gratitud eterna.

A D' Lourdes por todo el aliento, el cariño y la fuerza que me motivan cada día a ser una mejor persona y buscar siempre nuevas metas. A ella mi más profundo y especial afecto y agradecimiento.

A mis padres, Adrián Giraldo y María Zambrano por todo el afecto y la confianza que siempre me han dado, al igual que a mis hermanos por su valiosa compañía.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana, en especial a Cinthya, Paul y Yessenia, por todo el apoyo recibido durante la realización y culminación de este trabajo.

Al Vicerrectorado Académico de la UNMSM por el apoyo otorgado como parte del Proyecto de Iniciación Científica del año 2008.

Finalmente deseo agradecer al Vicerrectorado de Investigación de la UNMSM por el financiamiento otorgado como parte del Fondo de Promoción de Trabajos de Tesis de Pregrado del año 2010.

RESUMEN

Los avances en la ciencia y la tecnología desde la revolución industrial, han aumentado la capacidad del ser humano para explotar los recursos naturales causando un constante aumento de perturbaciones en los diversos ecosistemas. En este contexto, el uso de los biosurfactantes que solubilizan fracciones de hidrocarburos contaminantes, representa una prometedora alternativa de aplicación para cualquier proceso tecnológico de remediación de ambientes naturales. El objetivo del presente trabajo se basó en la evaluación de la actividad emulsificante y la capacidad de remoción de metales pesados de un biosurfactante de naturaleza ramnolípida producido empleando glicerol como única fuente de carbono por una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PB25. Con los resultados obtenidos se logró determinar una velocidad de crecimiento específica (μ) de $0,0351 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo generacional (t_g) de 19,75 h; registrándose a su vez una concentración máxima de ramnolípidos de 2,47 g/L en la fase estacionaria de crecimiento, con valores de rendimiento de 0.13 gramos de ramnolípido por gramo de glicerol y de productividad de 0.082 g/L-h. De igual forma se logró conseguir un valor máximo de actividad emulsificante frente a crudo de petróleo de 5.257 UAE/mL e Índices de Emulsificación E24 de 53, 64, 62 y 84 % para crudo de petróleo, petróleo diesel 2, gasolina y kerosene respectivamente. Asimismo, se obtuvieron valores máximos de remoción del 98% y 99% para plomo y cadmio respectivamente presentes en soluciones acuosas a pH 11.

Por lo tanto, es posible afirmar que este tipo de biosurfactante puede ser empleado en futuros procesos biotecnológicos de remediación de ambientes naturales contaminados por la presencia de metales pesados y/o crudo de petróleo y sus derivados.

Palabras clave: Remediación, biosurfactantes, ramnolípidos, *Pseudomonas aeruginosa*, actividad emulsificante, hidrocarburos, metales pesados.

ABSTRACT

Since the industrial revolution, advances in science and technology have increased the human capacity to exploit natural resources causing ever-increasing disturbances in ecosystems. In this context, the use of biosurfactants represents a promising alternative application for any technological process of remediation of natural environments.

The objective of this work was based on the evaluation of the emulsifying activity and the ability to remove heavy metals with a rhamnolipidic biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain PB25, using glycerol as sole carbon source.

In this media this strain had a specific growth rate (μ) of $0,0351 \text{ h}^{-1}$ and a generational time (td) of 19,75 h. At the same time it produced maximum concentration of 2.47 g/L rhamnolipid, with yields (Y) of 0.13 g/g and productivity of 0.082 g/L-h. Similarly, the rhamnolipid is managed to achieve a maximum value of emulsifying activity compared to crude oil from 5.257 UAE/mL and E24 emulsification index of 53, 64, 62 and 84% for crude oil, diesel oil 2, gasoline and kerosene respectively. In addition, the rhamnolipid got to remove 98% of lead and 99% of cadmium in aqueous solutions at pH 11.

In conclusion, this type of biosurfactant can be used in future biotechnological processes for the remediation of natural environments contaminated by the presence of heavy metals and/or crude oil and its derivatives.

Keywords: Remediation, biosurfactant, rhamnolipid, *Pseudomonas aeruginosa*, emulsifying activity, hydrocarbons, heavy metals.

ÍNDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO	4
2.1.	Contaminación ambiental	4
2.2.	Biotecnología ambiental y biorremediación	8
2.3.	Surfactantes, clasificación y principales propiedades	9
2.4.	Producción de ramnolípidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
2.5.	Principales aplicaciones del uso de los ramnolípidos.....	18
3.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
3.1.	Hipótesis	23
3.2.	Objetivos	23
3.2.1.	Objetivo general	23
3.2.2.	Objetivos específicos	23
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1.	Selección de la cepa bacteriana:	24
4.2.	Producción del biosurfactante:	25
4.3.	Extracción y Purificación del Ramnolípidos:.....	25
4.4.	Actividad Emulsificante del Ramnolípidos	26
4.5.	Evaluación de las Condiciones del Medio en la Actividad Emulsificante.....	27
4.6.	Enfrentamiento del Ramnolípidos con los Metales Pesados	28
4.7.	Evaluación de las Condiciones del medio en la Captación del metal	28
4.8.	Análisis de datos	29
5.	RESULTADOS	30

5.1. Selección de la cepa bacteriana	30
5.2. Producción del ramnolípido.....	31
5.3. Evaluación de la actividad emulsificante	31
5.4. Evaluación de la unión a metales pesados.....	32
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	35
6.1. Producción del biosurfactante.....	35
6.2. Actividad emulsificante y capacidad de remoción de metales.....	35
7. CONCLUSIONES	39
8. RECOMENDACIONES.....	40
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Contaminantes medioambientales.	5
Tabla 2. Lugares y contaminantes industriales.	6
Tabla 3. Costos de métodos alternativos para el tratamiento de suelos contaminados con materiales peligrosos.	9
Tabla 4. Características de surfactantes requeridas para variadas aplicaciones.....	10
Tabla 5. Tipos y origen microbiano de algunos biosurfactantes.	14
Tabla 6. Cepas bacterianas seleccionadas para el estudio.....	24
Tabla 7. Cepas bacterianas seleccionadas para el estudio.....	30
Tabla 8. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para los datos obtenidos de remoción de plomo por los ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB 25 ($p < 0.05$). .	32
Tabla 9. Prueba de Homogeneidad de Levene para las varianzas de los datos obtenidos de remoción de plomo por los ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB 25 ($p < 0.05$).....	33
Tabla 10. Prueba de ANOVA para los datos obtenidos de remoción de plomo por los ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB 25 ($p < 0.05$)	33
Tabla 11. Prueba post-análisis de Scheffe para los datos obtenidos de remoción de plomo por los ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB 25 ($p < 0.05$). .	34
Tabla 12. Valores de producción de ramnolípidos obtenidos.	49
Tabla 13. Efecto de los ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB 25 sobre la Actividad emulsificante (UAE/mL) y el Índice de emulsión E24 (%) sobre petróleo crudo y frente a variaciones en la concentración del biosurfactante (valor de pH=7; los valores mostrados representan el promedio de tres pruebas independientes)	49

Tabla 14. Efecto del pH sobre la Actividad emulsificante (UAE/mL) sobre petróleo crudo frente a variaciones en los valores del pH del medio (concentración del ramnolípido del 1% p/v; los valores mostrados representan el promedio de tres pruebas independendientes).....	49
Tabla 15. Índice de emulsión E24 (%) sobre hidrocarburos por ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB25 frente a variaciones en los valores del pH del medio (concentración del ramnolípido igual al 1% p/v; los valores mostrados representan el promedio de tres pruebas independendientes).....	50
Tabla 16. Porcentaje de remoción (%) de metales pesados frente a diferentes concentraciones del biosurfactante producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB25 (pH del medio = 7; los valores mostrados representan el promedio de tres pruebas independendientes).....	50
Tabla 17. Porcentaje de remoción (%) de metales pesados por ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB25, frente a variaciones del pH del medio (los valores mostrados representan el promedio de tres pruebas independendientes).....	50
Figura 1. Tensión superficial, tensión interfacial y solubilización como función de la concentración del surfactante (CMC representa la concentración micelial crítica). (Mulligan y Gibbs, 2004).....	12
Figura 2. Representación molecular de mono-ramnolípidos (figura superior) y di-ramnolípidos (figura inferior) producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Fuente: (Lovaglio et al., 2011).	16
Figura 3. Patrones de crecimiento microbiano de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB25 (◆), producción del ramnolípidos (■) y consumo de glicerol (▲) durante su cultivo en un medio mínimo mineral suplementado con 30 g/L de glicerol (los valores mostrados representan el promedio de tres pruebas independientes realizadas).....	51

Figura 4. Regresión lineal correspondiente a la fase de crecimiento exponencial de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB 25; los valores mostrados corresponden al promedio de tres pruebas independientes realizadas ($y=0,0351x+0,2286$; $r^2=0.9$).....	51
Figura 5. Actividad emulsificante (UAE/mL) de ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB25, sobre petróleo crudo frente a variaciones en las concentraciones del ramnolípidos (pH del medio igual a 7).....	52
Figura 6. Índice de Emulsificación E24 (%) de ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB25, sobre petróleo crudo frente a variaciones en las concentraciones del ramnolípidos (pH del medio igual a 7).....	52
Figura 7. Actividad emulsificante (UAE/mL) de ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB25, sobre petróleo crudo frente a variaciones en los valores del pH (concentración del ramnolípidos igual a 1% p/v).....	53
Figura 8. Índice de Emulsificación E24 (%) de ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB25, sobre petróleo crudo frente a variaciones en los valores del pH (concentración del ramnolípidos igual a 1% p/v).....	53
Figura 9. Índice de Emulsificación E24 (%) de ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB25, sobre petróleo diesel 2 frente a variaciones en los valores del pH (concentración del ramnolípidos igual a 1% p/v).....	54
Figura 10. Índice de Emulsificación E24 (%) de ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB25, sobre gasolina de 84 octanos frente a variaciones en los valores del pH (concentración del ramnolípidos igual a 1% p/v).....	54
Figura 11. Índice de Emulsificación E24 (%) de ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB25, sobre kerosene frente a variaciones en los valores del pH (concentración del ramnolípidos igual a 1% p/v).....	55
Figura 12. Índice de Emulsificación E24 (%) de ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB25, sobre petróleo crudo (▲), petróleo diesel 2 (■), gasolina	

de 84 octanos (◆) y kerosene (●) frente a variaciones en los valores del pH (concentración del ramnolípido igual a 1% p/v; los valores mostrados representan el promedio de tres pruebas independientes).....	55
Figura 13. Porcentaje de remoción de plomo por ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB25 al 0.1% p/v, frente a variaciones en el pH del medio...	56
Figura 14. Porcentaje de remoción de cadmio por ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB25 al 0.1% p/v, frente a variaciones en el pH del medio.....	56
Figura 15. Producción de ramnolípidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB 25 en medio mineral. (A) Medio de cultivo a las 0 horas de incubación. (B) Medio de cultivo a las 60 horas de incubación, (C) Medio de cultivo a las 120 horas de incubación. (D) Formación de abundante espuma por agitación manual del medio de cultivo a las 120 horas de incubación.....	57
Figura 16. (A) Extracción cloroformo-etanol de los ramnolípidos del sobrenadante del medio de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB 25 luego del período de incubación. (B) Ramnolípidos en fase sólida luego de proceso de extracción.	58

1. INTRODUCCIÓN

Los avances producidos en ciencia y la tecnología desde la revolución industrial, han aumentado la capacidad del ser humano para explotar los recursos naturales. Sin embargo, desde entonces se han generado un constante aumento de perturbaciones en los diversos ecosistemas del medio ambiente (Atlas y Bartha, 2002).

La repentina introducción de compuestos químicos xenobióticos o la reubicación masiva de materiales naturales con frecuencia puede sobrepasar la capacidad natural de autolimpieza de los ecosistemas receptores y por lo tanto dar como resultado la acumulación de contaminantes a niveles problemáticos y hasta perjudiciales (Cañizares, 2000).

Dentro de las diferentes clases de actividades industriales, tanto la minería como la industria petroquímica, representan en la actualidad dos de las mayores amenazas para la adecuada conservación del medio ambiente. La actividad minera provoca la liberación de metales pesados al medio ambiente, provocando la dispersión de los mismos e incluso su acumulación en las diferentes capas del suelo o en el interior de cuerpos de agua (Youssef *et al.*, 2007), este hecho incrementa substancialmente las oportunidades de exposición humana frente a este tipo de contaminantes, así como la consiguiente alteración del equilibrio de los ecosistemas en todos sus niveles, debido a sus ya ampliamente reconocidos efectos tóxicos.

La contaminación por hidrocarburos de petróleo o por compuestos derivados del mismo, provoca también graves problemas ambientales y de salud humana (Mohan *et al.*, 2006). Estos compuestos también pueden contaminar y acumularse

tanto en suelos como en cuerpos de agua, siendo los ecosistemas acuáticos los más sensibles a este tipo de contaminación (Krepesky *et al.*, 2007).

Este tipo de problemas asociados a estas dos clases de actividades industriales toman mayor importancia si tomamos en cuenta que nuestro país depende en gran parte de las divisas generadas por la industria minera y del petróleo, cuyas actividades continuarán realizándose durante varios años debido a la abundancia de recursos naturales con las que cuenta el territorio nacional.

La participación de los productos mineros metálicos en el total de exportaciones nacionales llegan a representar un total del 53%, ocupando el primer lugar de las mismas, siendo el segundo lugar para las exportaciones relacionadas con el petróleo y gas natural que llegan a alcanzar el 10.58%. En ambos casos los valores correspondientes a estos dos tipos de actividades se encuentran muy lejos del resto de exportaciones nacionales siendo el tercer lugar ocupado por los productos de origen agropecuario (5.60%) y el cuarto por la pesquería (5.27%) (Ministerio de Energía y Minas, 2011).

Sin embargo la extracción, explotación y procesamiento tanto de los recursos minerales como de las fuentes de combustibles fósiles, se realiza en la actualidad principalmente mediante procesos fisicoquímicos que producen desechos nocivos para el medio ambiente. Muchas de estas sustancias nocivas cuando son expuestas a las lluvias o fuentes de agua pueden expandirse agravando la naturaleza del problema tanto para los ecosistemas naturales como para las poblaciones humanas aledañas (Atlas y Bartha, 2002).

