



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Determinación de las características fisicoquímicas y
actividad emulsificante del ramnolípido producido por
la cepa nativa *Pseudomonas aeruginosa* 6k-11**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Para optar el Grado Académico de Bachiller en Microbiología y
Parasitología

AUTOR

Pepe Martín OBREGÓN MALDONADO

ASESOR

Dra. Susana Mónica GUTIERREZ MORENO

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Obregón, P. (2022). *Determinación de las características fisicoquímicas y actividad emulsificante del ramnolípido producido por la cepa nativa Pseudomonas aeruginosa 6k-11*. [Trabajo de investigación, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Pepe Martín Obregón Maldonado
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	75069435
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-2322-6091
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Susana Mónica Gutiérrez Moreno
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08060631
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-7885-7384
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Mario Alcarraz Curi
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	31159746
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Nora Yessenia Vera Obando
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41851323
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Marcos Alejandro Sulca López
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41283664
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.2.1. Biorremediación y Bioconservación

Grupo de investigación	Biotecnología para la Remediación – BIOREM
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado (VRIP). Programa de Promoción de Trabajo de Tesis para optar el grado de Bachiller. B20100190a
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Calle: Av. Carlos Germán Amezaga #375 - Latitud: -12.059763 Longitud: -77.082397
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Agosto 2020 – Agosto 2021
URL de disciplinas OCDE	Biología celular, Microbiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01 Otros temas de biología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.16 Biotecnología ambiental https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.08.01



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN)**

Siendo las 12:06 horas del 10 de junio de 2022, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue <https://meet.google.com/phe-vapm-vpa>, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Grado Académico de Bachiller en Microbiología y Parasitología (Modalidad: Trabajo de Investigación)** de **PEPE MARTÍN OBREGÓN MALDONADO**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° **F10B3-20220000044**, el graduando expuso su Trabajo de Investigación: **“DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y ACTIVIDAD EMULSIFICANTE DEL RAMNOLÍPIDO PRODUCIDO POR LA CEPA NATIVA *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 17, calificativo: Aprobado con mención honrosa.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Grado Académico de Bachiller en Microbiología y Parasitología (Modalidad: Trabajo de Investigación)** a **PEPE MARTÍN OBREGÓN MALDONADO**, y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo grado, conforme a ley.

Siendo las 13:20 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 10 de junio de 2022.

Mg. MARIO ALCARRAZ CURI
(PRESIDENTE)

Firmado digitalmente por GUTIERREZ MORENO Susana Monica FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 10.06.2022 13:30:48 -05:00

Dra. SUSANA GUTIERREZ MORENO
(ASESORA)

Mg. NORA VERA OBANDO
(MIEMBRO)

Dr. MARCOS SULCA LOPEZ
(MIEMBRO)

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos.....	3
1.1.1 Objetivo general.....	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	3
1.2 Hipótesis.....	3
II. ANTECEDENTES.....	4
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
3.1. Material biológico.....	6
3.2. Equipo.....	6
3.3. Producción y purificación de ramnolípido.....	6
3.4. Extracción y purificación de ramnolípidos.....	7
3.5 Preparación de la solución de Ramnolípidos.....	7
3.6 Concentración Micelar Crítica y grado de disociación (Williams et al., 1955).....	7
3.7 Evaluación de la actividad y estabilidad emulsificante.....	8
3.8 Determinación del punto y temperatura de Krafft.....	9
3.9 Variables a estudiar.....	9
3.10 Análisis estadístico.....	9
IV. RESULTADOS.....	10
4.1. Concentración micelar crítica y grado de disociación.....	10
4.3. Evaluación de la actividad y estabilidad emulsificante.....	11
4.2. Cálculo de la temperatura de Krafft.....	12
V. DISCUSIÓN.....	13
VI. CONCLUSIONES.....	16
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evaluación de la conductividad de las diferentes concentraciones de ramnolípido	10
Figura 2. Evaluación de la conductividad a diferentes valores de temperatura	12

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de la actividad y estabilidad emulsificante del biosurfactante producido por *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11 a una concentración de 5.05 g/L. 11

I. INTRODUCCIÓN

Entre los usos atribuidos al petróleo, un recurso de gran importancia en el mundo moderno, por su uso como fuente de energía y combustible, es también fuente de fertilizantes agrícolas, compuesto en la elaboración de plástico, entre muchos otros. La idea de un mundo donde el petróleo se agotase o cuya extracción fuese imposible significaría un gran problema para la humanidad y es por este motivo que uno de los tantos procesos importantes realizados en la industria petrolera, como lo es la extracción del petróleo, se encuentra en constante observación para poder ser optimizada.

En los últimos años distintas técnicas fueron utilizadas para optimizar la recuperación mejorada de petróleo (EOR, por sus siglas en inglés) en sus distintas fases. Este proceso consta de 3 fases : En un principio ocurre la recuperación primaria que se realiza con la propia presión del pozo de petróleo; recuperación secundaria, con presión externa inyectando regularmente salmuera y, por último, la recuperación terciaria, agregando sustancias químicas que pueden ser polímeros, surfactantes o soluciones alcalinas (**Sheng**, 2010). Cabe mencionar que existen técnicas que involucran microorganismos como la recuperación microbiana mejorada de petróleo (MEOR, por sus siglas en inglés) en las que estos son usados dentro del yacimiento para facilitar la recuperación del petróleo (**Ansah et al.**, 2018; **Wang et al.**, 2007).

Los costos por el uso de químicos en el proceso de EOR son altos, razón por la cual en el pasado no eran utilizados con mucha frecuencia. Sin embargo, existen productos como los biosurfactantes fabricados por microorganismos que, dependiendo de su producción, poseen un costo menor y características que bien podrían definirlos como amigables para el medio ambiente (**Fang et al.**, 2007). A pesar de esto, en un inicio había una mayor preferencia de surfactantes químicamente sintetizados frente a los biosurfactantes debido a que la producción a gran escala de los últimos solía ser costosa y por lo tanto poco rentable a lo largo del tiempo. (**Maneerat** 2005; **Moussa et al.**, 2014).

