

Caracterización de Biosurfactantes producidos por *Pseudomonas* Fluorescentes aisladas de emulsiones de petróleo pesado

Miguel Sulbarán Mora¹, Ali Bahsas², William Velásquez³ y Julio Otoniel Rojas^{1*}

¹Laboratorio de Biotecnología de microorganismos "SIXTO DAVID ROJO". Departamento de Biología. ²Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear. Departamento de Química.

³Laboratorio de Análisis Instrumental. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela.

Recibido: 31-03-04 Aceptado: 15-03-05

Resumen

Los biosurfactantes son compuestos producidos por microorganismos y presentan una alta actividad de superficie y propiedades emulsificantes, además de tener baja toxicidad y ser biodegradables. Estas propiedades los hacen útiles en varios procesos biotecnológicos, entre los cuales están su aplicación en la biorremediación de ambientes contaminados. En este trabajo se estudió la producción de biosurfactantes por cepas pertenecientes al grupo de *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de muestras de emulsiones de petróleo pesado. Los biosurfactantes fueron detectados mediante el registro de la disminución de la tensión superficial de los cultivos y también mediante sus capacidades hemolíticas y emulsionantes. Su caracterización se realizó mediante la determinación de azúcares y de proteínas, así como también mediante espectroscopia de infrarrojo IRTF y espectroscopia de RMN. Los mejores sustratos para el crecimiento de las cepas y para la producción de los biosurfactantes resultaron ser los aceites vegetales estudiados en este trabajo. Los resultados obtenidos permiten concluir que estos compuestos son glicolípidos que tienen, entre otras, la características de formar rápidamente emulsiones acuosas de petróleo pesado, disminuyen la tensión superficial entre 28,51 y 30,5 dinas/cm y forman emulsiones estables de parafina líquida en agua durante varios meses a temperatura ambiente. Por medio de los resultados de los análisis de espectroscopia IRTF y RMN se establecieron las estructuras químicas de los biosurfactantes producidos por la cepa de *P. aeruginosa* BIOMI E5, los cuales resultaron ser rhamnolípidos.

Palabras clave: Biorremediación; biosurfactantes; *Pseudomonas* fluorescentes; rhamnolípidos.

Characterization of Biosurfactants of fluorescent *Pseudomonas* isolated from heavy crude oil emulsions

Abstract

The biosurfactants are compounds produced by microorganisms and they present a high surface activity and emulsifying properties, besides having low toxicity and biodegradable being. In this work the biosurfactants production was studied by strains belonging to the group of

* Autor para la correspondencia. Teléfonos 0274-2401309, Fax 0274-2401286, E-mail: oroja@ula.ve

fluorescents *Pseudomonas* isolated from samples of heavy crude oil emulsions. The produced compounds were detected by decrease of the superficial tension of the cultures, by hemolysis activity and by the production of emulsions. They were characterized by several processes: determination of sugar, proteins, IRTF spectroscopy and NMR spectroscopy. The better substrates to growth and the production of biosurfactants were the vegetable oils. The obtained results allow to conclude that these compounds are glycolipids, they form watery emulsions of heavy petroleum quickly, they diminish the superficial tension between 28.51 and 30.5 dinas/cm and they form stable emulsions of liquid paraffin in water during several months in ambient temperature. By means of the results of the spectroscopy analyses to IRTF and NMR settled down the chemical structures of the biosurfactants from *P. aeruginosa* BIOMI E5 strain, which confirmed to be rhamnolipids.

Key words: Bioremediation; biosurfactants; fluorescent pseudomonas; rhamnolipids.

Introducción

Los biosurfactantes son moléculas producidas por microorganismos y presentan una alta actividad de superficie y propiedades emulsificantes, generalmente son metabolitos secundarios excretados por los microorganismos, su principal papel fisiológico es el de permitir crecer a los microorganismos en sustratos inmiscibles en agua mediante la reducción de la tensión superficial de la interfase (1). Pueden ser clasificados principalmente por su composición química, por consiguiente la mayor clase de biosurfactantes comprenden a los glicolípidos, lipopéptidos y lipoproteínas, fosfolípidos y ácidos grasos, surfactantes poliméricos y partículas de surfactantes (2).