Frente a esta situación, tenemos que a pesar de los esfuerzos actuales para combatir y aminorar este tipo de problemas, en la actualidad el uso de las tecnologías convencionales es aún insuficiente, siendo muchas de ellas poco eficientes y de alto costo (Zhang *et al.*, 2005). Muchas de las tecnologías

tradicionales para el tratamiento de suelos y aguas contaminadas por metales pesados no consiguen remover completamente estos metales o de hacerlo generan a su vez residuos tóxicos productos de su empleo, provocando de esta forma problemas latentes en el medio (Juwarkar et al., 2007; Sandrin et al., 2000).

El tratamiento de zonas contaminadas, tanto por metales pesados o hidrocarburos de petróleo, requiere generalmente del uso de sustancias sintéticas que si bien pueden ser altamente efectivas, poseen también un grado de toxicidad, llegando incluso a ser destructivas tanto para la estructura física, química o biológica de los suelos o aguas (Neilson et al., 2003; Mohan et al., 2006), por lo que su uso no es el más adecuado en situaciones donde el objetivo principal de un proceso de remediación es retornar la zona afectada a un estado saludable y productivo.

En nuestro país, la falta de políticas adecuadas de manejo y control de la contaminación provocada por la actividad industrial hace que actualmente sea de vital importancia la búsqueda de nuevos sistemas y metodologías que en conjunto con tecnologías convencionales o nuevas, nos permitan solucionar o reducir el grave impacto ecológico de estas actividades.

El uso de sustancias de origen biológico ofrece una nueva alternativa de solución amigable con el medio ambiente, especialmente en la ausencia de tecnologías que contribuyan a solucionar eficazmente los problemas ocasionados por las actividades industriales del hombre, más aun tomando en cuenta que en nuestro país no existen o son muy pocas las referencias acerca del uso de ese tipo particular de sustancias.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Contaminación ambiental

La contaminación puede definirse como la introducción de sustancias en el medioambiente, que en virtud a sus características inherentes, persistencia o cantidades involucradas, pueden causar daños a la salud de las personas, seres vivos o comprometer la habilidad del medioambiente para sostener a la vida misma (Evans y Furlong, 2003).

Los contaminantes pueden provenir de muchos orígenes y pueden tener variadas formas. Algunos de los principales grupos de contaminantes medioambientales que pueden contaminar el suelo, el agua y el aire son inorgánicos, tales como metales o nitratos, orgánicos tales como aguas residuales, compuestos petroquímicos y sintéticos, agentes biológicos como patógenos y sustancias gaseosas incluyendo sustancias volátiles, gases y sustancias particuladas (Tabla 1).

De estos grupos de contaminantes tenemos que son los metales los que provocan mayores impactos en el medio ambiente. Metales procedentes de un número diverso de procesos industriales pueden contaminar el aire, agua y/o suelos. Los metales claramente no son degradables por los sistemas biológicos, pero los organismos pueden acumularlos por procesos de bioacumulación y biomagnificación (Atlas y Bartha, 2002).

Tabla 1. Contaminantes medioambientales.

Inorgánicos

Metales: cadmio, mercurio, plata, cobalto, plomo, cobre, cromo, hierro.

Isótopos radiactivos

Nitratos, nitritos, fosfatos

Cianuros

Orgánicos

Biodegradables: aguas residuales, residuos domésticos, agrícolas e industriales.

Residuos petroquímicos: petróleo, gasóleo, BTEX*

Sintéticos: pesticidas, organohalogenados, PHAs**

Biológicos

Patógenos: Bacterias, virus, parásitos

Gaseosos

Gases: SO₂, CO₂, NO_x, metano

Volátiles: clorofluorocarbonos, compuestos orgánicos volátiles (VOCs)

Particulados

Fuente: Scragg, 1999

* BTEX: benceno, tolueno, etilbenceno, xileno.

** PHAs: hidrocarburos poliaromáticos.

Otro rasgo distintivo de la fisiología de los metales, es que aun cuando muchos de ellos son esenciales para el crecimiento como el Na, K, Mg, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Mo, se ha reportado que también pueden tener efectos tóxicos sobre las células (Cañizares, 2000), principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas.

Debido a su movilidad en los ecosistemas acuáticos naturales y a su toxicidad para las formas superiores de vida, se les ha dado prioridad como los contaminantes inorgánicos más importantes en el ambiente. Puesto que aun cuando se encuentren presentes en cantidades bajas e indetectables, la recalcitrancia y consiguiente persistencia de los metales pesados en cuerpos de agua, implica que a través de procesos naturales como la biomagnificación, su

concentración puede llegar a ser tan elevada que empiece a ser tóxica para las formas de vida (Atlas y Bartha, 2002).

Tabla 2. Lugares y contaminantes industriales.

Industria	Lugares	Contaminantes
Química	Producción de ácidos / álcalis Producción de colorantes Fertilizantes y pesticidas Industria farmacéutica Pinturas, tratamiento de maderas	Ácidos, álcalis, metales, disolventes, fenoles, compuestos orgánicos
Petroquímica	Refinerías Almacenamiento de combustibles Destilerías de alquitrán	Hidrocarburos, BTEX, PHAs, fenoles, ácidos, álcalis, asbestos
Metales	Hierro y acero Fundiciones, metalúrgicas Plateado y galvanizado Ingeniería Armadores Plantas de chatarra	Metales, especialmente Fe, Cu, Ni, Cr, Zn, Cd, Pb, asbestos
Energía	Producción de gas Centrales energéticas	Fenoles, cianuros, compuestos de azufre, polvo de carbón
Minería	Minas y apilamiento de materiales Recuperación de suelos Canteras	Metales, especialmente Cu, Zn, Pb; gases, lixiviados
Suministro de aguas Tratamiento de aguas	Aguas Aguas residuales	Metales en lodos, lodos, microorganismos
Otros	Diques, puertos, Curtiembre Producción de gomas	Metales, compuestos orgánicos, metano, sustancias tóxicas, inflamables o explosivas

Fuente: Scragg, 1999.

De igual forma otro de los principales grupos de contaminantes del medio ambiente, son aquellos derivados de la industria petroquímica (Tabla 2). El petróleo crudo es una mezcla compleja y variable de compuestos orgánicos. La

mayoría de sus compuestos son hidrocarburos que varían en peso molecular desde el gas metano hasta los de alto peso como los alquitranes y bitúmenes.

Estos hidrocarburos pueden presentarse en un amplio rango de estructuras moleculares: cadenas lineales y ramificadas, anillos sencillos, condensados y aromáticos. Los dos principales grupos de hidrocarburos aromáticos son los monocíclicos, el benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX), y los hidrocarburos polícíclicos (PHAs) tales como el naftaleno, antraceno y fenantreno. Además de los hidrocarburos, los crudos contienen 0,05-3% de compuestos heterocíclicos que también contienen azufre, nitrógeno y oxígeno y algunos metales (Scragg, 1999).

El crudo se refina luego de su extracción en procesos que convierten la mayoría de los hidrocarburos poliaromáticos en compuestos aromáticos monocíclicos. Normalmente los naftalenos pueden constituir el 5-35% del crudo, lo cual puede reducirse a un 1-7% después del refinado. Los combustibles para aviones por ejemplo contienen típicamente más de 300 tipos diferentes de hidrocarburos. La gasolina, que es un contaminante común en suelos y aguas, es también una mezcla compleja de compuestos. Los componentes mayoritarios de las gasolinas son generalmente isopentanos, p-xilenos, n-propilbencenos, 2,3-dimetilbutanos, n-butanos, n-pentanos y toluenos que juntos constituyen más del 50% de la mezcla. Sin embargo el compuesto más importante desde una perspectiva de salud pública es probablemente el benceno, debido a que es ampliamente conocido como un carcinógeno para los humanos, razones por las cuales su presencia es a menudo uno de los principales objetivos de los procesos de remediación de zonas contaminadas con hidrocarburos (Alvarez e Illman, 2006).

En el caso de derrames de hidrocarburos tenemos que si bien los compuestos BTEX aunque no son miscibles en agua, son móviles y pueden llegar a contaminar aguas subterráneas en casos de pérdidas en suelos. Los componentes volátiles pueden perderse en la atmósfera si la pérdida ocurre en la superficie, pero si la pérdida es bajo el nivel del suelo los componentes móviles pueden migrar a través del suelo hasta el nivel freático y a aguas subterráneas. Los componentes de peso molecular más alto son en su mayor parte insolubles e inmiscibles y se pueden desplazar lentamente a través del suelo o permanecer sobre él o cerca de su superficie, dependiendo de la estructura del suelo. Los compuestos insolubles pueden ser fuertemente absorbidos por las partículas del suelo. Si los compuestos no miscibles con agua migran a través del suelo y alcanzan el nivel freático formarán una capa en la superficie del agua y se extenderán de este modo impactando una mayor área (Scragg, 1999).

2.2. Biotecnología ambiental y biorremediación

De forma similar a muchos procesos industriales, una principal motivación del uso de la biotecnología para la limpieza del medioambiente es el factor económico. Por ejemplo, la biorremediación de suelos contaminados con materiales peligrosos es generalmente más efectiva en relación a su costo que los procesos físicos y químicos convencionales (Tabla 3), brindando enfoques mucho más prácticos para la limpieza del medioambiente.

Adicionalmente, al contrario de los tratamientos fisicoquímicos que principalmente transfieren los contaminantes de una fase a otra (o de ubicación), la biorremediación ofrece una solución terminal para el problema. De hecho la biorremediación es capaz de transformar los contaminantes orgánicos en

compuestos inocuos, eliminando por lo tanto futuros problemas y costos asociados por su simple traslado y permanencia.

Tabla 3. Costos de métodos alternativos para el tratamiento de suelos contaminados con materiales peligrosos.

Método Empleado	Costo Promedio (U.S. \$/m³)	Rango Típico (U.S. \$/m³)
Incineración	975	350-1600
Rellenos, vertederos	350	100-600
Desorción térmica	125	50-200
Lavado de suelos	237	125-350
Biorremediación	95	40-150

Fuente: Evans y Furlong, 2003.

No es por lo tanto sorprendente que en los últimos años la biotecnología ambiental enfocada en los procesos de biorremediación haya ganado un amplio reconocimiento e importancia entre las alternativas para la limpieza de zonas contaminadas con una amplia variedad de residuos peligrosos (Evans y Furlong, 2003).

2.3. Surfactantes, clasificación y principales propiedades

En estos últimos años, se está prestando una creciente atención en el desarrollo y la implementación de tecnologías innovativas enfocadas en la limpieza de zonas contaminadas tanto por metales pesados como por hidrocarburos o derivados del mismo, con especial atención de aquellas de origen biológico. El uso de los surfactantes brinda un nuevo enfoque para el tratamiento de estas zonas, permitiendo por ejemplo elevar los índices de degradación del crudo de petróleo y sus derivados, mejorando por lo tanto la recuperación de este tipo de zonas

afectadas. De este modo, ha sido la industria petrolera la que tradicionalmente ha hecho el mayor uso este tipo de compuestos (Mulligan y Gibbs, 2004).

Un surfactante básicamente es una molécula anfipática que posee tanto una región hidrofóbica como una hidrofílica, cuya principal propiedad es la de disminuir la tensión superficial entre líquidos inmiscibles con el agua, reduciendo por lo tanto la energía requerida para la formación de emulsiones e incrementando en el proceso la solubilidad de las mismas (Navón-Venezia et al., 1995; Mulligan et al., 2004).

Otras de las propiedades típicas y deseables para los diversos usos de un surfactante incluyen asimismo el permitir el incremento de la solubilidad, poder detergente, habilidad humectante y capacidad espumante, así como su concentración micelar crítica (CMC) (Tabla 4).

Tabla 4. Características de surfactantes requeridas para variadas aplicaciones.

Aplicación	Característica
Detergente	Baja CMC*, buena estabilidad frente al pH, biodegradabilidad, espumabilidad.
Emulsificante	Apropiado BHL**, ambientalmente seguro
Remediación ambiental	Baja toxicidad, biodegradabilidad, afinidad por el contaminante
Lubricación	Estabilidad química, facilidad de adsorción a superficies
Flotación Mineral	Adsorción a menas específicas
Recuperación de Petróleo	Formación de microemulsiones y solubilización, facilidad de ruptura de la emulsión luego de la recuperación
Farmacéutica	Biocompatibilidad, baja toxicidad

Fuente: Mulligan y Gibbs, 2004.

*CMC: Concentración Micelar Crítica

**BHL: Balance Hidrofílico – Lipofílico

Los surfactantes se clasifican en catiónicos, aniónicos, zwitteriónicos¹ y no-iónicos (Torren *et al.*, 2001). Pueden ser sintetizados a partir de hidrocarburos, lignosulfonatos o triglicéridos. Las ventas anuales para los surfactantes sintéticos en los Estados Unidos son de aproximadamente \$1.7 billones de dólares, con un crecimiento anual del 3.5% (Mulligan y Gibbs, 2004).

Los principales tipos de surfactantes sintéticos producidos incluyen alquil-becenosulfonatos lineales, sulfatos de alcohol, sulfatos de alcohol éter, gliceril éter sulfonatos de alcohol, α -oleofina sulfonatos, alcohol etoxilatos y alquil-fenol etoxilatos. El sulfato dodecil de sodio (SDS) es un ejemplo de un surfactante aniónico ampliamente empleado por la industria, este surfactante contiene una cadena alifática hidrocarbonada con un grupo sulfato en su extremo (Evans y Furlong, 2003).

Por otra parte, es importante remarcar que la efectividad de todo surfactante está determinada por su habilidad de reducir la tensión superficial, la cual es una medida de la energía libre de la superficie por unidad de área. Por ejemplo un buen surfactante puede reducir la tensión superficial del agua de 72 a 35 mN/m y la tensión interfacial (tensión entre líquidos polares y no-polares) para el agua contra el n-hexadecano de 40 a 1 mN/m. (Muthusamy *et al.*, 2008).