Además, existen muchos problemas que giran en torno a la industria petrolera en cuanto a contaminación se refiere y es durante la fase de extracción donde se produce un impacto considerable al medio ambiente por parte de los surfactantes químicamente sintetizados (**Mulligan** 2005), ya sea que las actividades se encuentren reguladas o no.

Los ramnolípidos producidos principalmente por microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* son biosurfactantes compuestos por una mezcla de cadenas de ácido 3-hydroxydecanoico, como ácido graso y con una (monoramnolípido) o dos

(diramnlípido) ramnosas, como grupo glicosil (**Soberon y Maier**, 2011). Estos pueden producirse a partir de distintos sustratos y el tipo de ramnolípido producido dependerá tanto de la cepa, el sustrato utilizado y las condiciones del proceso.

Dentro de las características que debe poseer un tensioactivo para poder disminuir la tensión superficial de un líquido, el más importante es la Concentración Micelar Crítica (CMC) cuyo valor es la mínima concentración necesaria para que se formen micelas espontáneas en la solución, y esta variará según la cantidad de surfactante que se agrega en exceso a partir de la CMC (**Edwards et al.**, 1991). La importancia de este valor radica en que indicará a qué concentración de biosurfactante la tensión superficial se mantendrá constante a pesar de que la concentración aumente (**Czajka et al.**, 2015). De esta manera será posible calcular las cantidades necesarias de biosurfactantes para poder realizar una solubilización y extracción de petróleo exitosa. Si bien es cierto, la solubilización aumentará con una mayor presencia del biosurfactante, las concentraciones presentes de petróleo o cualquier otro contaminante, como en el caso de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP), alterarán de manera significativa el valor de la CMC y en consecuencia la solubilización de los mismos (**Chun et al.**, 2002). Por esta razón, cuando se obtienen valores como la CMC de un biosurfactante en agua o buffer, dicho valor debe ser contrastado bajo condiciones que simulen la composición de los sitios contaminados en donde será utilizado.

El ramnolípido producido por la cepa nativa de *P. aeruginosa* 6K-11, aislada en el laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana, en cuanto a su producción y purificación es bastante eficiente pero solo se conocen datos cualitativos respecto a su uso como surfactante mientras que características propias del biosurfactante como el balance hidrofílico-lipofílico, CMC, grado de disociación y las condiciones en que la actividad emulsificante es óptima son aún desconocidas para nuestro equipo.

Los biosurfactantes, a diferencia de los surfactantes sintéticos usados en la actualidad, son producidos por seres vivos y poseen ciertas ventajas frente a estos como biodegradabilidad, biocompatibilidad, baja toxicidad, producción a base de sustratos de bajo costo y actividad en un amplio rango de temperatura, pH y salinidad (**Soberon y Maier**, 2011 y **Hošková et al.**, 2013).

Las características de cada biosurfactante son exclusivas respecto a los demás debido a su estructura única, por lo que regularmente se necesitan estudios que las evalúen detalladamente (**Soberon y Meier**, 2011). Por tal motivo, este estudio busca conocer las características fisicoquímicas y la actividad emulsificante aún desconocidas para nuestro

equipo de investigación y utilizar los resultados como base de futuros estudios o procesos relacionados al área de la biorremediación.

Los ramnolípidos son excelentes agentes emulsificadores de hidrocarburos capaces de reducir la tensión del agua de 72 mN/m a valores por debajo de 30 mN/m y la tensión superficial de sistemas agua/aceite de 43mN/m a por debajo de 1 mN/m (**Henkel et al.**, 2012). La adsorción de estos en la interfase líquido-líquido reemplazará moléculas de agua por moléculas de biosurfactantes que, a diferencia de las moléculas de agua, poseen fuerzas de atracción más débiles disminuyendo la tensión superficial (**Pacwa-Płociniczak et al.**, 2011). Además, gracias a sus características pueden utilizarse en contacto con petróleo, HAP o cualquier otra sustancia contaminante de naturaleza oleosa facilitando su extracción e incluso su degradación cuando es utilizado correctamente en procesos de biorremediación (**Amani et al.**, 2010; **Das & Chandran**, 2011).

El objetivo principal de este estudio es determinar las características físico-químicas del ramnolípidos obtenido a partir de la cepa de *P. aeruginosa* 6K-11 y su desempeño como agente tensioactivo frente a hidrocarburos de petróleo en distintas concentraciones.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

- Determinar las características físico-químicas del ramnolípidos obtenido a partir de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración micelar crítica (CMC) y grado de disociación del biosurfactante.
- Evaluar la actividad emulsificante del biosurfactante.
- Determinación del punto y temperatura de Krafft del biosurfactante.

1.2 Hipótesis

- El biosurfactante producido por la cepa nativa *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11 poseerá un CMC y grado de disociación altos.
- El biosurfactante poseerá una alta actividad emulsificante.
- El punto de Krafft será mayor a los 35°C

II. ANTECEDENTES

Giraldo et al. (2014) evaluó la actividad emulsificante del ramnolípido proveniente de la cepa de *P. aeruginosa* PB 25 con el objetivo de utilizarlo en la remoción de metales pesados. En este estudio se puede observar la importancia de conocer el valor de la concentración en la cual el biosurfactante realizará la actividad emulsificante óptima. El índice de emulsificación E24, el cual evalúa la estabilidad de la emulsificación a lo largo del tiempo, tenía un valor de 47.