La enorme demanda del mercado de los surfactantes ha provocado un incremento en la preparación por síntesis de numerosos surfactantes químicos, principalmente con aplicación de la industria petrolera. Ahora bien, los rápidos avances en la biotecnología e incremento de la necesidad del consumidor de proteger el medio ambiente, provee un buen futuro para considerar seriamente a los surfactantes biológicos como posibles alternativas para la producción de éstos (3).

Los biosurfactantes tienen variadas aplicaciones en el mercado, tanto en la pro-

ducción de petróleo, como en la incorporación en las formulaciones de aceites (4). Entre otras aplicaciones relacionadas con la industria del petróleo están los procesos de biorremediación y dispersión de derrames petroleros, tanto a nivel del suelo como de las aguas, la remoción y movilización de petróleo pegado en el interior de los tanques y también en la recuperación mejorada de petróleo (5-7). Un segundo e importante mercado de los biosurfactantes se encuentra en la polimerización y emulsión de pinturas. También se describen otro uso de los surfactantes en la formulación de asfaltos, cementos, textiles y manufacturación de fibras, adicionalmente en tratamientos de metales, minería, tratamientos de agua y como preservativos de madera (8). Pueden ser usados en la industria de los alimentos, los cosméticos y como productos de limpieza. En la agricultura como diluyentes y dispersantes de fertilizantes y pesticidas (3), así como en el mejoramiento de la penetración de compuestos activos dentro de las plantas, todas estas aplicaciones dependen del tipo de función que presente el compuesto (9).

En este trabajo se reporta la producción de biosurfactantes por especies del grupo de *Pseudomonas* fluorescentes, también se realiza la caracterización química de esos compuestos.

Materiales y Métodos

Microorganismos

Se utilizaron 4 cepas aisladas de muestras de emulsiones de crudo pesado venezolano procedentes del Laboratorio de Biotecnología de Microorganismo "Sixto David Rojo" de la Universidad de Los Andes. Estas fueron identificadas y designadas en trabajos anteriores (10, 11) como: *Pseudomonas putida* BIOMI E1, *P. aeruginosa* BIOMI E3, *P. putida* BIOMI E4 y *P. aeruginosa* BIOMI E5. Las bacterias fueron conservadas a 20°C en cuñas de agar nutritivo.

Preparación de los inóculos

Las bacterias se cultivaron en caldo nutritivo previamente esterilizado por autoclave e incubadas a 30°C durante 24 horas. Para las suspensiones celulares y la producción de los biosurfactantes se utilizó el medio mínimo salino de Davis (12) Este medio fue modificado ya que se utilizó CuCl_2 en vez de CuSO_4 , tampoco agregamos NiCl_2 como lo señala el autor. La fórmula del medio por cada litro de agua destilada es la siguiente: fosfato de potasio dibásico 5,23 g/L, fosfato de potasio monobásico 1,91 g/L, sulfato de magnesio 0,09 g/L y sulfato de amonio 1g/L así como 1mL/L de solución de trazas de elementos (Cloruro de cobalto 20 mg/L, ácido bórico 30 mg/L, sulfato de cinc 10 mg/L, sulfato de cobre 1 mg/L, molibdato de sodio 3 mg/L, sulfato de hierro 10 mg/L y sulfato de magnesio 2,6 mg/L). El pH del medio fue ajustado a 7,3. Las células obtenidas, previa centrifugación a 5.181 x g durante 15 minutos a partir de los caldos nutritivos, fueron lavadas dos veces con el mismo medio salino, recuperándose en cada caso mediante centrifugaciones. Estas se dejaron carenciando por un día en 5 mL de medio salino sin fuente de carbono, constituyendo los inóculos para las pruebas posteriores.

Selección de las cepas productoras de biosurfactantes y sustratos que inducen su producción

Se inocularon los medios con 0,2% v/v de las suspensiones celulares obtenidas anteriormente en el medio mínimo salino. La fuente de carbono utilizadas incluyen: Glicerol, parafina líquida, glucosa, melaza, vinaza, sacarosa y aceites vegetales de maíz, ajonjolí, resino y otras mezclas comerciales (Coposa), estos sustratos se agregaron a una concentración de 1% y 10 % v/v. Los cultivos se incubaron a 30°C \pm 2 sujeto a agitación constante, en un agitador rotatorio a 156 r.p.m. Transcurridos 3 días, los cultivos se centrifugaron a 5.181 x g durante 15 min. Se determinó la tensión superficial de cada sobrenadante con respecto a su control, con la ayuda del tensiómetro de superficie Fisher Modelo 20.