La tensión superficial puede correlacionarse proporcionalmente con la concentración del surfactante en el medio, hasta que la Concentración Miceliar Crítica (CMC) es alcanzada (Figura 1). Los buenos surfactantes para la industria son aquellos que tienen una baja CMC y por lo tanto es necesario una menor cantidad del surfactante para reducir la tensión superficial. De este modo la CMC

¹ Compuesto neutro portador de una carga positiva y una carga negativa, generalmente en átomos no contiguos. Se suelen formar a partir de compuestos cuyas moléculas contienen grupos ácido y grupos base. Presentan propiedades de compuestos iónicos. Llamados también *anfólitos* (Costa, 2005).

puede definirse como la mínima concentración necesaria para la iniciación de la formación de micelas; en la práctica, la CMC también es la máxima concentración permitida de los monómeros del surfactante en agua y la misma es influenciada por el pH, la temperatura y la fuerza iónica del medio. La figura 1 muestra como la CMC junto con otros parámetros varía como función de la concentración del surfactante.

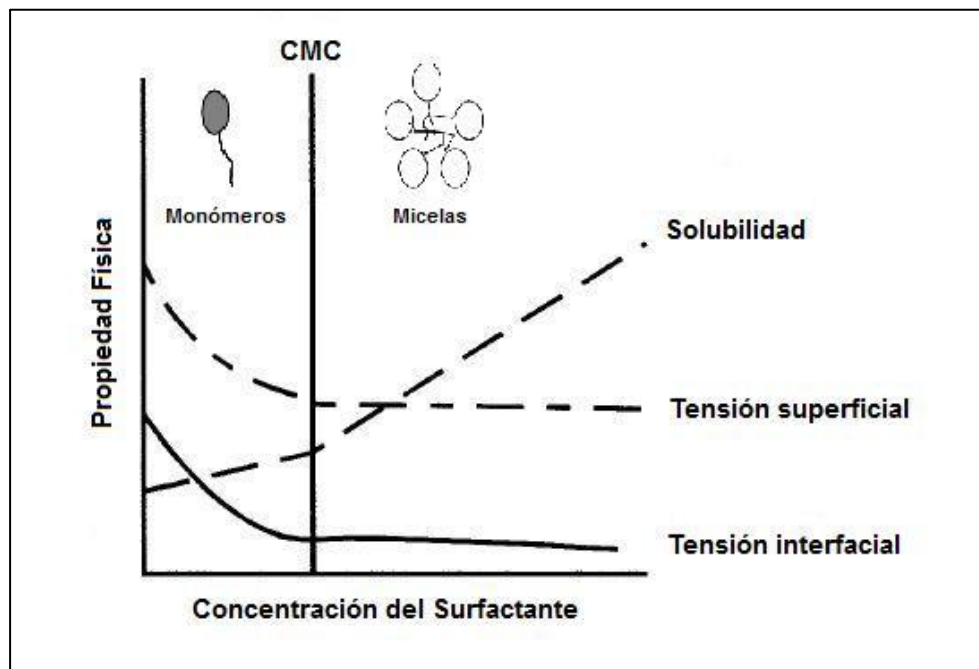


Figura 1. Tensión superficial, tensión interfacial y solubilización como función de la concentración del surfactante (CMC representa la concentración micelar crítica). (Mulligan y Gibbs, 2004).

Aunque tradicionalmente, los surfactantes han sido producidos de forma sintética, existe una amplia variedad de microorganismos que también son capaces de producirlos de forma natural a partir de una gran variedad de sustratos tales como azúcares, aceites, hidrocarburos y residuos industriales (Mulligan y Gibbs, 2004).

Los biosurfactantes dependiendo de su estructura molecular pueden ser agrupados en glicolípidos, lipopéptidos, fosfolípidos, ácidos grasos, lípidos neutros

y compuestos poliméricos y particulados (Tabla 5). La mayoría de estos surfactantes suelen ser aniónicos o neutrales, sólo un pequeño grupo son catiónicos debido a la presencia de grupos amino en sus moléculas.

La parte hidrofóbica de los biosurfactantes suele estar basada en ácidos grasos de largas cadenas, hidroxiácidos grasos o α -alkil- α -hidroxiácidos grasos. En contraparte la porción hidrofílica de la molécula puede ser un carbohidrato, aminoácido, péptido cíclico, fosfato, ácido carboxílico o alcohol. La CMC de estos compuestos generalmente va del rango de 1 a 200 mg/L con masas moleculares de 500 a 1500 daltons (Mulligan y Gibbs, 2004).

Algunos biosurfactantes son producidos a partir de hidrocarburos como sustratos, estando la producción asociada al crecimiento, en estos casos los microorganismos pueden emulsificar el sustrato (extracelular) o facilitar el pasaje del sustrato a través de la membrana. Sin embargo, los biosurfactantes también pueden ser producidos a partir de carbohidratos, los cuales son muy solubles, de modo que de esta forma los biosurfactantes son usualmente metabolitos secundarios producidos durante la parte final de la fase logarítmica y/o durante la fase estacionaria (Mulligan y Gibbs, 2004).

Tabla 5. Tipos y origen microbiano de algunos biosurfactantes.

Clase de Surfactante	Microorganismo
Lípidos de Trehalosa	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> , <i>Mycobacterium spp.</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> .
Ramrólpidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>
Soforólpidos	<i>Candida apicola</i> , <i>Candida bombicola</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida bogoriensis</i>
Lípidos de glucosa, fructosa o sacarosa	<i>Arthrobacter sp.</i> <i>Corynebacterium sp.</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> .
Lípidos de celobiosa	<i>Ustilago maydis</i>
Polio-Lípidos	<i>Rhodotorula glutinus</i> , <i>Rhodotorula graminus</i>
Diglicosil-diglicéridos	<i>Lactobacillus fermentii</i>
Lipopolisacáridos	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Candida lipolytica</i>
Lipopéptidos	<i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Bacillus pumilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Péptidos de ornitina, lisina	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>Streptomyces sioyaensis</i> , <i>Gluconobacter cerinus</i>
Fosfolípidos	<i>Acinetobacter sp.</i>
Sulfonilípidos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>Corynebacterium alkanolyticum</i>
Ácidos grasos (ácidos corynomicólicos, ácidos spiculispóricos, etc.	<i>Capnocytophaga sp.</i> , <i>Penicillium spiculisporum</i> , <i>Corynebacterium lepus</i> , <i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Talaromyces trachyspermus</i> , <i>Nocardia erythropolis</i>

Fuente: Mulligan y Gibbs, 2004.

Las principales razones de la creciente popularidad de estos productos microbianos son: su baja toxicidad, alta biodegradabilidad, acción específica, producción en altos volúmenes a partir de sustratos de bajo costo (Zhang *et al.*, 2005; Mulligan *et al.*, 2004), efectividad frente a temperaturas extremas, pH, así como salinidad. Además sus estructuras únicas y diversas pueden proporcionar nuevas y variadas propiedades útiles en contraste a los surfactantes sintéticos artificiales ya conocidos (Muthusamy *et al.*, 2008; Mohan *et al.*, 2006; Sandrin *et al.*, 2000). Por estas razones se cree que en un futuro podrían reemplazar a los surfactantes sintéticos tradicionalmente usados (Mulligan y Gibbs, 2004).

2.4. Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa*

Los ramnolípidos han sido ampliamente estudiados y cerca de 7 homólogos han sido identificados hasta el momento (Abalos *et al.*, 2001). Tensiones superficiales de 29 mN/m son características de este tipo de compuestos. De ellos, los ramnolípidos producidos pueden contener dos moléculas del azúcar ramnosa unidas al ácido α -hidroxidecanoico (mono-ramnolípidos) o una sola molécula de ramnosa unida a un ácido graso idéntico (di-ramnolípidos) (Figura 2).

Dentro de la enorme variedad de microorganismos productores de estas sustancias, uno de los que mayor potencial aplicativo engloba, son las especies pertenecientes al género *Pseudomonas*, las cuales típicamente producen biosurfactantes de naturaleza glicolípídica llamados ramnolípidos (Mulligan *et al.*, 2004; Toren *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005).

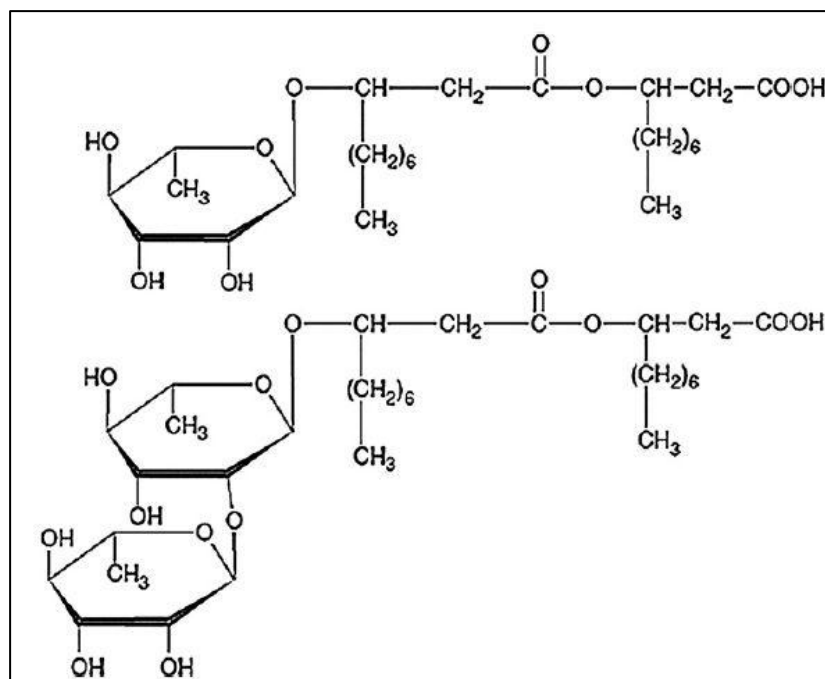


Figura 2. Representación molecular de mono-ramnolípidos (figura superior) y di-ramnolípidos (figura inferior) producidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Fuente: (Lovaglio *et al.*, 2011).

Una comparación de diversos sustratos empleados realizada por Mata-Sandoval *et al.* 2001, muestra que aquellos sustratos hidrofóbicos tales como aceites vegetales, grasas y alcoholes de cadena larga generan altos niveles de producción de ramnolípidos (100-165 mg/g sustrato) en contraste con el uso de sustratos solubles tales como la glucosa y el ácido succínico (12-36 mg/g sustrato). Adicionalmente, el uso de aceites reciclados demuestra un alto potencial, generando niveles de producción de 0.34 g de ramnolípidos por gramo de sustrato (Haba *et al.*, 2000), sustratos como estos que componen residuos industriales y domésticos, pueden conducir a la reducción en los costos totales de la producción de ramnolípidos.

Los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* pueden obtenerse a partir de diversos sustratos de bajo costo que van desde azúcares hasta

hidrocarburos y pueden incluir compuestos tales como alcanos, piruvatos, citratos, fructosa, aceites vegetales, glicerol, glucosa, manitol e incluso mediante el uso de residuos agroindustriales o aceites vegetales reciclados usados como fuentes de carbono (Mulligan y Gibbs, 2004; Guerra-Santos *et al.*, 1984; Mukherjee *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007).

Al igual que el sustrato elegido para la producción de ramnolípidos, la fuente de nitrógeno puede influenciar significativamente la producción. Se ha observado que pueden obtenerse niveles altos de producción si se usan nitratos en lugar de amonios como fuente de nitrógeno, con ratios de carbono y nitrógeno de 3:1 (Guerra-Santos *et al.*, 1984). Las fuentes de fósforo también influyen en la producción de ramnolípidos, niveles limitantes de fosfatos (65 mM de fósforo) proveen mejores resultados que medios con niveles altos (310 mM de fósforo). De igual forma, niveles limitantes de calcio, hierro, potasio, magnesio, sodio y otros elementos traza también producen cantidades elevadas de ramnolípidos (Guerra-Santos *et al.*, 1984; Mulligan y Gibbs, 2004).

Actualmente al margen de los estudios enfocados en la optimización de los medios de producción de ramnolípidos, también se realizan numerosas investigaciones dedicadas a la obtención de nuevas y mejores cepas productoras; Turkovskaya *et al.*, 2001 reportan el aislamiento de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* designada 50.3 a partir de suelos contaminados con hidrocarburos. Esta cepa es capaz de usar glucosa o glicerol como fuentes de carbono, requiere fuerte aireación con un pH de 7 a 8, utiliza NH_4Cl como fuente de nitrógeno y concentraciones de magnesio de 0.005 a 0.02 mg/L para producir un biosurfactante ramnolipídico termoestable que puede ser calentado hasta los 100°C por 100 minutos sin perder su habilidad de reducción de la tensión

superficial, la cual puede reducirse a 23 mN/m, valor más bajo que los reportados para la surfactina (27 mN/m).

De igual forma, Santa Anna *et al.*, 2001 reportan el aislamiento de una nueva cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PA1 aislada en Brazil de suelos cerca de refinerías. Esta cepa crece mejor en medios con glicerol con ratios de C:N:P de 22:8:1, produciendo concentraciones de 1.7 gramos de ramnolípido por litro con niveles de producción de 1.18 g / g de sustrato. Otras fuentes de carbono analizados fueron fructosa, ácido láctico, glucosa, manitol, manosa, hexadecano, parafina y aceites vegetales.

2.5. Principales aplicaciones del uso de los ramnolípidos

La amplia gama de aplicaciones para los biosurfactantes va desde su uso en procesos de biorremediación y tratamiento de aguas residuales, hasta su empleo en programas de control de la contaminación, recuperación mejorada de petróleo, degradación de hidrocarburos y derivados, remediación de suelos y aguas contaminadas con metales pesados, formulación de insecticidas y antifúngicos, empleo en medicina, industrias alimentarias y cosméticas (Toren *et al.*, 2001; Desai *et al.*, 1997; Gunther *et al.*, 2005) y en general, en cualquier industria que tenga que lidiar con sistemas multifásicos (Mulligan *et al.*, 2004).