Bordas et al. (2005) realizaron un estudio en donde se usó una mezcla de ramnolípidos producida por *P. aeruginosa* 57SJ para incrementar la solubilidad del pireno en agua purificada. Se halló la CMC del biosurfactante en el sistema agua pura/pireno y esta fue de 270 mg/L. Posteriormente, se evaluó la solubilización del pireno en un sistema de suelo en columnas similar al *core flood test*, el cual simula un pozo de petróleo. Los resultados apuntaron que la CMC, además de verse alterada respecto a la concentración de los contaminantes, también lo hizo de una manera significativa cuando el biosurfactante era utilizado en el sistema mencionado obteniendo un nuevo valor aproximado de 400 mg/L, 1.5 veces más que el anterior (Bordas et al., 2005).

Ben Ayed et al. (2013) determinaron las características de un biosurfactante producido por la cepa *Bacillus mojavensis* A21 frente a surfactantes sintéticos. Para este trabajo fue sumamente importante el conocimiento de las cualidades del biosurfactante a distintas condiciones, razón por la cual se evaluó la actividad emulsificante a diferentes concentraciones del surfactante, temperaturas, pH y concentraciones de sal. Una vez conocido estos valores se procedió a elaborar un *buffer* que contuviese al biosurfactante y de esta manera utilizarlo en los procesos de emulsificación. Finalmente, en el estudio quedó evidenciado una óptima actividad emulsificante por parte del biosurfactante a condiciones adecuadas, las cuales pudieron ser determinadas a lo largo de este trabajo.

Fang et al. (2007) y **Wang et al. (2007)** analizaron en un inicio la producción de los ramnolípidos obtenidos con cepas *wild type* y transformadas de *P. aeruginosa* y *E. coli* respectivamente. Esto se debe a la compleja y aún desconocida maquinaria que emplea *P. aeruginosa* para la producción de ramnolípidos, razón por la cual contrastaron dicha producción con otra bacteria de *maquinaria más simple*. Luego, analizaron los ramnolípidos obtenidos mediante cromatografía y posteriormente su efectividad como biosurfactantes con la prueba de *core flood test* a distintas condiciones de temperatura, pH y concentración de sales las cuales, en la combinación adecuada, optimizaron la recuperación terciaria de petróleo mediante el uso del ramnolípido. En los estudios se llegaba como conclusión que las

bacterias transformadas tenían una producción similar a las *wild type* productoras de ramnolípidos mientras que su rendimiento como biosurfactante en la prueba *core flood test* producía una recuperación de petróleo del 40%, similar a lo obtenido utilizando el ramnolípidos de las cepas *wild type*.

Todos estos Ambos estudios demuestran la importancia de una caracterización minuciosa de nuestro biosurfactante antes de poder ser empleada en procesos como EOR o de biorremediación. Por esta razón, en este trabajo se analizó el ramnolípidos obtenido de una cepa de *P. aeruginosa* mutante que a diferencia de las cepas utilizadas en los trabajos mencionados posee una tasa de producción y rendimiento evaluada, optimizada y contrastada frente a otras cepas productoras de ramnolípidos. Es precisamente la naturaleza única de esta cepa lo que nos alienta a realizar un estudio profundo del ramnolípidos analizando sus características fisicoquímicas y las condiciones en las cuales el rendimiento como biosurfactante sea el óptimo.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

La cepa *P. aeruginosa* 6K-11 utilizada en este estudio pertenece al cepario del laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana y fue aislada a partir de zonas impactadas por hidrocarburos de petróleo en Talara, Perú.

3.2. Equipo

Se utilizó un medidor de conductividad de la marca APERA modelo EC800 equipado con sonda para medir la variación de temperatura. También se empleó un Espectrofotómetro de la marca Thermo Scientific™ modelo GENESYS 150 UV-Vis para poder determinar la actividad emulsificante del biosurfactante.

3.3. Producción y purificación de ramnolípido

En primer lugar, la cepa fue reactivada de acuerdo a la metodología de **Guzmán (2016)** inoculándola en 2 ml de Caldo Tripticasa de Soya (TSB) a 35 °C por 18 a 24 horas para obtener la mayor cantidad de células viables. Una vez transcurrido el tiempo establecido se extrajo el medio de cultivo en un microtubo de plástico de 2,5 ml y se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en solución salina (NaCl 0.85%). En segundo lugar, se volvió a centrifugar a las mismas condiciones, pero esta vez la biomasa se resuspendió en 1 ml de medio mineral Seigmund-Wiener (SW), luego este se inoculó en un matraz con 29 ml de medio SW, cuyo volumen final estaba suplementado con 1% de aceite de fritura como fuente de carbono, y se incubó a 31.26 °C, 186 rpm, pH de 6.76 durante 36 a 42 horas aproximadamente. Para este tiempo de incubación, se diluyó a una proporción de 1/80 de biomasa, se obtuvo una densidad óptica de 0,06. Esto permitió eliminar la fase lag y disminuir el tiempo de producción en los siguientes pasos. Por último, se centrifugaron 7.4 ml de cultivo a 5 000 rpm durante 30 minutos, se descartó el sobrenadante y la biomasa se resuspendió en 5 ml de medio SW. Finalmente, la suspensión se inoculó en un matraz con 95 ml de medio mineral SW modificado (**Alcalde, 2018**), cuyo volumen final contenía aceite de fritura al 1% como fuente de carbono, y se incubó a 31,3 °C, 186 rpm, pH 6,8, inóculo al 7,4% (p/v) durante dos semanas.

3.4. Extracción y purificación de ramnolípidos

En principio, se distribuyó el medio de cultivo en tubos cónicos de 50 ml que fueron centrifugados a 5 000 rpm durante 30 minutos. A continuación, se trasvasó el sobrenadante a nuevos tubos cónicos y se descartó el paquete celular; este proceso se repitió por segunda vez para una mejor extracción. Luego, el sobrenadante se acidificó a pH 2 con ácido clorhídrico concentrado y se dejó reposar durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las soluciones acidificadas se centrifugaron a 5 000 rpm por 1 hora, el precipitado obtenido de cada tubo se resuspendió en 10 ml de agua milli-Q, a continuación, se añadió 20 ml de solución cloroformo:etanol (2:1, v/v) y los tubos se agitaron durante 30 minutos. Una vez concluido este proceso las suspensiones fueron centrifugadas a 5 000 rpm por 20 minutos para luego extraer la fase orgánica y trasvasarlo a tubos de ensayo vacíos para ser incubados a 80 °C para evaporar los solventes orgánicos. Finalmente, se obtuvo una solución de color rubio oscuro y de apariencia oleosa, característica de los ramnolípidos, y se resuspendió con agua destilada a pH 9 (**Giraldo, 2012**).