Como controles se dispusieron medios con su respectiva fuente de carbono sin inocular, esto en el caso de las fuentes de carbono solubles en agua. Para el caso de las fuentes de carbono no solubles en agua se utilizó como control solamente el medio salino sin inocular, ya que previamente habíamos determinado que la presencia de estos sustratos hidrófobos no influyen en las medidas. Se registró en todos los casos la aparición de espuma estable en los cultivos. Denominamos espuma estable a aquella que permanece luego de la agitación. Este criterio fue tomado en cuenta para la selección de los productores de biosurfactante.

Otro criterio considerado fue la capacidad hemolítica de cada una de las cepas bacterianas. Para lo cual se realizó la prueba clásica de capacidad hemolítica en placas de agar sangre. Las mismas fueron incubadas a 30 \pm 2°C durante 2 días; al cabo de este tiempo se verificó la presencia de halos alrededor de las colonias.

Producción de biosurfactantes a partir de glicerol

Se prepararon cultivos en matraces de 1 L que contenían 300 mL del medio mínimo salino con glicerol como fuente de carbono a una concentración del 1% v/v. Se cultivaron durante tres días a $30^{\circ}\text{C} \pm 2$ y bajo agitación constante.

En todos los cultivos la biomasa fue eliminada por centrifugación, previa esterilización, a $30.100 \times g$ durante 15 min, a 4°C lo cual permitió eliminar completamente los restos celulares facilitando la obtención de biosurfactantes más puros. Antes de guardar los sobrenadantes bajo congelación a -20°C , se hizo un registro, de la tensión superficial y la formación de espuma obtenida mediante los procedimientos señalados anteriormente.

Extracción y concentración de los biosurfactantes

Los biosurfactantes fueron extraídos con acetato de etilo, con un volumen de 1,5 del sobrenadante en un embudo de separación de 1 L, previa acidificación del medio hasta un valor de pH igual a 2 con HCL 1N (12). Luego de la concentración de las muestras de biosurfactantes en el rotavapor, un alícuota de cada una fue pesada, debido a su alta viscosidad, para luego ser disuelto en una solución de bicarbonato de sodio 0,1M; se ajustó la concentración hasta un valor del 1% p/v. Otra alícuota fue conservada bajo congelamiento a -20°C , para análisis espectroscópicos IRTF y posterior elucidación de la estructura mediante RMN. El control, medio salino, sin inocular y con glicerol como sustrato, recibió el mismo tratamiento que las muestras.

Detección de los biosurfactantes mediante cromatografía de capa fina (TLC)

Se realizó sobre laminas para capa fina preparativas elaboradas con Silicagel 60 F₂₅₄ de 0,25 mm de espesor con indicador de fluorescencia (Merck). Las soluciones de los

biosurfactantes con bicarbonato de sodio y las muestras controles provenientes se agregaron con pipetas pasteur. Se desarrollaron sobre la placa con el sistema de solventes metanol-cloroformo en una proporción de 1,3 volúmenes de metanol y 7 volúmenes de cloroformo. El revelado de las placas se realizó con luz UV mediante una lámpara mineral Light UV lejano y cercano del tipo UVSL-25, y posteriormente con una mezcla reveladora conteniendo 70% de ácido sulfúrico, 20% de ácido acético y 10% agua.

Estudio de la naturaleza química de los biosurfactantes

Determinación cualitativa de azúcares

Se determinó la presencia de azúcares totales en las soluciones de los biosurfactantes con bicarbonato de sodio. Se hidrolizaron previamente 5 mL de cada una de las soluciones (13), y se mezclaron con 5 mL de una solución de ácido clorhídrico 2N. La mezcla se mantuvo a una temperatura de 100°C durante 2 horas. Posteriormente la muestra permanecía en reposo durante 6 horas hasta alcanzar la temperatura ambiente, se agregó seguidamente acetato de etilo para descartar la mitad hidrofóbica del compuesto hidrolizado, y por último se recolectó la fase acuosa de cada muestra (14). A cada muestra acuosa se le determinó la presencia de azúcares mediante el método de fenol - ácido sulfúrico. Se midió la absorbancia a 480 nm con respecto al blanco (15).