Dentro de las aplicaciones actuales que se le atribuyen a los ramnolípidos, una de las principales que se pueden encontrar es su potencial uso en procesos de biorremediación (Mulligan *et al.*, 2004). Maier y Soberon-Chavez, 2000, indican que la adición de ramnolípidos puede incrementar la biodegradación de hexadecano, octadecano, n-parafina y fenantreno en sistemas líquidos y hexadecano, tetradecano, creosota y mezclas de hidrocarburos en suelos. Dos mecanismos posibles para este incremento en el nivel de biodegradación pueden

ser: el incremento de la solubilidad del sustrato para las células microbianas y la interacción de los hidrocarburos con la superficie celular, lo cual incrementa la hidrofobicidad de la superficie permitiendo una mejor asociación de los sustratos hidrofóbicos (Shreve *et al.*, 1995; Zhang y Miller, 1992). Beal y Betts, 2000 reportan que la hidrofobicidad de la superficie celular se incrementa en mayor medida en células productoras de biosurfactantes que en aquellas no productoras durante su cultivo con hexadecano. Asimismo los ramnolípidos producidos fueron capaces de incrementar la solubilidad del hexadecano de 1.8 a 22.8 mg/L.

Noordman *et al.*, 2002 estudiaron los efectos los ramnolípidos producidos por una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* sobre la degradación de hexadecano en pruebas de laboratorio sobre suelos. En el caso de estudio empleado se vio que el hexadecano se encontraba atrapado en las partículas del suelo de pequeño tamaño (6 nm) limitando su disponibilidad. Los ramnolípidos empleados permitieron la liberación del hexadecano atrapado en las partículas del suelo y por lo tanto facilitaron su disponibilidad para las células. Este hecho es de gran importancia para la estimulación de la degradación bacteriana bajo condiciones *in situ*.

El uso de surfactantes ramnolípidos es capaz de liberar hasta cerca de 3 veces tanto crudo como el agua sola de las playas de Alaska luego del derrame del Exxon Valdez (Harvey *et al.*, 1990).

Scheibenbogen *et al.*, 1994 reportaron que los ramnolípidos de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* UG2 son capaces de efectivamente remover una mezcla de hidrocarburos de suelos arenosos y que el grado de remoción depende del tipo de hidrocarburo removido y la concentración del biosurfactante. Van Dyke *et al.*, 1993 previamente habían reportado que el ramnolípidos de la misma cepa puede remover, a una concentración de 5 g/L, aproximadamente 10% más hidrocarburos de suelos arenosos que de suelos fangosos, también encontró que

el dodécil sulfato de sodio (SDS) es menos efectivos que los ramnolípidos en remover hidrocarburos.

Deschenes *et al.*, 1994 mostraron que los ramnolípidos de la misma cepa pueden promover la solubilización de PAHs de cuatro anillos más significativamente que PAHs de tres anillos y que los biosurfactantes fueron 5 veces más efectivos que el SDS.

La capacidad del ramnolípidos comercial JBR 425 fue asimismo evaluada en función a su habilidad de remover el pentaclorofenol de suelos usando el surfactante en forma de espuma (Mulligan y Eftekhari, 2001). Cuando la espuma del biosurfactante fue inyectada en el suelo contaminado con 1000 mg /Kg de pentaclorofenol, un 60 y 61 % de remoción fue conseguida de suelos arenosos y fangosos respectivamente. La ventaja del uso del ramnolípidos en forma de espuma radica en el que el fluido puede ser inyectado en el suelo a bajas presiones.

Otro uso reciente de los ramnolípidos es su habilidad como dispersante de mareas negras (Holakoo y Mulligan, 2002). A 25°C y con una salinidad del 35%, una solución del 2% del ramnolípidos diluido en agua de mar y aplicado con un ratio dispersante:crudo de petróleo de 1:2, logro una dispersión inmediata del 65% del crudo de petróleo. La adición de un 60% de etanol y 32% de octanol con un 8% de ramnolípidos aplicados con un ratio dispersante:crudo de petróleo de 1:8 mejoró la dispersión en un 82%.

Por otra parte, su habilidad de unión de los ramnolípidos a iones metálicos específicos, facilita su empleo en procesos de extracción mejorada de metales tales como el cobre a partir de actividades mineras o la remoción de metales pesados tales como el plomo o el cadmio presentes como contaminantes en suelos y aguas (Mulligan *et al.*, 2006; Navón-Venezia *et al.*, 1995; Neilson *et al.*, 2003; Mulligan *et al.*, 2001).

Aunque un 80 a 100% de metales como el cadmio y plomo pueden ser removidos de suelos artificialmente contaminados, en pruebas de campo estos valores se encuentran en el rango del 20 a 80%, puesto que los contenidos de arcilla y óxidos de hierro hallados en suelos pueden afectar la eficiencia de los biosurfactantes (Fraser, 2000).

Los biosurfactantes pueden asimismo ser añadidos en procesos de lavado de suelos. Debido a la propiedad de formar espumas de los biosurfactantes, los complejos de metales-surfactantes formados pueden ser removidos con la adición de aire y la formación de espumas de las cuales luego puede ser recuperado tanto el surfactante como metal (Mulligan y Gibbs, 2004).

También cabe resaltar que debido a su compatibilidad con la piel y su baja irritancia, los ramnolípidos son usados actualmente como aditivos en la industria cosmética por la empresa Iwata Co. de Japón (Maier y Soberon-Chavez, 2000). Ishigami *et al.*, 1988 poseen patentes para el uso de ramnolípidos en liposomas y emulsiones para la industria cosmética. El control de las zoosporas del patógeno de plantas *Ospidium brassicae* fue logrado con la adición de ramnolípidos cuando el patógeno se encontraba en su fase de zoospora donde no posee pared celular (Tomlinson y Faithfull, 1980). Concentraciones del ramnolípidos de 5 a 30 mg/L también han demostrado ser capaces de controlar el desarrollo de los patógenos de plantas *Pythium aphanadermatum*, *Phytophthora capsici* y *Plasmopara lactucae-radicis*, pero aun no a niveles sostenidos (Stanghellini y Miller, 1997). En comparación, la soforosa, los lípidos de trehalosa y la surfactina no mostraron ninguna actividad incluso a concentraciones del 1000 mg/L (Mulligan y Gibbs, 2004).

Finalmente es sumamente importante resaltar que debido a que el uso exitoso de cualquier compuesto en un proceso tecnológico requiere necesariamente del

conocimiento previo de las características propias del mismo (Zhang et al., 1994) y tomando en cuenta que no existen referencias en nuestro país acerca de la producción y empleo de ramnolípidos o de algún otro tipo biosurfactante, este trabajo de investigación se enfocó principalmente en la evaluación de dos de las características claves de este tipo de compuestos (actividad emulsificante y capacidad de remoción de metales pesados), estudio preliminar necesario para su posterior empleo en procesos a mayor escala de biorremediación de ambientes naturales contaminados con metales pesados y/o hidrocarburos.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Los biosurfactantes de naturaleza ramnolípida producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB 25, poseen actividad emulsificante frente a hidrocarburos derivados del petróleo y a su vez son capaces de remover metales pesados presentes en soluciones acuosas.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

- Producir, a nivel de laboratorio, un biosurfactante de naturaleza ramnolípida a partir de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PB 25.

3.2.2. Objetivos específicos

- Evaluar y optimizar la actividad emulsificante de un ramnolípido de *Pseudomonas aeruginosa* PB 25 frente a petróleo crudo, diesel, gasolina y kerosene a valores de pH de 3, 5, 7, 9 y 11.
- Evaluar y optimizar la capacidad de remoción de plomo y cadmio en soluciones acuosas del ramnolípido producido a valores de pH de 3, 5, 7, 9 y 11.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Selección de la cepa bacteriana:

La selección de la cepa bacteriana se empleó el banco de cepas del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, dicho banco contiene cepas aisladas de diversas zonas contaminadas con hidrocarburos.

Se seleccionaron seis cepas del género *Pseudomonas spp.*, las que se reactivaron en 5 mL de caldo nutritivo e incubadas a 36°C por 24 horas. Estas cepas se citan a continuación:

Tabla 6. Cepas bacterianas seleccionadas para el estudio

Cepa Bacteriana	Código de Identificación
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AP

La actividad degradativa de hidrocarburos se comprobó mediante el cultivo de las cepas en el medio mineral según Mills *et al.* (1978) suplementado con crudo de petróleo como única fuente de carbono. Las condiciones de incubación fueron de 25°C en condiciones estáticas a un pH de 7.0 por 5 días.

Comprobada la actividad degradativa de las cepas, se procedió a evaluar la actividad emulsificante de cada una de ellas como criterio de selección para la cepa a utilizar en el estudio. De esta forma se utilizó la metodología empleada por Escalante (2000) para la evaluación de dicha actividad.

4.2. Producción del biosurfactante:

La producción a nivel de laboratorio del biosurfactante se llevó a cabo con el empleo como medio de cultivo del medio mínimo mineral propuesto por Zhang *et al.*, 2005, suplementado con un 3% (p/v) de glicerol como única fuente de carbono y ajustado a un valor de pH de 6.8. La temperatura de incubación fue de 30°C y la totalidad del periodo de producción fue realizada en condiciones estáticas durante 120 horas.

El monitoreo del crecimiento microbiano se realizó con la medición de la biomasa producida mediante la toma de muestras a intervalos regulares (cada 12 horas) para la medición indirecta de la producción de biomasa mediante su densidad óptica a 620 nm, para lo cual previamente se realizó una curva de calibración entre densidad óptica y biomasa seca. El consumo de glicerol se midió con el reactivo de antrona de acuerdo al método descrito por Pons *et al.*, 1981. Finalmente la concentración de ramnolípidos presentes en el medio de cultivo fue igualmente cuantificada a intervalos regulares mediante la determinación colorimétrica de azúcares por el método del orcinol según Wang *et al.*, 2007 y expresadas en valores de ramnolípidos (g/L) de acuerdo a lo indicado por Zhang *et al.*, 2005.

4.3. Extracción y Purificación del Ramnolípidos:

Una vez finalizado el período de incubación respectivo, la extracción de los ramnolípidos se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Wang *et al.*, 2007 con algunas modificaciones. Para este fin, el sobrenadante del medio de cultivo fue separado del paquete celular mediante centrifugación a 5000 rpm durante 30 min, dicho paso fue repetido dos veces. El sobrenadante obtenido de esta manera fue a continuación acidificado hasta alcanzar un pH final de 2.0 con

la adición de HCl concentrado y mantenido a 4°C por toda una noche, los ramnolípidos precipitados de esta manera, se recuperaron mediante centrifugación a 5000 rpm durante 1 hora y finalmente disueltos en agua bidestilada.

Seguidamente dos volúmenes de una mezcla de cloroformo:etanol (2:1, v/v) se añadieron a la solución de ramnolípidos anteriormente obtenida siendo agitada durante 30 min. La fase orgánica obtenida de esta manera fue recolectada y puesta inmediatamente a evaporar, obteniéndose finalmente de esta forma, una sustancia de apariencia oleosa y color miel la cual corresponde a los ramnolípidos ya extraídos. Los ramnolípidos obtenidos fueron luego disueltos en agua bidestilada a las concentraciones necesarias para los ensayos posteriores.

4.4. Actividad Emulsificante del Ramnolípidos

La actividad emulsificante del ramnolípidos fue evaluada de acuerdo a la metodología descrita por Escalante, 2002 con algunas modificaciones, 10 mL de una solución del ramnolípidos al 0.1% (p/v) de concentración, fueron colocadas en tubos de 16 x 150 mm, a los cuales se les agregó 0.2 mL de crudo de Petróleo, proporcionado por la refinería "La Pampilla" (Repsol, Lima-Perú). Esta mezcla fue luego agitada manualmente durante 5 min para favorecer la formación de una emulsión, luego de lo cual 5 mL de la misma fueron transvasados a tubos de espectrofotómetro (Spectronic 20D, Milton Roy) para su lectura a 540 nm. Finalmente la absorbancia leída fue convertida a Unidades de Actividad Emulsificante por mL (UAE/mL), siendo 0.816 el equivalente de absorbancia para una Unidad de Actividad Emulsificante por mL.

La estabilidad de las emulsiones generadas por los ramnolípidos se analizó por medio del Índice de Emulsificación E24, de acuerdo a la metodología descrita por

Abouseoud *et al.*, 2008, de este modo un volumen determinado del ramnolípido estéril (2 mL) se adicionó a un tubo de ensayo que contuvo un volumen también determinado (2 mL) de la sustancia a emulsificar (crudo de petróleo). Posteriormente el contenido de los tubos fue agitado con la ayuda de un vortéx por 2 min y luego puesto en reposo por 24 horas. Finalmente el índice de emulsificación (E24) se obtuvo de la división del tamaño en milímetros de la emulsión generada entre el total de la altura en milímetros de la mezcla multiplicada por 100. Los ensayos de E24 fueron probados también empleando Diesel, Gasolina de 84 octanos y Kerosene.

4.5. Evaluación de las Condiciones del Medio en la Actividad Emulsificante

Con la finalidad de constatar la influencia de las condiciones del medio en la actividad emulsificante del ramnolípido producido, se introdujeron una serie de variaciones en cada uno de los procedimientos anteriormente descritos, variaciones tales como la concentración del biosurfactante y los valores de pH del medio a utilizar.

De esta forma, se repitió el ensayo anterior con concentraciones crecientes del ramnolípido de 0.01% y 1% (p/v). Una vez determinada la concentración que generó el mayor valor tanto de Actividad Emulsificante como del Índice E24 frente al crudo de petróleo, se repitieron los ensayos esta vez con diferentes valores del pH, con la finalidad de ver el efecto de tal variación en la Actividad Emulsificante del ramnolípido a la concentración anteriormente elegida, los valores de pH a probar fueron: 3, 5, 7, 9 y 11.

De igual forma cada una de las pruebas anteriormente descritas se repitió para cada uno de los derivados del petróleo a emulsificar: Petróleo Diesel 2, Gasolina de 84 octanos y Kerosene.

4.6. Enfrentamiento del Ramnolípido con los Metales Pesados

Se diseñaron una serie de ensayos con la finalidad de evaluar la habilidad de unión de los ramnolípidos a metales pesados. Para el enfrentamiento entre estas dos sustancias, se utilizaron concentraciones de 1000 ppm de Plomo y 500 ppm de Cadmio, en la forma de las siguientes sales: $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y $3(\text{CdSO}_4) \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ disueltas apropiadamente en agua bidestilada.