3.5 Preparación de la solución de Ramnolípidos

Para la preparación de la solución se utilizó el método de Williams como referencia (**Williams et al., 1955**), en donde se realizaba la primera medición a una concentración inicial y posteriormente a sus diluciones. Primero, se prepararon 300 ml de una solución de ramnolípidos en agua destilada a una concentración de 10 g/L, a continuación, se colocaron 100 ml en un vaso de precipitado de 500 ml y se realizó la primera valoración de la conductividad eléctrica.

Luego de obtener una solución purificada de ramnolípidos producido por la cepa de *P. aeruginosa* 6K-11 se realizó la determinación de la CMC y el grado de disociación mediante conductimetría basada en un proceso de valoración volumétrica.

3.6 Concentración Micelar Crítica y grado de disociación (Williams et al., 1955)

Primero, se añadieron volúmenes conocidos de agua de forma sucesiva mientras se utilizó el agitador magnético para una óptima homogenización de la solución, se dejó estabilizar y se realizó una valoración de la conductividad eléctrica tras cada adición, las cuales iniciaron con volúmenes de 5 ml y luego disminuyeron a 2 ml; se realizaron tres réplicas por cada medida. El proceso después de un previo calentamiento a la solución de ramnolípidos debido a que

cuando se encuentra a temperatura ambiente y pH neutro es muy aceitoso, por lo que durante toda la experiencia se usó un agitador magnético que mantenga homogénea la solución.

Para la elaboración de las rectas que permitan identificar tanto la CMC como hallar el grado de disociación se utilizó el método de mínimos cuadrados cuyas ecuaciones son las siguientes:

$$m = \frac{n \cdot \Sigma(x \cdot y) - \Sigma x \cdot \Sigma y}{n \cdot \Sigma x^2 - |\Sigma x|^2}$$
$$b = \frac{\Sigma y \cdot \Sigma x^2 - \Sigma x \cdot \Sigma(x \cdot y)}{n \cdot \Sigma x^2 - |\Sigma x|^2}$$

Dónde: m = la pendiente,
 b = punto de corte,
 n = el número de pares de datos por cada recta
 x = concentración de ramnolípido
 y = conductividad

3.7 Evaluación de la actividad y estabilidad emulsificante

Para la evaluación de la actividad emulsificante, nuestra metodología se basó en la empleada por Goldman *et al.*, (1982) con algunas modificaciones. Primero se añadieron 10 ml de solución de ramnolípido a una concentración igual al CMC hallado previamente y a continuación se agregaron 2 ml de petróleo. Luego, la mezcla se homogenizó la mezcla por agitación durante 2 minutos y a continuación se trasvasó 1 ml de esta solución a un tubo de espectrofotómetro. La solución fue medida a 540 nm y el resultado fue posteriormente convertido en Unidades de Actividad Emulsificante por ml (UAE/ml), donde un valor de absorbancia igual a 0,816 es equivalente a 1 UAE/ml. La prueba se realizó por triplicado junto a un control negativo.

Luego se evaluó la estabilidad de la emulsión que produce nuestro biosurfactante mediante una metodología basada en el índice 24 (E24) (**Abouseoud et al.**, 2008) con algunas modificaciones. Inicialmente se colocaron 2 ml de solución de ramnolípido a una concentración igual a la CMC hallada previamente en un tubo de ensayo. Posteriormente, se agregó la misma cantidad de petróleo. Se homogenizó la mezcla mediante agitador vortex durante 3 minutos y se dejó reposar durante 24 horas. Finalmente, se procedió a calcular el valor de E24 dividiendo la altura de la capa emulsificada entre la altura total de la solución. La prueba se realizó por triplicado junto a un control negativo el cual solamente contenía petróleo y agua destilada.

3.8 Determinación del punto y temperatura de Krafft

Para conocer la temperatura en la cual nuestro surfactante tuvo una mejor actividad realizamos valorizaciones sucesivas de conductividad eléctrica, a distintas temperaturas, en una solución de ramnolípido y agua cuya concentración sea mayor al CMC. Estos datos son llevados a una gráfica para poder observar dos puntos a lo largo de la recta en el que la pendiente cambia.

El primero, se denomina punto de Krafft a partir del cual se produjo un aumento de solubilidad debido a la formación de micelas que se vio expresada en una mayor conductividad eléctrica. Mientras que el segundo se considera temperatura de Krafft (T_K), a partir de este punto es donde empiezan a coexistir solamente micelas y la temperatura aumenta la solubilidad provocada por la movilidad iónica (Manojlovic 2012).

3.9 Variables a estudiar

En el presente trabajo se realizaron dos mediciones, las cuales tuvieron como variable dependiente a la conductividad eléctrica medida en $\mu\text{S}/\text{cm}$. En la primera experiencia, Concentración Micelar Crítica y Grado de Disociación, la variable independiente fue la concentración del biosurfactante en la solución; en la segunda, Determinación del punto y temperatura de Krafft, la temperatura. Ambos procedimientos cuentan con una sola variable independiente por lo que el diseño experimental desarrollado es univariable.

3.10 Análisis estadístico

Se utilizó la media muestral para poder analizar todos los datos obtenidos en cada medición ya que estas se realizaron por triplicado. Dichos valores son los que fueron tomados en cuenta al momento de realizar los gráficos.

Se utilizó Microsoft Excel para realizar las gráficas que describen la variación de la conductividad respecto a la concentración del biosurfactante y la temperatura.