Determinación de proteínas

Se agregaron 120 μL de muestra de biosurfactantes en tubos de ensayo, se adicionó a cada tubo 3 mL de una solución de ninhidrina a una concentración de 0,2 % en etanol, se agitaron por 10 segundos y se dejaron en reposo durante una hora. Se observó la formación de color (16). Para esta experiencia se utilizaron tres controles, 2 positivos (soluciones de alanina y albúmina de bovino)

y otro negativo (control preparado anteriormente con medio salino sin inocular).

Análisis de la estructura química de los biosurfactantes

La caracterización de los grupos funcionales de los biosurfactantes se realizó por medio de la técnica de Espectroscopia de Infrarrojo con Transformadas de Fourier. Para la elucidación su estructura se utilizó la técnica de Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear, en un espectrómetro BRUKER Advance DRX 400 MHz.

Estudio de las propiedades de los biosurfactantes

Índice de Emulsión

El índice de emulsión % PE₁₂ se definió como el porcentaje de parafina líquida emulsionada durante 2 minutos en un agitador Vortex a 30°C registrada después de 12 horas. La emulsión se realizó en tubos calibrados de 15 mL, se agregaron 6 mL de parafina y 4 mL de las soluciones de los biosurfactantes con bicarbonato de sodio. Los valores se obtuvieron determinando la cantidad de parafina no emulsionada en los tubos, con relación a la cantidad total de parafina agregada.

También fue determinada la actividad hemolítica de los compuestos a partir de estas soluciones en placas de agar sangre incubadas a 30°C ± 0,2 durante 1 hora.

Actividad detergente y tensoactiva sobre muestras de crudo pesado

Se determinó la capacidad de los biosurfactantes para remover crudo pesado adherido a las paredes del vidrio y por ende sus propiedades de detergencia. Se agregaron a dos tubos de ensayo aproximadamente 10 mL de crudo pesado tipo Cerro Negro. A uno se agregó 10 mL de la solución de bicarbonato de sodio 0,1M sin biosurfactantes, utilizado como control, y al otro tubo 10 mL de la solución de biosurfactante disuelto en bicarbonato de sodio a 0,1M, obtenido a

partir de la cepa de *P. aeruginosa* BIOMI E3. Los tubos fueron agitados en el vortex por 10 segundos y se dejaron sujeto a reposo por una hora a temperatura ambiente. Se descartó el contenido de los tubos y se observó la capacidad del tenso activo para desprender el crudo adherido en la superficie del tubo de vidrio.

Resultados y Discusión

Selección de las cepas productoras de biosurfactantes y de los sustratos que inducen su producción

En la Tabla 1 se representan los resultados del crecimiento de las cuatro cepas sobre los 10 sustratos estudiados a la concentración de 1% v/v o p/v. A concentraciones de sustrato del 10% presentaron menor crecimiento (menor turbidez relativa) o hubo inhibición del crecimiento para el caso de la parafina líquida. Los sustratos capaces de provocar crecimiento favorable corresponden a los aceites vegetales. La emulsión obtenida a partir de los mismos presentó mayor turbidez. Estos compuestos presentaron poca solubilidad en agua pero capaces de inducir la producción de sustancias tenso-activas. Aunque existen reportes de síntesis de biosurfactantes por microorganismos que degradan hidrocarburos, algunos corresponden a sustratos hidrosolubles tales como glucosa, sacarosa, glicerol, o etanol (12, 17-19). A partir de sacarosa no se observó crecimiento con las cepa estudiadas. Medios conteniendo melaza y vinaza, durante los tres días de incubación, evidenciaron poco crecimiento relativo.