Inicialmente, se prepararon soluciones de cada uno de los metales a probar y del ramnolípido hasta obtener 50 mL de cada uno de los metales pesados a las concentraciones anteriormente descritas y de una concentración del 0.1% (p/v) del ramnolípido para cada caso. Posteriormente, dicha mezcla fue agitada durante 60 min a 120 rpm a temperatura ambiental para permitir la interacción entre las moléculas del ramnolípido y los iones metálicos. Luego del período de agitación la mezcla fue filtrada con el uso de filtros de 0.2 μm luego de lo cual cada muestra resultante fue enviada a analizar por espectroscopía de absorción atómica, en la unidad de servicios de análisis químicos (USAQ) de la Facultad de Química de la UNMSM, con el fin de determinar la concentración final del metal removido en cada muestra.

4.7. Evaluación de las Condiciones del medio en la Captación del metal

Con el objetivo de analizar la influencia de la concentración del biosurfactante y los valores de pH, se realizaron variaciones en dichos factores del esquema anteriormente descrito. El ensayo fue nuevamente realizado esta vez con concentraciones del ramnolípido del 0.01%. Una vez determinada la concentración del ramnolípido que obtuvo el mayor valor de remoción de metales, se realizaron variaciones en el pH del medio con la finalidad de ver el efecto de tal variante en la tasa de remoción de metales con la concentración del

biosurfactante anteriormente elegida, los valores de pH probar fueron: 3, 5, 7, 9 y 11.

4.8. Análisis de datos

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado para poder presentar valores promedio resultantes por cada experiencia realizada. Los datos obtenidos se analizaron con el uso del software estadístico SPSS 17.0 con la finalidad de determinar su tipo de distribución y analizar la existencia de diferencias significativas entre los valores de los resultados obtenidos (asumiendo un valor de $p < 0.05$) para las pruebas de actividad emulsificante y remoción de metales pesados.

5. RESULTADOS

5.1. Selección de la cepa bacteriana

Las cepas bacterianas elegidas para evaluar su actividad emulsificante presentaron un crecimiento evidenciable en el medio Mills suplementado con crudo de petróleo, dicha afirmación se sustenta en la turbidez indicativa del crecimiento bacteriano en dicho medio.

Asimismo, una vez comprobada la capacidad de degradar hidrocarburos, se evaluó la actividad emulsificante de cada una de las cepas frente a crudo de petróleo obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 7. Cepas bacterianas seleccionadas para el estudio

Cepa Bacteriana	Código de Identificación	Actividad Emulsificante (UAE/mL)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MP	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66	0.2071
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	0.5343
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74	0.1752
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KT	0.5711
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AP	-

De acuerdo a los resultados obtenidos, se decidió utilizar a la cepa *Pseudomonas aeruginosa* 25 para el resto del estudio, recodificándola como *Pseudomonas aeruginosa* PB 25

5.2. Producción del ramnolípido

Luego de un periodo de incubación total de 120 horas en condiciones estáticas a una temperatura ambiental promedio de 25°C, se obtuvo la curva de crecimiento correspondiente en la cual se refleja la cinética de producción de ramnolípidos producidos y el consumo de glicerol (Figura 3).

Se logró determinar la velocidad específica de crecimiento (μ) de 0,0351 h⁻¹ y un tiempo de duplicación (t_d) equivalente a 19,75 horas.

La concentración máxima de ramnolípidos en el medio de cultivo de 2.47 g/L correspondientes a un rendimiento total ($Y_{x/s}$) de 0.13 gramos de ramnolípido por gramo de glicerol y a una productividad volumétrica (Q) de 0.082 gramos de ramnolípido por hora y por litro de medio de cultivo (Tabla 12).

5.3. Evaluación de la actividad emulsificante

Los resultados de la pruebas para la evaluación de la actividad emulsificante se muestran en las Tablas 13 y 14, donde pueden observarse valores máximos de actividad emulsificante de 3.003 UAE/mL y del índice de emulsificación E24 de 47 % para el uso de concentraciones del 1% (p/v) del biosurfactante sobre petróleo crudo, motivo por el cual se eligió a esta concentración para el resto de pruebas.

Asimismo, es posible observar que el aumento del valor de pH del medio generó igualmente un aumento en los índices de emulsificación E24 obtenidos frente a los hidrocarburos analizados (Tabla 15).

5.4. Evaluación de la unión a metales pesados

Los resultados de las pruebas para la evaluación de la capacidad de remoción de metales pesados en solución, muestran que valores elevados se obtienen con el uso de concentraciones del 0.1% p/v (Tabla 16), motivo por el cual se utilizó esta concentración para las pruebas siguientes.

Asimismo, es posible observar que las variaciones en el pH de la solución del metal favorecen la capacidad de remoción por parte del ramnolípido, consiguiéndose un valor máximo del 98% para el plomo a pH 9 y del 99% para el cadmio a pH 11 (Tabla 17).

Se empleó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks para comprobar la normalidad de la distribución de los datos obtenidos (Tablas 8).

Tabla 8. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para los datos obtenidos de remoción de plomo por los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB 25 ($p < 0.05$).

Prueba de Shapiro-Wilk				
	pH	Statistic	df	Sig.
Remoción de Plomo	3	,997	3	,896
	5	,930	3	,490
	7	,998	3	,918
	9	,839	3	,212
	11	,989	3	,797

Al obtener en todos los casos valores por encima del $p < 0.05$, se comprobó la normalidad de la distribución de datos, por lo cual se procedió a emplear el prueba de Levene (Tabla 9) para comprobar la homogeneidad de las varianzas de los

datos obtenidos de remoción de metales por cada pH analizado, segundo paso crucial de verificación antes de realizar la prueba de ANOVA.

Tabla 9. Prueba de Homogeneidad de Levene para las varianzas de los datos obtenidos de remoción de plomo por los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB 25 ($p < 0.05$).

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
2,242	4	10	,137

La prueba de Levene demostró la homogeneidad de las varianzas de los datos obtenidos, por lo cual se procedió al empleo de la prueba de ANOVA (Tabla 10).

Tabla 10. Prueba de ANOVA para los datos obtenidos de remoción de plomo por los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB 25 ($p < 0.05$).

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,107	4	,027	67,250	,000
Within Groups	,004	10	,000		
Total	,111	14			

Al obtenerse un nivel de significancia por debajo del valor asumido ($p < 0.05$) se confirma que existen diferencias significativas entre los niveles remoción de metales frente a los valores de pH ensayados, por lo cual se utilizó la prueba posterior de Scheffe para determinar en qué casos se dan estas diferencias (Tabla 11).

Tabla 11. Prueba post-análisis de Scheffe para los datos obtenidos de remoción de plomo por los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB 25 ($p < 0.05$).

(I) pH	Prueba de Scheffe				
	(J) pH				
	3	5	7	9	11
3		,000	,000	,000	,000
5	,000		,285	,001	,003
7	,000	,285		,025	,093
9	,000	,001	,025		,915
11	,000	,003	,093	,915	

Finalmente, la prueba de Scheffe demuestra que entre valores de pH de:

- 3 y el resto de valores (5, 7, 9 y 11): existen diferencias significativas.
- 5 y 7: no hay diferencias significativas.
- 5 y 9 - 11: existen diferencias significativas
- 7-9-11: no hay diferencias significativas

Estos resultados permiten interpretar que no existen diferencias significativas en la eficacia del uso del ramnolípidos para valores de pH en el rango de 7 a 11 debido a que estadísticamente se va a obtener la misma eficacia. Pero a valores de pH menores a 5 se empieza a apreciar una diferencia significativa en la capacidad de remoción.

Las pruebas anteriormente empleadas se realizaron de la misma forma para los resultados de remoción de cadmio, obteniéndose los mismos resultados al igual que con los resultados obtenidos de la actividad emulsificante del ramnolípidos.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1. Producción del biosurfactante

La alta producción de biosurfactantes es un rasgo característico que se obtiene sólo bajo ciertas condiciones que dependen principalmente de factores tanto nutricionales como ambientales. De esta forma, si bien los valores obtenidos con respecto a la velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo generacional (t_g) son muy bajos en comparación a los valores usuales para cualquier microorganismo y a los obtenidos por otros autores (Zhang *et al.*, 2005; Mulligan *et al.*, 2004), hay que tomar en cuenta que este hecho se debe principalmente a la diferencia en cuanto a las condiciones de incubación y concretamente al hecho de la falta de agitación durante la misma.

Aun así, es alentador observar que los niveles de producción de los ramnolípidos por la cepa empleada en este estudio, son bastante acordes e incluso superiores a los obtenidos por otros autores que también emplearon una agitación constante durante el cultivo del mismo género microbiano (Guerra-Santos *et al.*, 1984; Mulligan *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2005) lo cual hace prever que futuros cultivos con el uso de agitación producirán valores mucho más elevados de producción de ramnolípidos con el uso de la cepa presentada en este estudio.

6.2. Actividad emulsificante y capacidad de remoción de metales

Con respecto a la actividad emulsificante de los ramnolípidos frente a los hidrocarburos empleados y su capacidad de unión a los iones de metales pesados, debe señalarse que estas dos propiedades de este compuesto

microbiano se ven muy influenciadas principalmente por dos factores: la concentración de surfactante en el medio y el valor del pH.

La concentración del surfactante se relaciona directamente con la formación de micelas en el medio lo cual facilita los fenómenos de emulsificación y de unión a iones metálicos, pero más importante aún, el efecto generado por el pH del medio parece ejercer un papel mucho más importante, ligado al grado de ionización de la porción carboxílica de la molécula del ramnolípido (Mulligan *et al.*, 2004).

Tal como lo describen diversos autores, el incremento del pH favorece la ionización de la porción carboxílica de la molécula del ramnolípido (RCOO⁻) en la solución. Esto a su vez mejora su solubilidad en el agua incrementando la actividad emulsificante y brindando más sitios de unión para los cationes metálicos sobre el biosurfactante, conduciendo a un incremento en la solubilidad de los hidrocarburos y de los metales que a su vez quedan atrapados en el interior de sus micelas (Juwarkar *et al.*, 2007; Neilson *et al.*, 2003).

Asimismo, ha sido demostrado anteriormente que la tensión superficial puede ser reducida aún más por un incremento del pH en el caso de este tipo particular de surfactantes, debido a fenómenos similares a los explicados anteriormente. De esta forma tenemos que el tamaño de los agregados del ramnolípido son dependiente del pH, es así que las estructuras predominantes son pequeñas vesículas y micelas a pH mayores a 6.0, lo cual favorece el incremento de la solubilidad de cualquier sustancia hidrofóbica presente, como fue el caso de los hidrocarburos analizados. Razones que a su vez explicarían el aumento de la actividad emulsificante por parte del ramnolípido a valores acordes e incluso mayores a los obtenidos por otros autores (Escalante, 2002).

De igual forma este hecho explicaría el porqué del aumento de la capacidad de remoción tanto del plomo como del cadmio a pH alcalinos y por otra parte también

explicaría las razones por las cuales se obtuvieron valores nulos o bajos con los pH bajos probados, puesto que a tales valores es muy probable que se produzca la ruptura de la molécula del ramnolípido, con la consecuente pérdida inmediata de sus propiedades (Ochoa-Loza *et al.*, 2001), tal como pudo observarse en los ensayos de la actividad emulsificante o el índice de emulsión sobre los hidrocarburos analizados.

Sin embargo, también debe de tenerse en cuenta que puede ser factible que algunas de las micelas formadas durante los ensayos de enfrentamiento a pH ácidos hayan logrado unirse a iones metálicos produciendo su precipitación en el medio, lo cual explicaría los valores elevados de remoción de metales pesados a valores de pH altos.

Por otra parte es importante remarcar que la estabilización y movilización de los metales depende de varios factores, como son las constantes de estabilidad de unión entre los metales y el ramnolípido. Dichas constantes de estabilidad según algunos autores siguen el orden de $Pb > Cd$ para el surfactante utilizado (Ochoa-Loza *et al.*, 2001), valores que si bien no reflejan lo observado en el análisis realizado, puede que si se lleguen a mostrar en sistemas con la presencia simultánea de estos dos iones.

Finalmente cabe decir, que el potencial de estas moléculas como agentes a usar en procesos de biorremediación es considerablemente alto tomando en cuenta las diversas ventajas que poseen frente a los comúnmente usados surfactantes sintéticos, debido entre otras cosas a su baja toxicidad y alta biodegradabilidad. Sin embargo, es ampliamente conocido que el pH óptimo obtenido para la emulsificación de hidrocarburos y la remoción de metales pesados, puede no ser necesariamente el óptimo para el crecimiento microbiano y por consiguiente

afectar en alguna medida la degradación de los hidrocarburos o la estabilización de los metales pesados presentes en el medio ambiente (Youssef *et al.*, 2007).

El uso potencial en este tipo de procesos es aún relevante, especialmente en lugares con casos de contaminación cruzada de elementos tanto orgánicos como metálicos; estudios previos han demostrado que la biodegradación microbiana de contaminantes orgánicos es a menudo severamente inhibida por la presencia de metales tóxicos, tales como el cadmio o el plomo (Sandrin *et al.*, 2000; Neilson *et al.*, 2003). En estas situaciones, el empleo de surfactantes como los ramnolípidos podrían ayudar a reducir las concentraciones de los metales tóxicos uniéndose selectivamente a estos metales y a su vez incrementar la biodisponibilidad de los compuestos orgánicos hidrofóbicos, permitiendo por consiguiente mejorar y estimular los procesos de biorremediación de estas zonas, aún a pesar de no ser aplicados en sus condiciones óptimas de funcionamiento.

7. CONCLUSIONES

- ❖ Se consiguió producir ramnolípidos a partir glicerol como fuente de carbono por una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PB 25.
- ❖ Se comprobó la capacidad de generar emulsiones de hidrocarburos con el uso de soluciones puras del ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB 25, con valores óptimos de actividad para valores de pH iguales a 9.
- ❖ La capacidad de remoción de metales pesados con el empleo del ramnolípidos se vio favorecida por valores de pH alcalinos, alcanzando un valor óptimo a pH igual a 9.
- ❖ Tanto para la evaluación de la actividad emulsificante y la capacidad de remoción de metales pesados, no se observaron diferencias significativas para valores de pH entre 9 y 11.
- ❖ Las propiedades demostradas para el surfactante descrito sugieren su posible empleo en procesos de biorremediación.