IV. RESULTADOS

4.1. Concentración micelar crítica y grado de disociación

La concentración micelar crítica (CMC) hallada fue de 5.86 g/L y el Grado de Disociación hallado de 0.49. En la Figura 1 se puede observar el gráfico realizado a partir de las mediciones por conductometría. Se observa como desde una concentración de 12.5 g/L de ramnolípido la conductividad disminuye a un ritmo continuo conforme lo hace la concentración del surfactante hasta un punto en que se produce una disminución más pronunciada dividiendo a la recta en las regiones pre y post micelar evidenciando la formación de dos rectas de pendientes diferentes.

Las ecuaciones de ambas rectas se hallaron utilizando el método de mínimos cuadrados y fueron las siguientes:

$$A = 2,8007x + 10,614$$

$$B = 1,2392x + 18,513$$

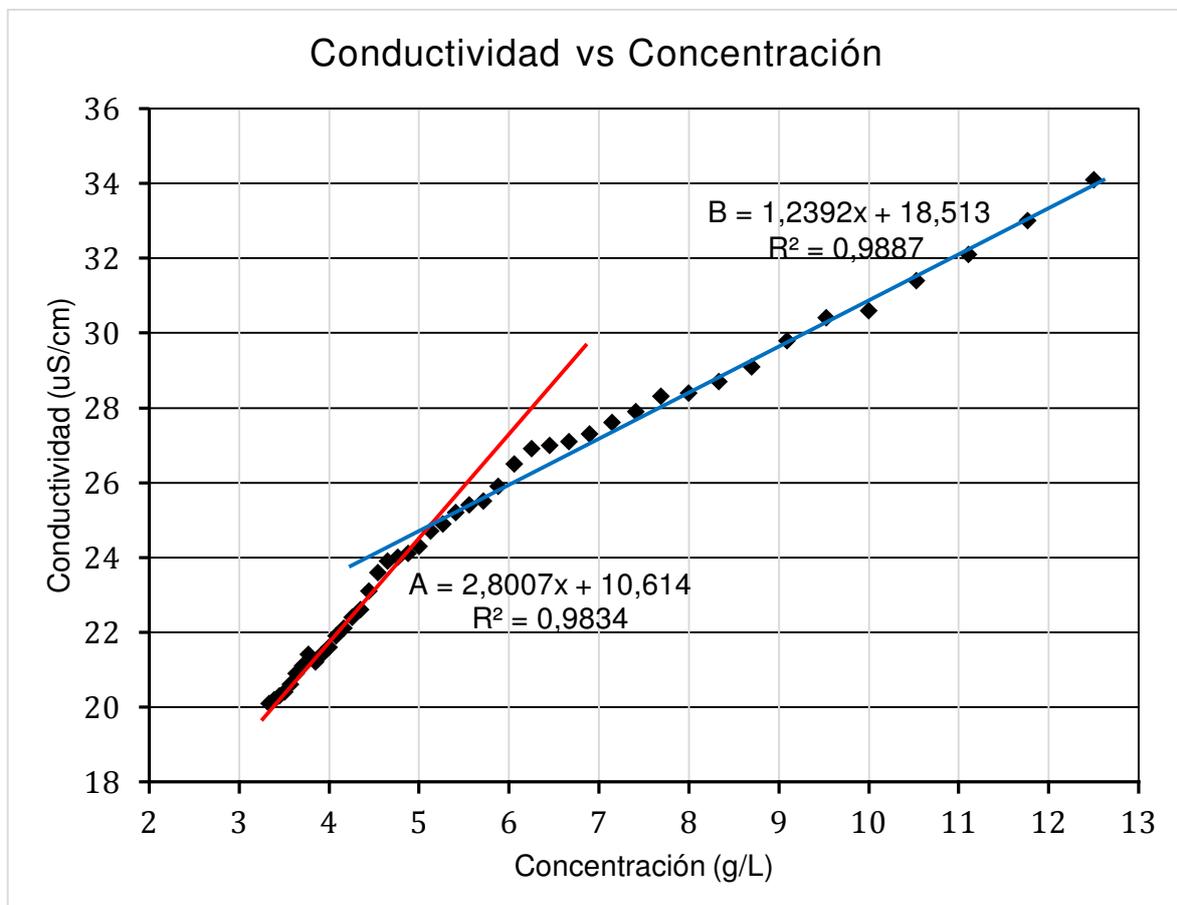


Figura 1. Evaluación de la conductividad de las diferentes concentraciones de ramnolípidos de *P. aeruginosa*. A) Línea de tendencia de los primeros 25 valores medidos. B) Línea de tendencia de los últimos 20 valores medidos.

De esta manera, al momento de igualar ambas ecuaciones se obtuvo como valor la concentración en la cual se intersectan las rectas indicando el valor de la CMC, el cual fue de 5.05 g/L. Finalmente, el cociente de las pendientes resulta en el grado de disociación que tuvo como valor 0.49.

4.3. Evaluación de la actividad y estabilidad emulsificante

Debido al uso de triplicados en ambas pruebas los valores obtenidos se encuentran resumidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de la actividad y estabilidad emulsificante del biosurfactante producido por *P. aeruginosa* 6K-11 a una concentración de 5.05 g/L.

Tubo N°	Actividad Emulsificante (UAE/ml)	E24 (%)
1	1.97	>50
2	2.06	>50
3	1.88	>50
Promedio	1.97	>50
Control negativo	0	0

4.2. Cálculo de la temperatura de Krafft

La temperatura de Krafft para el ramnolípido producido por *P. aeruginosa* 6K-11, fue de 39 °C. Este valor fue calculado al realizar un gráfico a partir de los datos obtenidos en la medición de la conductividad respecto a la temperatura con una solución concentrada de ramnolípido inicial de 12.5 g/L (Figura 2). Se observa un aumento constante de la conductividad conforme lo hace la temperatura hasta los 35 °C aproximadamente, lo que indicaría que dicho valor es el punto de Krafft. Posteriormente, la conductividad continuó incrementándose, pero esta vez a un mayor ritmo acorde se elevaba la temperatura de la solución hasta los 39 °C y es a partir de esta temperatura que la conductividad continuó aumentando, pero a un ritmo más lento que el anterior evidenciando que el valor de 39 °C es la temperatura de Krafft de nuestro ramnolípido.