Los valores más bajos de tensión superficial con respecto al control correspondieron a cultivos crecidos en presencia de aceites vegetales. En aceite de maíz el menor valor de tensión superficial fue de 23, 15 Din/cm para la cepa BIOMI E3; en aceite de ajonjolí el menor valor fue de 21,9 Din/cm para la cepa BIOMI E5; en aceite de resino fue de 24,15 Din/cm para la cepa BIOMI E3 y en la mezcla comercial Coposa se registró un

Tabla 1
Crecimiento microbiano de las cepas estudiadas con distintas fuentes de carbono.

Fuente de carbono	BIOMI E1	BIOMI E3	BIOMI E4	BIOMI E5
Glicerol	**	**	**	**
Glucosa	**	**	**	**
Sacarosa	No	No	No	No
Melaza	*	*	*	*
Vinaza	*	*	*	*
Parafina	No	**	No	**
Aceite de Maíz	**	***	*	***
Aceite de Ajonjolí	***	***	***	***
Mezcla comercial (Coposa)	**	***	*	***
Aceite de Resino	***	***	***	***

Los cultivos fueron hechos en medio salino con 1% de cada fuente de carbono. Fueron incubadas en agitación a 30°C durante 3 días. El crecimiento se determinó mediante la observación del incremento relativo de la turbidez. * Poco crecimiento, **Buen crecimiento, ***Muy buen crecimiento, No: No se registro crecimiento con respecto al control (medios no inoculados).

menor valor de 22,65 Dinas/cm para la cepa BIOMI E5. En cultivos logrados en presencia de glicerol o glucosa también se observaron caídas significativas de la tensión superficial sobre todo para las especies de *P. aeruginosa* BIOMI E3 y *P. aeruginosa* BIOMI E5; En presencia de melaza y vinaza los valores bajos en la tensión superficial no fueron significativos para ninguna de las cepas, mientras que en el caso de los cultivos con parafina líquida para las cepas de *P. aeruginosa* BIOMI E3 y *P. aeruginosa* BIOMI E5, las caídas en la tensión superficial fueron también significativas.

Con respecto a la prueba de hemólisis, las cepas de *P. aeruginosa* BIOMI E3 y BIOMI E5 resultaron ser β -hemolíticas (resultados no mostrados), lo cual ya ha sido reportada previamente para este tipo de bacterias (20). Las cepas de *P. putida* BIOMI E1 y BIOMI E4 no son hemolíticas a los dos días de incubación.

Aunque se obtuvieron los mejores resultados con los aceites vegetales, decidimos utilizar glicerol para producir los bio-

surfactantes porque interfieren menos, durante el proceso de extracción y purificación, que los aceites. Estos últimos también son solubles en los solventes de extracción y por ende se necesitarían pasos adicionales de purificación para la obtención de los biosurfactantes. Se seleccionaron las dos cepas de *P. aeruginosa* como posibles productoras de este tipo de compuestos.

Por otro lado, en cultivos de la cepa de *Pseudomonas putida* BIOMI E1 que no fueron procesados a los 3 días como estaba programado sino que permanecieron, debido a problemas técnicos relacionados con la centrifuga, en incubación durante 7 días a 30°C, en agitación constante (156 r.p.m.), se observó que a partir de los 6 días de incubación se registraba la formación de espuma en el cultivo. Posteriormente a los 7 días, este cultivo fue centrifugado y se le hizo pruebas de tensión superficial, obteniendo caídas significativas similares a las obtenidas para los cultivos centrifugado de las especies de *P. aeruginosa*. Nos pareció sumamente interesante este resultado ya que, existiendo pocos

trabajos reportados sobre los biosurfactantes producidos por *P. putida* (21) esta especie es generalmente no patógena en comparación con *P. aeruginosa*.

Debido a los resultados anteriores se evaluó el crecimiento de las cepas en medios de agar sangre a 30°C durante 7 días, se pretendía también observar si ocurría algún cambio en la actividad hemolítica de las cepas en comparación con los cultivos incubados durante 2 días. Estos cambios podrían dar algún indicio del resultado obtenido con la cepa de *P. putida* BIOMI E1 en el medio salino durante 7 días de crecimiento.