8. RECOMENDACIONES

- ❖ Para comprender en mayor detalle las propiedades del surfactante evaluado, es necesaria la caracterización química y molecular detallada del compuesto a emplear.
- ❖ Optimizar los factores que afectan los niveles de producción del ramnolípido, así como buscar nuevos sustratos de bajo costo y accesibilidad deben ser tareas igualmente primordiales para el futuro empleo a escala industrial de este tipo particular de biosurfactante.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABALOS, A.; PINASO, A.; INFANTE, M.R.; CASALS, M.; GARCIA, F. and MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*. 2001. vol. 17, p. 1367-1371.
- [2] ABOUSEOUD, M., MAACHI, R., AMARANE, A., BOUDERGUA, S. and NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*. 2008, vol. 223, p. 143-151.
- [3] ALVAREZ, PEDRO and ILLMAN, Walter. *Bioremediation and Natural attenuation: Process Fundamentals and Mathematical Models*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2006.
- [4] ATLAS, R.M., BARTHA, R. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. Traducido por Alfonso Corzo, Joaquina Gabarrón, Ambrosio García, Arantzazu Gorostiza, Marta Montolio, y Carmina Rodríguez; Editor: Isabel Capella. 2da ed. en español. Madrid: Pearson Educación S.A., 2002. (Traducido de *Microbial Ecology. Fundamentals and Applications*).
- [5] BEAL, R. and BETTS, W. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Biotechnology*. 2000. Vol. 89, p. 158-168.
- [6] CAÑIZARES, ROSA. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2000, vol. 42, p. 131-143.
- [7] COSTA, J. M. *Diccionario de Química Física*. p. 635. Díaz de Santos Ediciones, 2005. España.
- [8] DESAI, JITENDRA and BANAT, IBRAHIM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1997, vol. 61, p. 47-64.

- [9] DESCHENES, L.; LAFRANCE, P.; VILLENEUVE, J-P and SAMSON, R. "The impact of a biological and chemical anionic surfactants on the biodegradation and solubilization of PAHs in a creosote contaminated soil". Presented at the *Fourth Annual Symposium on Groundwater and Soil Remediation*, Calgary, Alberta, Canada, 21-23 September 1994.
- [10] ESCALANTE GUZMÁN, ROCÍO. "Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios". Tesis Grado de Magister en Biotecnología. UNMSM, E.A.P. Farmacia y Bioquímica, Lima, 2002.
- [11] EVANS, GARETH and FURLONG, JUDITH. *Environmental Biotechnology: Theory and Application*. England: John Wiley & Sons Ltd., 2003. p. 302.
- [12] FRASER, L. Innovations: Lipid lather removes metals. *Environmental Health Perspectives*. 2000, vol. 108, p. 320.
- [13] GOLDMAN, S., SHABTAI, C., RUBINOVITZ, E., ROSENBERG, E. AND GUTNICK, D.L. Emulsan in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1: distribution of cell-free and cell-associated cross-reacting material. *Applied and Environmental Microbiology*. 1987, vol. 44, p.165-170.
- [14] GUERRA-SANTOS, LUIS, KAPPELI, OTHMAR and FIECHTER, ARMIN. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Applied and Environmental Microbiology*. 1984, vol. 48, p.301-305.
- [15] GUNTHER, NEREUS, NUÑEZ, ALBERTO, FETT, WILLIAM and SOLAIMAN, DANIEL. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chloraphis*, a nonpathogenic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, vol. 71, p.2288-2293.
- [16] HABA, E.; ESPUNY, M.; BUSQUETS, M. and MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipis by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *Journal of Applied Microbiology*. 2000, vol. 88, p. 379-387.

- [17] HARVEY, S.; ELASHI, I.; VALDES, J.; KAMELY, D. and CHAKRABARTY, A. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. *Biology and Technology*. 1990, vol. 8, p. 228-230.
- [18] HOLAKOO, L. and MULLIGAN, C. "On the capability of rhamnolipids for oil spill control of surface water". Presented at *Annual Conference of Canadian Society of Civil Engineering*, Montreal, Canada, 5-8 June 2002.
- [19] ISHIGAMI, Y.; GAMA, Y.; HAGAHARA, H.; MOTOMIYA, T. and YAMAGUCHI, M. *Liposome containing rhamnolipids*. Japanese Patent Kokai 63-182,029. 1988.
- [20] JUWARKAR, ASHA, NAIR, ANUPA, DUBEY, KIRTI, SINGH, S. and DEVOTTA, SUKUMAR. Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. *Chemosphere*. 2007, vol. 68, p.1996-2002.
- [21] KREPSKY, N., DA SILVA, F.S., FONTANA, L.F. and CRAPEZ, MAC. Alternative methodology for isolation of biosurfactant-producing bacteria. *Brazilian Journal of Biology*. 2007, vol. 67, p.117-124.
- [22] KURNIAWAN, TONNI, CHAN, GILBERT, LO, WAI-HUNG and BABEL, SANDHYA. Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals. *Chemical Engineering Journal*. 2006, vol. 118, p. 83-98.
- [23] LOVAGLIO, ROBERTA, DOS SANTOS, FRANCISCO, JAFELICCI, MIGUEL y CONTIERO, JONAS. Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011, vol. 85, p. 301-305.
- [24] MAIER, R. and SOBERON-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000, vol. 54, p. 625-633.
- [25] MAKKAR, RANDHIR and ROCKNE, KARL. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactans in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2003, vol. 22, p.2280-2292.

- [26] MATA-SANDOVAL, J.C.; KARNIS, J. and TORRENTS, A. Effects of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* UG2. *Microbial Research*. 2001, vol. 155, p. 249-256.
- [27] MINISTERIO DE ENERGÍA Y MINAS. *Boletín Mensual de Minería, MEM*. Lima, Perú. Noviembre del 2011. Disponible en: <<http://www.minem.gob.pe/publicacion.php?idSector=1&idPublicacion=277> >.
- [28] MOHAN, PRASANNA, NAKHLA, GEORGE and YANFUL, ERNEST. Biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. *Journal of Environmental Engineering*. 2006, vol. 132, p. 279-283.
- [29] MUKHERJEE, SOUMEN, DAS, PALASHPRIYA and SEN, RAMKRISHNA. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*. 2006, vol. 24, p.509-515.
- [30] MULLIGAN, C. and EFTEKHARI, F. Remediation of soil with surfactants in the form of foam and liquid solutions. In *Geoenvironmental Impact Management*, 2001, p. 210-215 eds R.N. Young and H.R. Thomas.
- [31] MULLIGAN, C.N., YONG, R.N. and GIBBS, B.F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*. 2001, vol. 60, p. 371-380.
- [32] MULLIGAN, CATHERINE and GIBBS, BERNARD. Types, production and applications of biosurfactants. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. 2004, vol. 70, p. 31 - 55.
- [33] MULLIGAN, CATHERINE and WANG, SUILING. Remediation of a heavy metal-contaminated soil by a rhamnolipid foam. *Engineering Geology*. 2006, vol. 85, p.75-81.
- [34] MUTHUSAMY, K., GOPALAKRISHNAN, S., RAVI, T. and SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Current Science*. 2008, vol. 94, p.736 - 747.
- [35] NAVÓN-VENEZIA, S., ZOSIM, Z., GOTTLIEB, A., LEGMANN, R., CARMELI, S., RON, E. and ROSENBERG, E. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter*

- radioresistens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995, vol. 61, p.3240-3244.
- [36] NEILSON, JULIA, ARTIOLA, JANICK and MAIER, RAINA. Characterization of lead removal from contaminated soils by nontoxic soil-washing agents. *Journal of Environmental Quality*. 2003, vol. 32, p.899 - 908.
- [37] NOORDMAN, W.; WATCHER, J.; DE BOER, G. and JANSSEN, D. The enhancement by biosurfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. *Journal of Biotechnology*. 2002, vol. 94, p. 195 - 212.
- [38] OCHOA-LOZA, FRANCISCO, ARTIOLA, JANICK and MAIER, RAINA. Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant. *Journal of Environmental Quality*. 2001, vol. 30, p.479 - 485.
- [39] PONS, A., ROCA, P., AGUILO, C., GARCIA, F., ALEMANY, M. y PALOU, A. 1981. A method for the simultaneous determination of total carbohydrate and glycerol in biological samples with the anthrone reagent. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 4: 227- 231.
- [40] SANDRIN, TODD, CHECH, ANDREA and MAIER, RAINA. A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, vol. 66, p.4585 - 4588.
- [41] SANTA ANNA, L.; SEBASTIAN, G.; PEREIRA, J.; ALVES, T.; MENZES, E. and FREIRE, D. Production of biosurfactant from a new and promising strain *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2001, vol. 91, p. 459 - 467.
- [42] SCHEIBENBOGEN, K.; ZYTNER, R.; LEE, H. and TREVORS, J. Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 1994, vol. 59, p.53 - 59.

- [43] SCRAGG, ALAN. *Bioteología medioambiental*. Traducido por José J. Pueyo. 1ra ed. en español. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A., 1999. (Traducido de *Environmental Biotechnology*).
- [44] SHREVE, G. S., INGUVA, S. and GUNNAN, S. Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1995, vol. 4, p. 331 - 337.
- [45] STANGHELLINI, M. and MILLER, R. Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. *Plant Disease*. 1997, vol. 81, p. 4 -12.
- [46] TOMLINSON, J. and FAITHFULL, E. Effects of fungicides and surfactants on the zoospores of *Oplidium brassicae*. *Annals of Applied Biology*. 1980, vol. 93, p. 13 - 19.
- [47] TOREN, AMIR, NAVON-VENEZIA, SHIRI, RON, ELIORA and ROSENBERG, EUGENE. Emulsifying activities of purified alasin proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, vol. 67, p.1102 - 1106.
- [48] TURKOVSKAYA, O.; DMITREIVA, T. and MURATOVA, A. A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Journal of Applied Microbiology*. 2001, vol. 37, p. 71-75.
- [49] VAN DYKE, M.; COUTURE, P.; BRAUER, M.; LEE, H. and TREVORS, J. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Canadian Journal of Microbiology*. 1993, vol. 39, p. 1071 - 1078.
- [50] WANG, QINHONG, FANG, XIANGDONG, BAI, BAOJUN, LIANG, XIAOLIN, SHULER, PATRICK, GODDARD III, WILLIAM and TANG, YONGCHUN. Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007, vol. 98, p.842 - 853.

- [51] YOUSSEF, NOHA, NGUYEN, THU, SABATINI, DAVID and MC INERNEY, MICHAEL. Basis for formulating biosurfactant mixtures to achieve ultra low interfacial tension values against hydrocarbons. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2007, vol. 34, p.497 - 507.
- [52] ZHANG, GUO-LIANG, WU, YUE-TING, QIAN, XIN-PING and MENG, QIN. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*. 2005, vol. 6B, p.725 - 730.
- [53] ZHANG, YIMIN and MILLER, RAINA. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994, vol. 60, p.2101 - 2106.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 12. Valores de producción de ramnolípidos obtenidos.

Cepa	Sustrato	Concentración (g/L)	Rendimiento (g/g)	Productividad (g/L-h)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB 25	30 g/L Glicerol	2.47	0.13	0.082

Tabla 13. Efecto de los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB 25 sobre la Actividad emulsificante (UAE/mL) y el Índice de emulsión E24 (%) sobre petróleo crudo y frente a variaciones en la concentración del biosurfactante (valor de pH=7; los valores mostrados representan el promedio de tres pruebas independientes).

Concentración de Ramnolípidos (% p/v)	Actividad Emulsificante (UAE / mL)	Índice de Emulsificación E24 (%)
0.01	0.907	15
0.1	1.470	40
1	3.003	47

Tabla 14. Efecto del pH sobre la Actividad emulsificante (UAE/mL) sobre petróleo crudo frente a variaciones en los valores del pH del medio (concentración del ramnolípidos del 1% p/v; los valores mostrados representan el promedio de tres pruebas independientes).

Sustrato (Petróleo crudo) (UAE/mL)	pH del medio (ramnolípidos al 1% p/v)				
	3	5	7	9	11
	0.043	1.283	3.003	4.453	5.257

Tabla 15. Índice de emulsión E24 (%) sobre hidrocarburos por ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB25 frente a variaciones en los valores del pH del medio (concentración del ramnolípidos igual al 1% p/v; los valores mostrados representan el promedio de tres pruebas independientes).

Sustrato	pH del medio (ramnolípidos al 1% p/v)				
	3	5	7	9	11
Petróleo crudo	0%	43%	47%	53%	54%
Petróleo Diesel 2	0%	51%	58%	64%	63%
Gasolina 84 octanos	0%	40%	52%	62%	59%
Kerosene	0%	50%	75%	84%	79%

Tabla 16. Porcentaje de remoción (%) de metales pesados frente a diferentes concentraciones del biosurfactante producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB25 (pH del medio = 7; los valores mostrados representan el promedio de tres pruebas independientes).

Concentración de Ramnolípidos (% p/v)	Plomo (1000 ppm)	Cadmio (500 ppm)
0.01	37%	19%
0.1	91%	75%

Tabla 17. Porcentaje de remoción (%) de metales pesados por ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB25, frente a variaciones del pH del medio (los valores mostrados representan el promedio de tres pruebas independientes).

Metal Pesado	pH del medio (ramnolípidos al 1% p/v)				
	3	5	7	9	11
Plomo (1000 ppm)	75%	88%	91%	98%	97%
Cadmio (1000 ppm)	46%	64%	75%	90%	99%

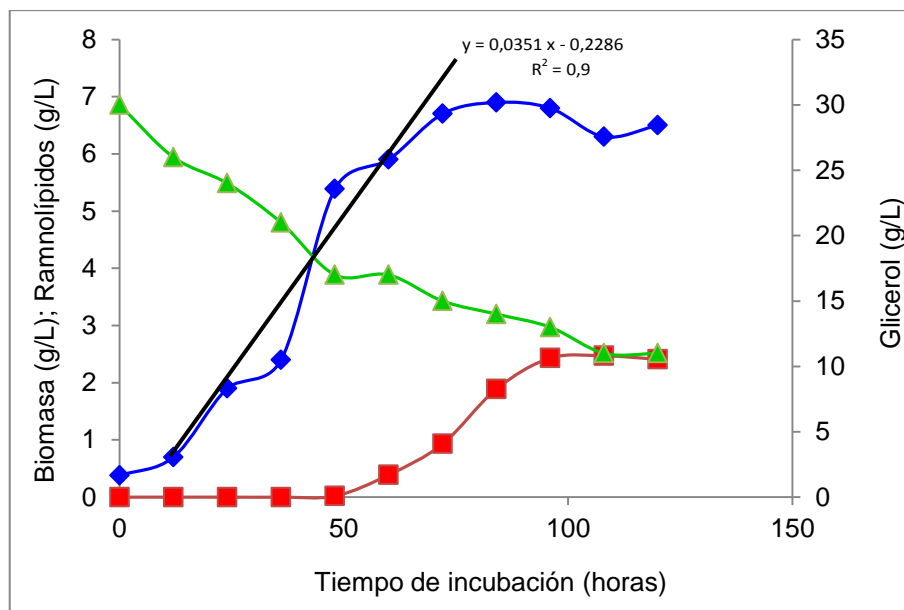


Figura 3. Patrones de crecimiento microbiano de *Pseudomonas aeruginosa* PB25 (♦), producción del ramnolípidos (■) y consumo de glicerol (▲) durante su cultivo en un medio mínimo mineral suplementado con 30 g/L de glicerol (los valores mostrados representan el promedio de tres pruebas independientes realizadas).