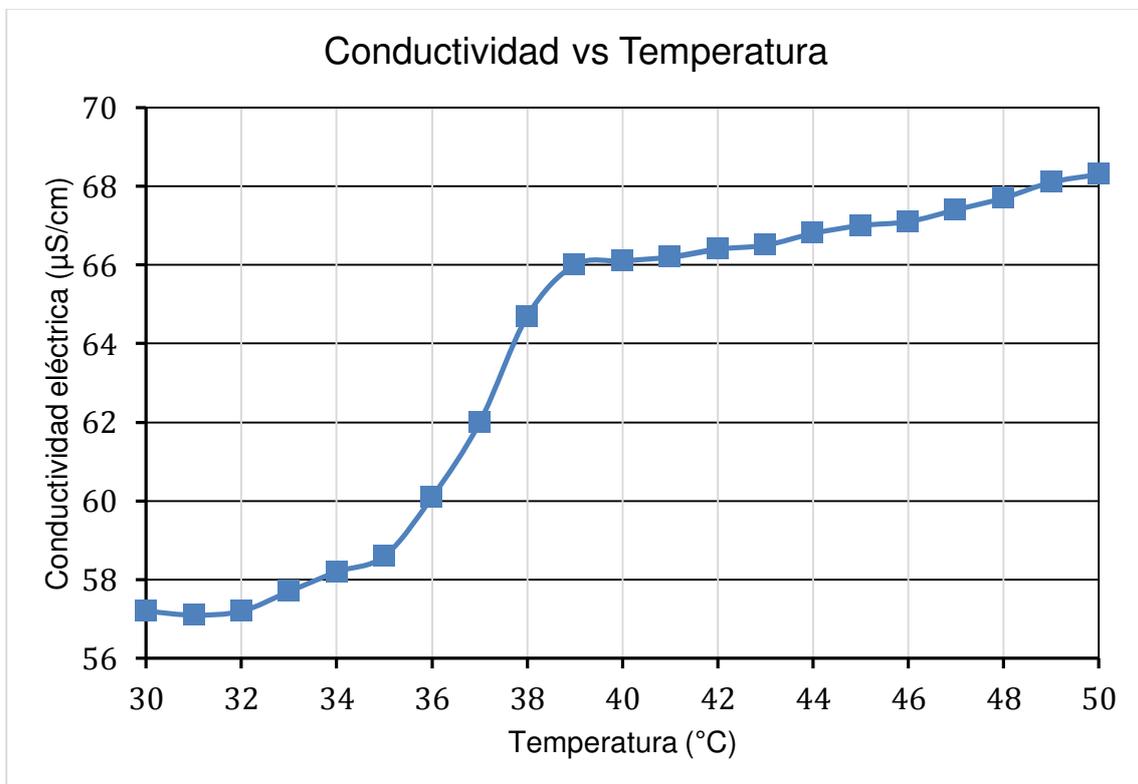


Figura 2. Evaluación de la conductividad a diferentes valores de temperatura del ramnolípido de *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 12.5 g/L.

V. DISCUSIÓN

Para la evaluación de la conductividad eléctrica respecto a la concentración de ramnolípido se utilizó una solución del ramnolípido en agua destilada. Mańko *et al.*, (2014) recomienda realizar este tipo de mediciones con agua destilada para que ningún otro componente altere el resultado que se obtenga de la medición. La solución utilizada tenía una concentración de 12.5 g/L de biosurfactante. Giraldo *et al.*, (2014), reportó que la óptima actividad emulsificante de un ramnolípido fue a una concentración de 10 g/L, lo que quiere decir que la CMC de ese ramnolípido se encontraba por debajo de esa concentración. Es por este motivo, que las mediciones se iniciaron a una concentración de 12.5 g/L y así poder tener un rango más amplio que permita conocer la CMC del biosurfactante en estudio. Cuando se realizaron las lecturas se observó una conductividad inicial de 34 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a una concentración de 12.5 g/L que comenzó a disminuir progresivamente hasta una concentración aproximada de 26 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 6 g/L, momento en el cual ocurrió una variación en la disminución de la conductividad indicando que la CMC se encontraría cercana a este valor. Es gracias al método de mínimos cuadrados que se obtuvo un valor más aproximado de la CMC el cual fue de 5.05 g/L. La gráfica presentada en la figura 1 concuerda con un perfil típico de la representación de los valores de conductividad en función de la concentración de surfactante según López (2017).

La importancia de conocer la CMC del biosurfactante radica en la utilidad que tendría el conocer este valor en futuros experimentos que utilicen este mismo biosurfactante con las mismas o distintas condiciones. Las concentraciones de ramnolípido tendrían que ser mayores al valor encontrado en este trabajo ya que si bien el ramnolípido seguirá teniendo una adsorción constante con concentraciones mayores (**Budhathoki *et al.*, 2016; Kamal *et al.*, 2017**) es posible que la interacción con otras sustancias varíe su actividad. Es por esta razón que en los procedimientos de este estudio solamente se utilizó agua destilada, para que no exista ninguna interacción con nuestro ramnolípido. Sin embargo, esta condición no permite aprovechar al máximo el rol de agente biosurfactante ya que la concentración necesaria para la CMC es más alta a comparación de trabajos como el de Wang *et al.* (2007) y Ben Ayed *et al.* (2013) en donde dicho valor era hasta 10 veces menor. Ambos trabajos utilizaron diferentes valores de pH, temperatura y concentración de NaCl al momento de medir la CMC además de utilizar un tensiómetro, equipo más preciso para este tipo de tarea.