Análisis de los resultados mostraron diferencias morfológicas colonial de las cepas de *P. aeruginosa* (BIOMI E5, BIOMI E3) y *P. putida* (BIOMI E4 y BIOMI E1), por lo cual se descartó la presencia de algún contaminante. Sin embargo se evidenció en forma relevante que las cepa de *P. putida* BIOMI E1 y *P. putida* BIOMI E4 causan α -hemólisis efecto no antes reportado en la literatura revisada. Esto probablemente se deba a que generalmente las pruebas bacteriológicas convencionales se realizan en un lapso de 3 días. En el presente estudio el lapso de incubación fue de 7 días y en presencia del medio mínimo salino Davis con glicerol como sustrato, pudiendo ser responsable de dicha expresión fenotípica por parte de la cepa en cuestión. Este cambio metabólico que acompañado de la producción de un compuesto tenso-activo a los 7 días de crecimiento es producto de variables no documentadas en el presente trabajo.

Detección de los biosurfactantes mediante cromatografía de capa fina (TLC)

Análisis de los resultados de esta prueba indicaron que muestras provenientes de *P. aeruginosa* BIOMI E3 y *P. aeruginosa* BIOMI E5 corresponden a mezcla de dos compuestos al considerar los valores de Rf obtenidos. Dichos compuestos, según la magnitud de la mancha revelada, están presentes en distintas concentraciones, ya que sobre

Tabla 2

Valores de los Rf obtenidos en la cromatografía de capa fina para los compuestos de las cepas de *P. aeruginosa* BIOMI E3 y BIOMI E5.

Solución de biosurfactantes	(Rf) Compuesto A	(Rf) Compuesto B
BIOMI E5	0,4	0,64
BIOMI E3	0,36	0,54

La cromatografía se realizó sobre placas de Silicagel 60 F₂₅₄ de 0,2 mm de espesor. El solvente utilizado fue metanol-cloroformo en una relación 1,3: 7 y fueron revelados mediante luz ultravioleta y una mezcla reveladora de 70% de ácido sulfúrico, 20% de ácido acético y 10% de agua. La solución de los biosurfactantes fue obtenida del caldo de cultivo previamente centrifugado y extraídos con acetato de etilo. Luego de concentrarlos, mediante rotavapor, se suspendieron en una solución de bicarbonato de sodio 0,1 M.

la placa cromatográfica donde se corrieron ambas muestras, se observó la presencia de 2 manchas bien definidas (resultados no mostrados). Adicionalmente, la mezcla de compuestos parece ser similar para ambas bacterias de acuerdo al desarrollo del cromatograma con la misma mezcla de solventes y valores Rf similares (Tabla 2).

Naturaleza química de los biosurfactantes

Contenido de azúcares

Se detectó la presencia de azúcares totales en las porciones hidrofílicas de los biosurfactantes de las soluciones de los extractos (Tabla 3) de las cepas de *P. putida* BIOMI E1 incubada durante 7 días, *P. aeruginosa* BIOMI E3, y *P. aeruginosa* BIOMI E5 incubadas durante 3 días, sugiriendo la presencia de carbohidratos. Para las muestras de la cepa *P. putida* BIOMI E4, incubada durante 3 días, el resultado fue negativo al igual que el control.

Contenido de péptidos

Los resultados obtenidos de la determinación de péptidos o aminoácidos en mues-

tras de las soluciones de los biosurfactantes, indicaron ausencia de reacciones visibles con la ninhidrina. En cuanto a la detección de péptidos cortos es relevante señalar que la reacción ocurre con un grupo amino libre, sin la liberación de CO_2 . Generalmente la aparición de color es más intensa en la reacción con aminoácidos que con péptidos, por lo tanto la presencia de estructuras peptídicas debe estudiarse a través de otras técnicas más sensibles como electroforesis capilar o HPLC-RP.

Análisis de la estructura química de los biosurfactantes

IRTF

Se identificaron diferentes grupos funcionales en los espectros de los biosurfactantes crudos producidos por las cepas de *P. aeruginosa* BIOMI E3, BIOMI E5 y BIOMI E1, correspondientes a alcoholes alifáticos, alcoholes ácidos de grupos carboxílicos y grupos carbonilos, cuyo espectro de absorción varía entre 1.650 cm^{-1} y 1.780 cm^{-1} . No se logró registrar grupos funcional en las soluciones de la cepa de *P. putida* BIOMI E4 (Figura 1).