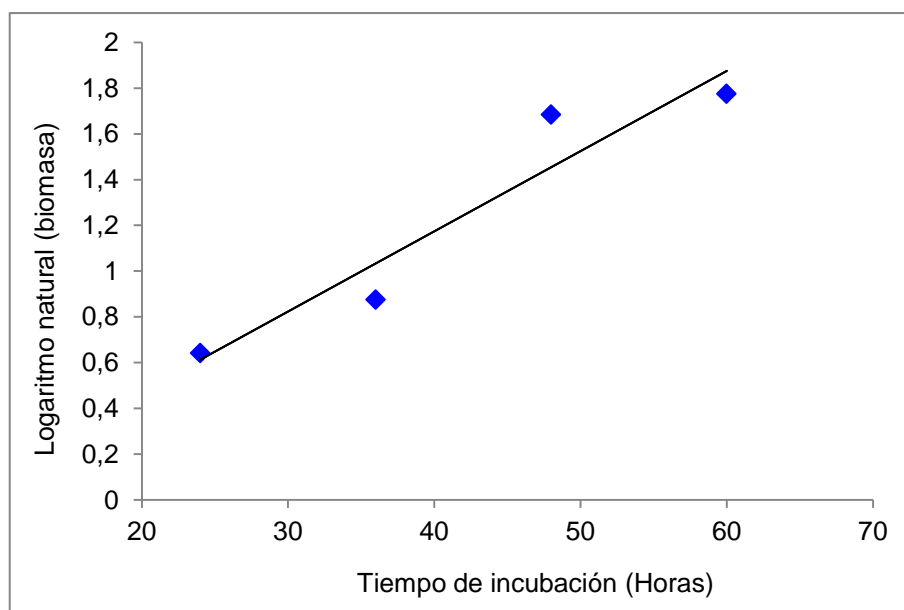


Figura 4. Regresión lineal correspondiente a la fase de crecimiento exponencial de *Pseudomonas aeruginosa* PB 25; los valores mostrados corresponden al promedio de tres pruebas independientes realizadas ($y=0,0351x+0,2286$; $r^2=0.9$).

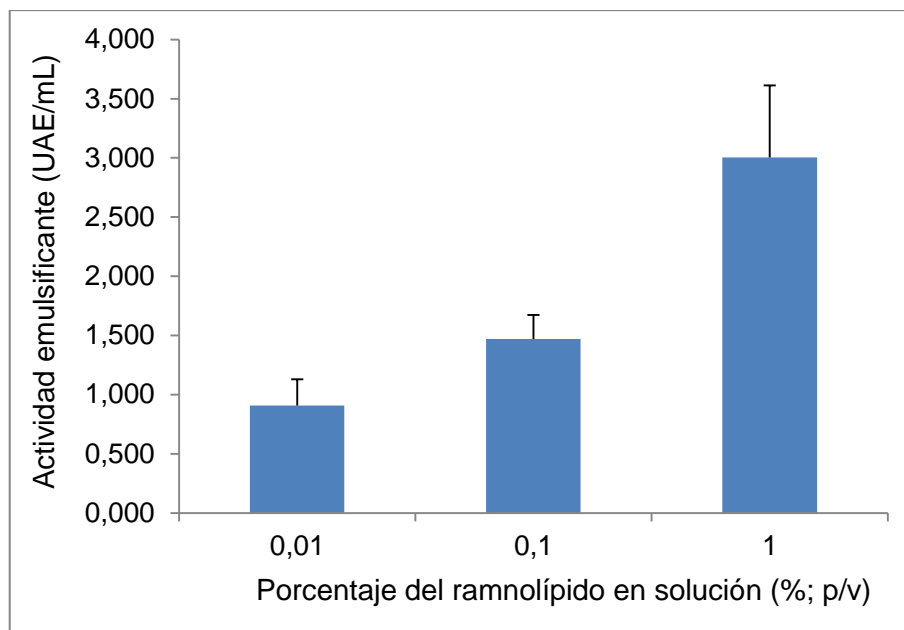


Figura 5. Actividad emulsificante (UAE/mL) de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB25, sobre petróleo crudo frente a variaciones en las concentraciones del ramnolípido (pH del medio igual a 7).

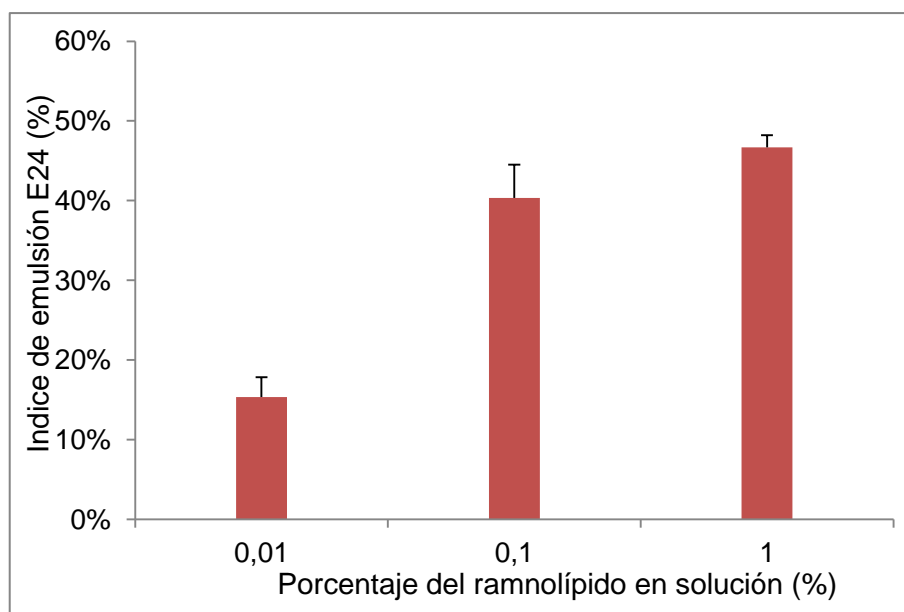


Figura 6. Índice de Emulsificación E24 (%) de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB25, sobre petróleo crudo frente a variaciones en las concentraciones del ramnolípido (pH del medio igual a 7).

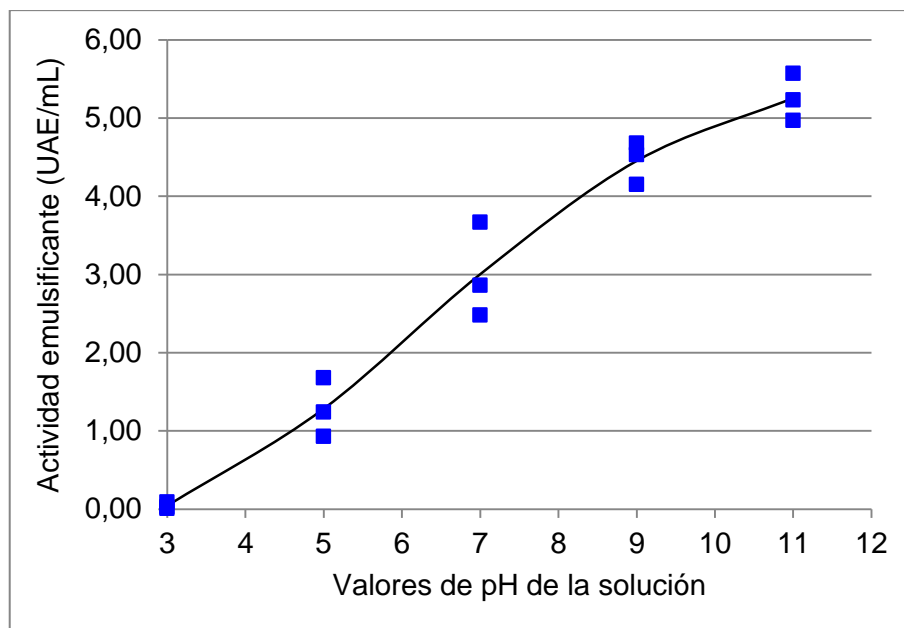


Figura 7. Actividad emulsificante (UAE/mL) de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB25, sobre petróleo crudo frente a variaciones en los valores del pH (concentración del ramnolípidos igual a 1% p/v).

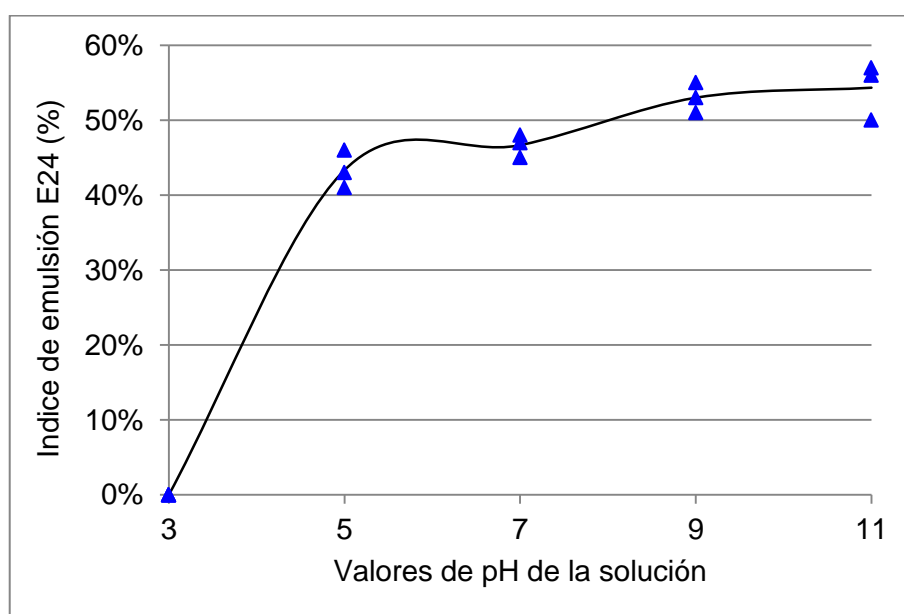


Figura 8. Índice de Emulsificación E24 (%) de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB25, sobre petróleo crudo frente a variaciones en los valores del pH (concentración del ramnolípidos igual a 1% p/v).

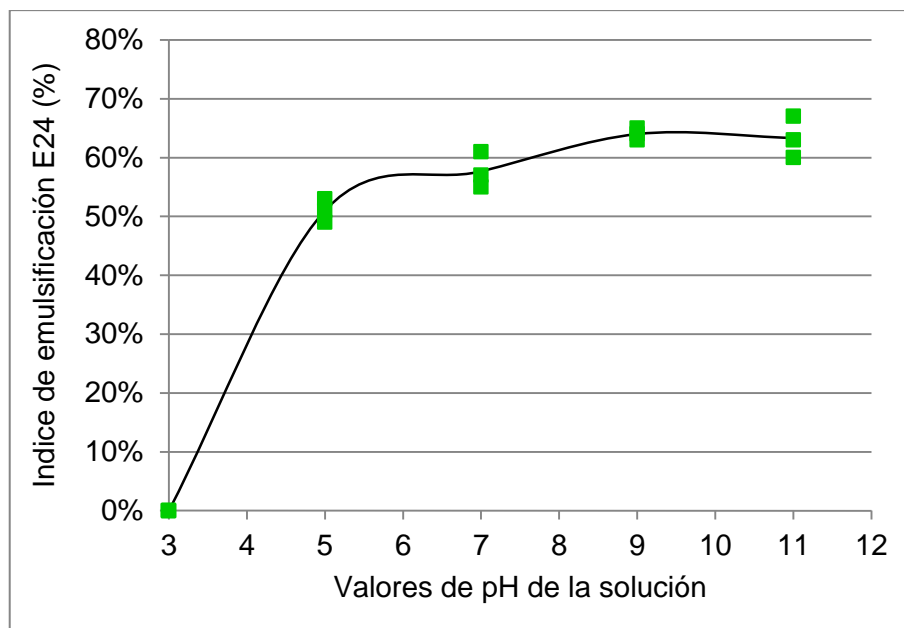


Figura 9. Índice de Emulsificación E24 (%) de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB25, sobre petróleo diesel 2 frente a variaciones en los valores del pH (concentración del ramnolípidos igual a 1% p/v).

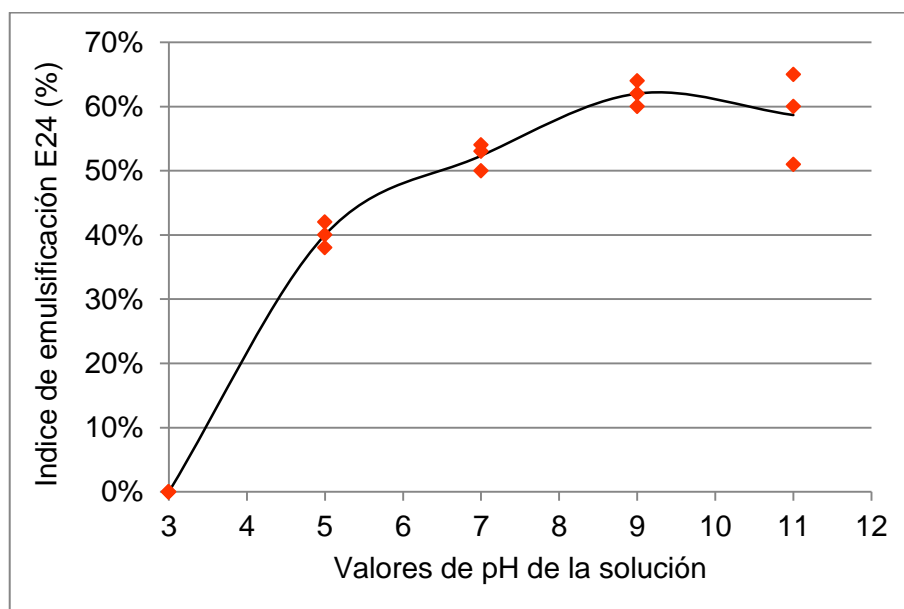


Figura 10. Índice de Emulsificación E24 (%) de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB25, sobre gasolina de 84 octanos frente a variaciones en los valores del pH (concentración del ramnolípidos igual a 1% p/v).