El presente trabajo trató de encontrar un punto de partida para todas las evaluaciones posteriores que se puedan realizar al ramnolípido producido por *P. aeruginosa* 6K-11. Si bien es cierto, el valor obtenido de la CMC es menor a lo reportado por Giraldo *et al.* (2014) debemos tener en cuenta que en dicho trabajo el biosurfactante fue evaluado con soluciones

a distintos pH mientras que en el presente trabajo solamente respecto a la carga que libera en una solución de agua destilada mediante conductimetría. Esto debido a que los ramnolípidos poseen un comportamiento aniónico en disoluciones acuosas gracias a sus grupos hidroxilos y carboxilos ionizables (**Sanchez**, 2010).

Por otra parte, en trabajos como el de Fang *et al.*, (2007) se observa que el valor de la CMC de un ramnolípidos producido por *P. aeruginosa* PAO1-rhIA⁻ es de 75 mg/L y esto se debe a dos factores, el primero es que el instrumento para calcular dicho valor fue un tensiómetro y el segundo, el más importante, es que la solución en donde el biosurfactante fue analizado era un *buffer* que potenciaba la capacidad del ramnolípidos de disminuir la tensión superficial y por ende producir emulsión a diferencia del agua destilada utilizada en el presente estudio con la finalidad de eliminar interacciones que interfieran en las lecturas. En otro estudio similar como el de Wang *et al.*, (2007) también se obtuvo un valor similar de CMC, y al ser utilizado en una prueba *core flood test* el porcentaje de recuperación de petróleo fue del 42%. Dado que el análisis individual de nuestro ramnolípidos se encuentra completado esto nos brinda dos puntos importantes a sacar provecho a partir de esta investigación. Teniendo en cuenta que el siguiente paso sería evaluar la actividad emulsificadora, el primer punto sería diseñar un *buffer* que permita potenciar nuestro biosurfactante e incluso usarlo a menores concentraciones. El segundo punto es que al obtener una CMC elevada a diferencia de otros trabajos se esperaría también una mayor recuperación de petróleo en pruebas como *core flood test* que es el verdadero objetivo a largo plazo de esta investigación.

Los valores obtenidos de la actividad emulsificante pueden observarse en la Tabla 1. El valor obtenido fue de 1.97 UAE/ml. lo cual se acerca a lo hallado por Giraldo *et al.*, (2014) cuando al evaluar la actividad emulsificante de un biosurfactante obtuvo valores de 3 UAE/ml utilizando concentraciones de 10 g/L. En el presente estudio la concentración determinada fue de 5.05 g/L debido a que este fue el valor de la CMC y teóricamente a esta concentración la tensión superficial se mantendrá constante a pesar de que esta aumente. Debemos tener en cuenta que existen diversos factores que afectan a la actividad emulsificante como la naturaleza del tensioactivo y del componente oleoso, la salinidad y el valor de pH de la solución en la que se encuentre el biosurfactante o la concentración del biosurfactante por mencionar algunos (**Ben Ayed** *et al.*, 2009; **Wang** *et al.*, 2007) y es por este motivo que el presente trabajo desea estimar un punto de partida para posteriormente evaluar los factores mencionados. Por otra parte, los valores hallados respecto a la estabilidad emulsificante se describen como mayores al 50% debido a que toda la capa de petróleo cubría la mitad del tubo impidiendo la medición real de la altura de la capa de emulsificación, sin embargo, la totalidad de la capa correspondiente a la solución con el biosurfactante se mantuvo con

turbidez luego de 24 horas e incluso se mantuvo así durante 5 días. Este dato es prometedor ya que los valores obtenidos fueron menores a los obtenidos en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana anteriormente. Los controles negativos de ambas pruebas no presentaron ninguna característica de emulsificación.

Gracias a la evidente existencia de estas tres regiones en la Figura 2 es que se puede obtener el punto y temperatura de Krafft tal como lo reportado por López (2017) con líquidos iónicos. Estos valores fueron de 34 °C y 39 °C respectivamente. Por una parte, la temperatura de Krafft es prometedora ya que se encuentra cercana a los 37°C que suele utilizarse para incubar ciertos microorganismos *in vitro*. Los trabajos que utilicen microorganismos junto con el surfactante para procesos de biorremediación o incluso durante la extracción de petróleo con microorganismos, como los mencionados por Kamal *et al.*, (2017), tendrían que tener en cuenta una temperatura de incubación mayor o igual a 39 °C o en todo caso evaluar la temperatura que crean sea la óptima para el microorganismo sin desaprovechar la actividad emulsificante del ramnolípido.

Por último, cabe mencionar que no se utilizó el biosurfactante en el estudio frente a alguna sustancia problema ya que lo primero que se deseó conocer la CMC y la temperatura con los cuales ejecutar ya sea una correcta extracción de petróleo o un trabajo de biorremediación.

VI. CONCLUSIONES

1. Se logró caracterizar al ramnolípido producido por *P. aeruginosa* 6K-11 producido con sustrato de bajo costo.
2. Los valores de CMC y Grado de disociación fueron de 5.05 g/L y 0.49 respectivamente
3. La CMC de 5.05 g/L revela que el ramnolípido producido por la cepa *P. aeruginosa* 6K-11 tendrá una mayor capacidad emulsificante cuando se emplee a esa concentración.
4. Los valores de Actividad Emulsificante y Estabilidad Emulsificante fueron de 1.97 UAE/ml y >50% respectivamente.
5. La temperatura en la cual habrá una mejor actividad surfactante es 39 °C, temperatura con la que procesos de biorremediación en laboratorio o extracción de petróleo podrían realizarse sin problemas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S., & Nabi, A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 223(1-3), 143-151.

Alcalde Alvites, M. A. (2018). Influencia de las sales inorgánicas en la optimización de la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11 empleando la metodología de superficie de respuesta.

Amani, H., Sarrafzadeh, M. H., Haghghi, M., & Mehrnia, M. R. (2010). Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 75(1-2), 209-214.

Ansah, E. O., Sugai, Y., Nguete, R., & Sasaki, K. (2018). Integrated microbial enhanced oil recovery (MEOR) simulation: Main influencing parameters and uncertainty assessment. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 171, 784-793.

Ben Ayed, H., Jridi, M., Maalej, H., Nasri, M., & Hmidet, N. (2014). Characterization and stability of biosurfactant produced by *Bacillus mojavenensis* A21 and its application in enhancing solubility of hydrocarbon. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(7), 1007-1014.

Bordas, F., Lafrance, P., & Villemur, R. (2005). Conditions for effective removal of pyrene from an artificially contaminated soil using *Pseudomonas aeruginosa* 57SJ rhamnolipids. *Environmental Pollution*, 138(1), 69-76.

Brand Romero, D. L. (2019). *Efectos de los tensoactivos en el medio ambiente* (Doctoral dissertation, Universidad Santiago de Cali).

Budhathoki, M., Barnee, S. H. R., Shiao, B. J., & Harwell, J. H. (2016). Improved oil recovery by reducing surfactant adsorption with polyelectrolyte in high saline brine. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 498, 66-73.

Chun, C. L., Lee, J. J., & Park, J. W. (2002). Solubilization of PAH mixtures by three different anionic surfactants. *Environmental Pollution*, 118(3), 307-313.

Czajka, A., Hazell, G., & Eastoe, J. (2015). Surfactants at the design limit. *Langmuir*, 31(30), 8205-8217.

Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, 2011.

Edwards, D. A., Luthy, R. G., & Liu, Z. (1991). Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions. *Environmental Science & Technology*, 25(1), 127-133.

Fang, X., Wang, Q., Bai, B., Liu, C. X., Tang, Y., Shuler, P. J., & Goddard, W. A. (2007, February). Engineering rhamnolipid biosurfactants as agents for microbial enhanced oil recovery. In *International Symposium on Oilfield Chemistry*. OnePetro.

Giraldo Zambrano, J. D. (2012). Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* Pb 25: evaluación de su actividad emulsificante y de remoción de metales pesados.

Giraldo, J. D., Gutiérrez, S., & Merino, F. (2014). Actividad emulsificante y de remoción de metales pesados del rhamnolípido producido por *Pseudomonas aeruginosa* PB 25. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(1), 35-44.

Goldman, S., Shabtai, Y., Rubinovitz, C., Rosenberg, E., & Gutnick, D. L. (1982). Emulsan in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1: distribution of cell-free and cell-associated cross-reacting material. *Applied and environmental microbiology*, 44(1), 165-170.

Guzmán Córdova, J. A. (2016). Optimización de parámetros fermentativos para la producción de rhamnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11 por cultivos sumergidos a escala laboratorio.

Henkel, M., Müller, M. M., Kügler, J. H., Lovaglio, R. B., Contiero, J., Syltatk, C., & Hausmann, R. (2012). Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production. *Process Biochemistry*, 47(8), 1207-1219.

Hošková, M., Schreiberová, O., Ježdík, R., Chudoba, J., Masák, J., Sigler, K., & Řezanka, T. (2013). Characterization of rhamnolipids produced by non-pathogenic *Acinetobacter* and *Enterobacter* bacteria. *Bioresource technology*, 130, 510-516.

Kamal, M. S., Hussein, I. A., & Sultan, A. S. (2017). Review on surfactant flooding: phase behavior, retention, IFT, and field applications. *Energy & fuels*, 31(8), 7701-7720.

Kokal, S. L., Abdulmoghini, M. E., Chen, E. Y., & Hintermaier, W. R. Produced Oil-Field Emulsions: A State-Of-The-Art-Review. *Lab R&D Center Report*, 2801.

López Usma, C. A. (2017). Líquidos iónicos surfactantes. Comportamiento liotrópico e interacción con polímeros.

Maneerat S. 2005. Production of biosurfactants using substrates from renewable resources. *Songklanakarin J Sci Technol* 27(3):675–683.

Mańko, D. I. A. N. A., Zdziennicka, A. N. N. A., & Jańczuk, B. R. O. N. I. S. Ł. A. W. (2014). Thermodynamic properties of rhamnolipid micellization and adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 119, 22-29.

Manojlović, J. Ž. (2012). The Krafft temperature of surfactant solutions. *Thermal Science*, 16(suppl. 2), 631-640.

Moussa, T. A. A., Mohamed, M. S., & Samak, N. (2014). Production and characterization of di-rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31, 867-880.

Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental pollution*, 133(2), 183-198.

Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International journal of molecular sciences*, 12(1), 633-654.

Sánchez, M. M. (2010). *Propiedades bioquímicas y biofísicas de rhamnolípidos biotensioactivos* (Doctoral dissertation, Tesis de doctorado, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular Universidad de Murcia).

Sheng, J. J. (2010). Modern chemical enhanced oil recovery: theory and practice. *Gulf Professional Publishing*.

Soberón-Chávez, G., & **Maier**, R. M. (2011). Biosurfactants: a general overview. In *Biosurfactants* (pp. 1-11). Springer, Berlin, Heidelberg.

Varjani, S., & Upasani, V. N. (2019). Evaluation of rhamnolipid production by a halotolerant novel strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource technology*, 288, 121577.

Wang, Q., Fang, X., Bai, B., Liang, X., Shuler, P. J., Goddard III, W. A., & Tang, Y. (2007). Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnology and bioengineering*, 98(4), 842-853.

Williams, R. J., Phillips, J. N., & Mysels, K. J. (1955). The critical micelle concentration of sodium lauryl sulphate at 25 C. *Transactions of the Faraday Society*, 51, 728-737.

Xie, Y. W., Li, Y., & Ye, R. Q. (2005). Effect of alcohols on the phase behavior of microemulsions formed by a biosurfactant—rhamnolipid. *Journal of dispersion science and technology*, 26(4), 455-461.