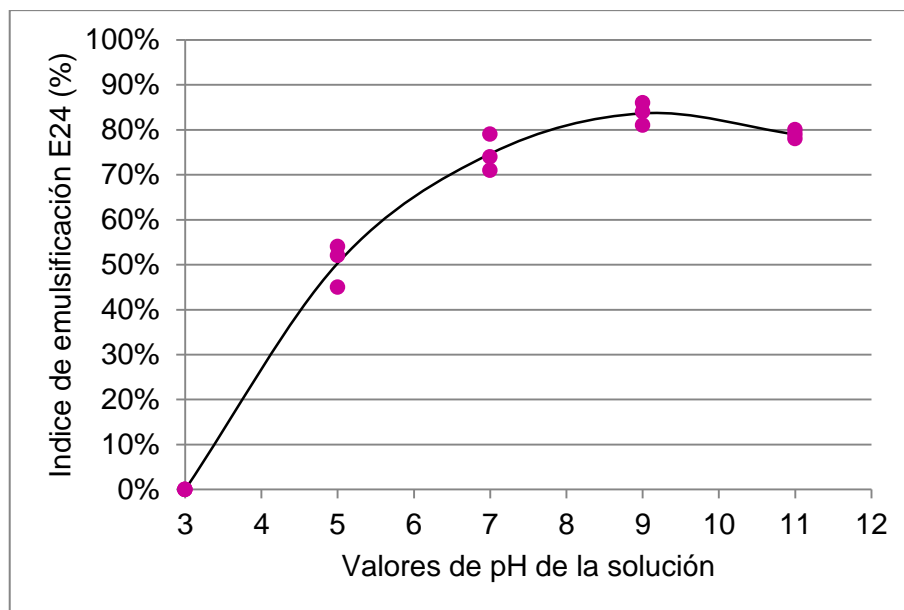


Figura 11. Índice de Emulsificación E24 (%) de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB25, sobre kerosene frente a variaciones en los valores del pH (concentración del ramnolípidos igual a 1% p/v).

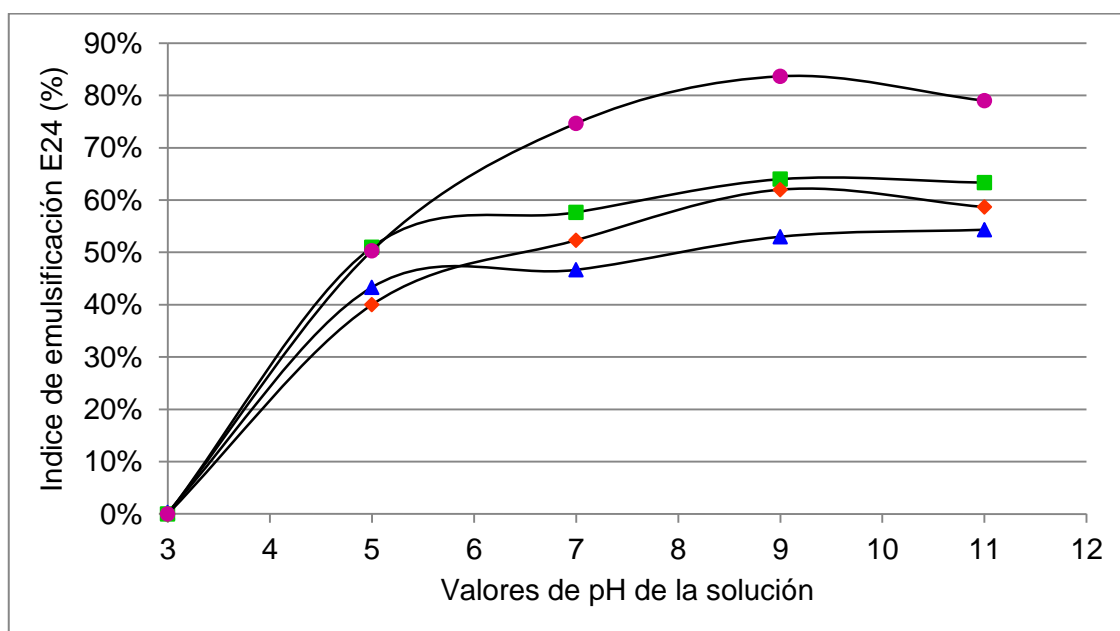


Figura 12. Índice de Emulsificación E24 (%) de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB25, sobre petróleo crudo (▲), petróleo diesel 2 (■), gasolina de 84 octanos (◆) y kerosene (●) frente a variaciones en los valores del pH (concentración del ramnolípidos igual a 1% p/v; los valores mostrados representan el promedio de tres pruebas independientes).

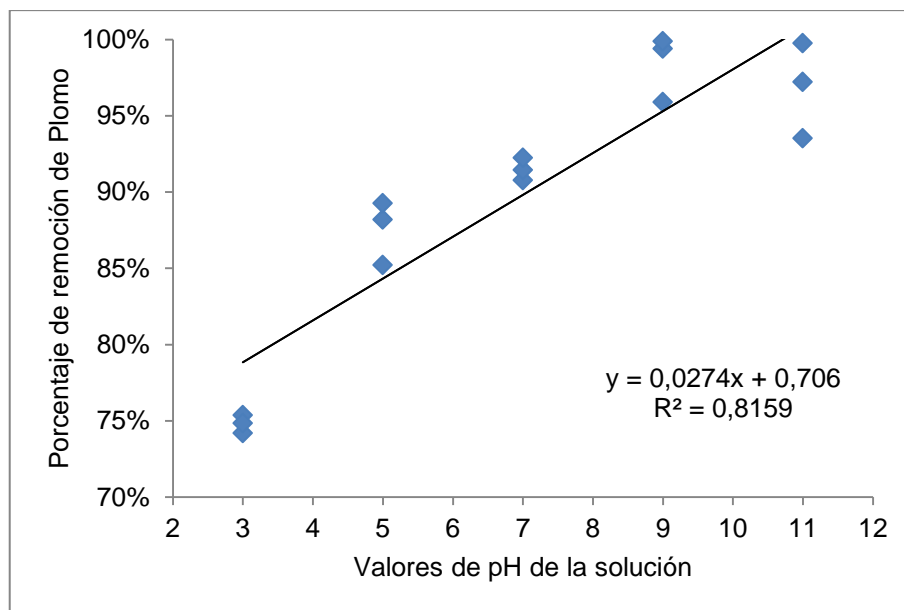


Figura 13. Porcentaje de remoción de plomo por ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB25 al 0.1% p/v, frente a variaciones en el pH del medio.

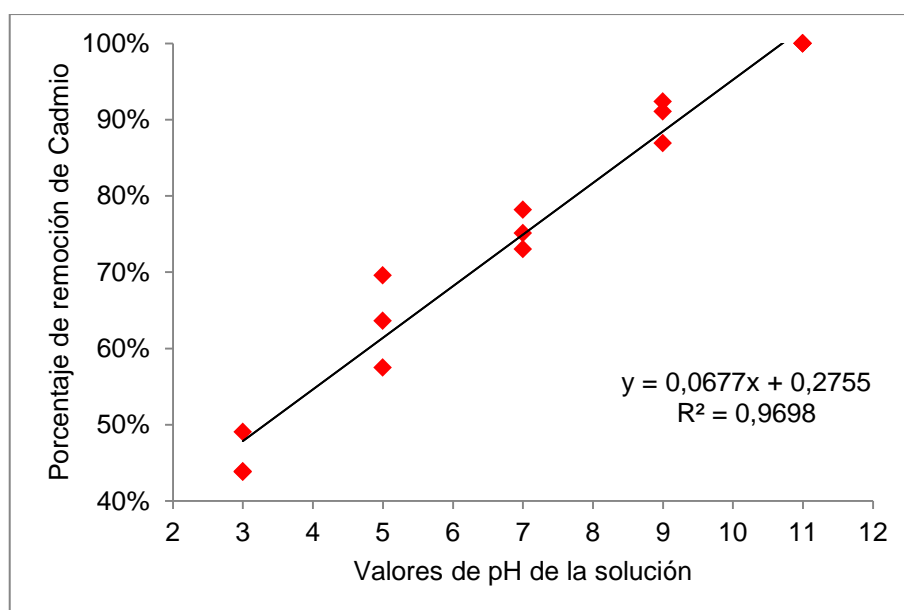


Figura 14. Porcentaje de remoción de cadmio por ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB25 al 0.1% p/v, frente a variaciones en el pH del medio.

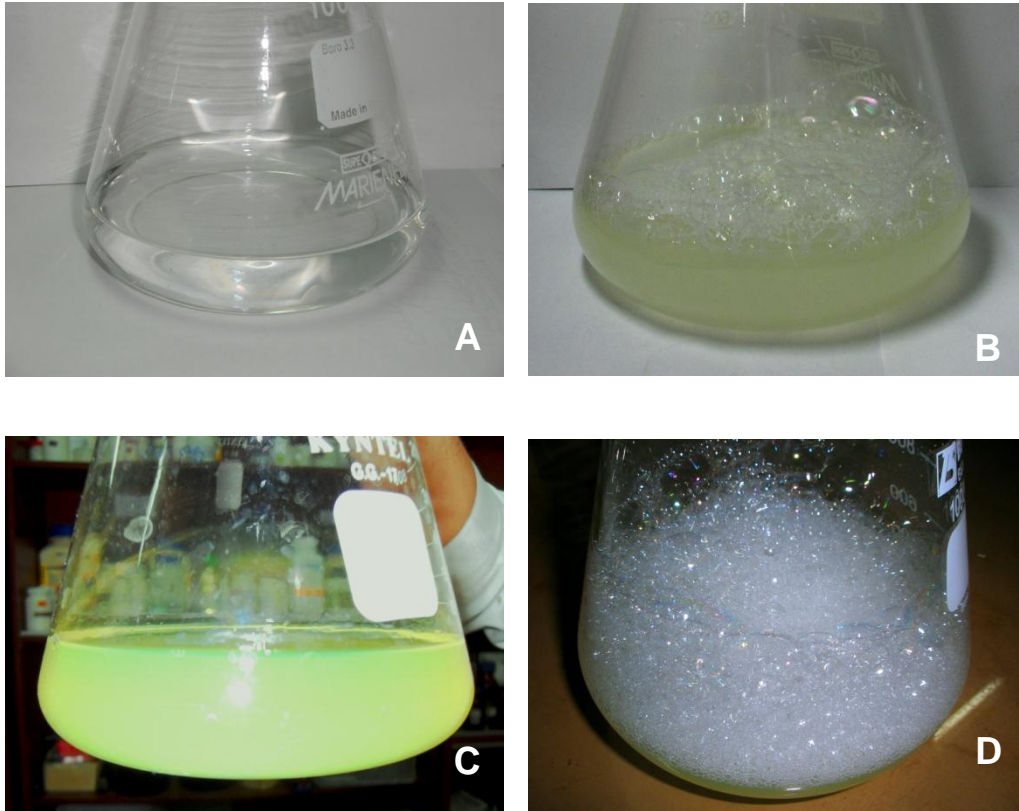


Figura 15. Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB 25 en medio mineral. (A) Medio de cultivo a las 0 horas de incubación. (B) Medio de cultivo a las 60 horas de incubación, (C) Medio de cultivo a las 120 horas de incubación. (D) Formación de abundante espuma por agitación manual del medio de cultivo a las 120 horas de incubación.

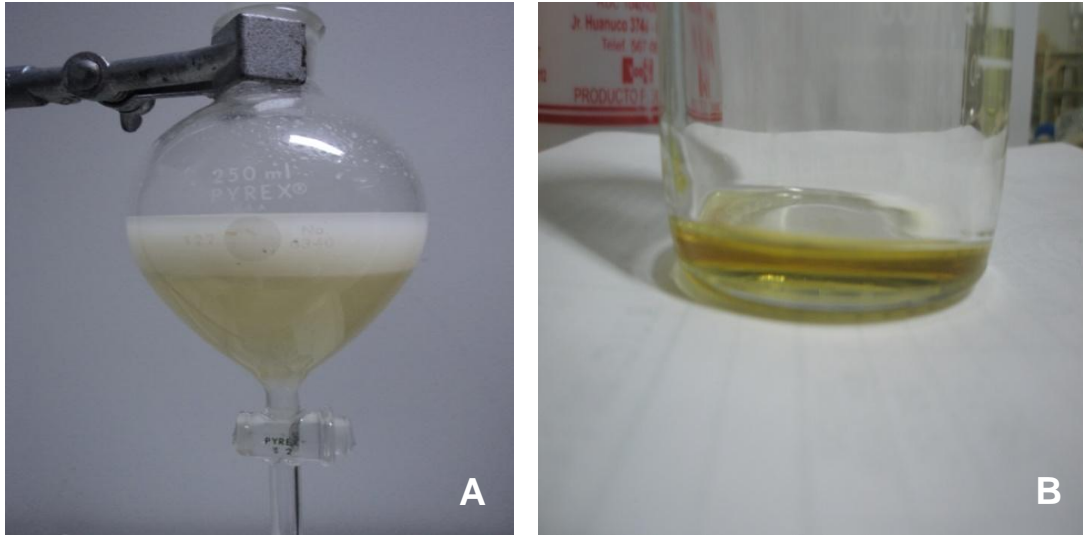


Figura 16. (A) Extracción cloroformo-etanol de los ramnolípidos del sobrenadante del medio de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* PB 25 luego del período de incubación. (B) Ramnolípidos en fase sólida luego de proceso de extracción.