Espectroscopia infrarroja para la cera BIOMI E1

Se determinó que las sustancias tenso activas producidas por *P. putida* BIOMI E1 son de naturaleza glicolípídica. Se elucidaron los posibles grupos funcionales presentes en esta molécula, indicando que la misma contenía los mismos grupos señalados anteriormente pero probablemente en su estructura presente alquenos, amidas ó aminas, según el espectro infrarrojo marcaría la diferencia con respecto a los espectros de los biosurfactantes producidos por *P. aeruginosa* BIOMI E3 y *P. aeruginosa* BIOMI E5.

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

En muestras correspondientes a *P. aeruginosa* BIOMI E3 y BIOMI E5 se confirmó que los compuestos de naturaleza tenso-ac-

Tabla 3
Resultados de densidad óptica de la prueba de azúcares totales para las soluciones de los biosurfactantes de las cepas en estudio.

Extractos de las cepas	D.O. (480nm)
BIOMI E1	0,589
BIOMI E3	0,607
BIOMI E4	0,094
BIOMI E5	0,605

La determinación de azúcares totales se realizó mediante el método de fenol-ácido sulfúrico y se midió la D.O a 480 nm. El control consistió de los medios salinos sin inocular. El valor de densidad óptica de la cepa BIOMI E4 no se consideró significativo.

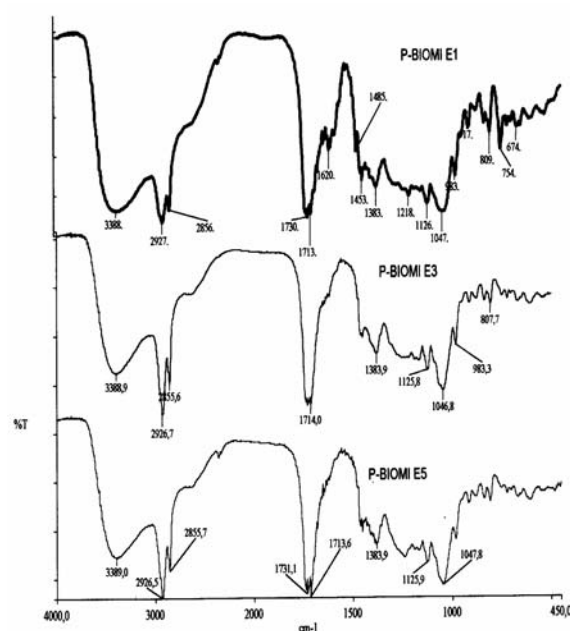


Figura 1. Espectros de IR del biosurfactante crudo de *P. aeruginosa* BIOMI E5 comparado con los espectros de los extractos crudos de *P. aeruginosa* BIOMI E3 y *P. putida* BIOMI E1.

tiva producidos por estas bacterias son rhamnolípidos (Figura 2). Adicionalmente ambas cepas fueron capaces de sintetizar una mezcla de al menos dos compuestos, resultados que coinciden con los obtenidos en

los análisis con TLC. La estructura elucidada de uno de los compuestos proveniente de la cepa *P. aeruginosa* BIOMI E5 fue clasificado como rhamnolípidos de tipo III, producto típico producido por *P. aeruginosa* (1, 18).

Adicionalmente el otro compuesto detectado en los extractos contiene una sola molécula de rhamnosa, un monorhamnólido, sin embargo por razones técnicas no fue posible elucidar completamente la porción hidrocarbonada del compuesto, por lo cual se infiere que corresponde a un rhamnólido de tipo I, también producto típico de *P. aeruginosa*. En la misma figura se representan los espectros protónicos del extracto crudo de BIOMI E5 y BIOMI E3. Resaltando la similitud que existe entre ambos espectros, se infiere que ambos biosurfactantes son iguales, ya que las pequeñas diferencias observadas pueden deberse a que con el extracto crudo de *P. aeruginosa* BIOMI E5 se utilizó metanol deuterado como solvente y con el extracto crudo de *P. aeruginosa* BIOMI E3 se utilizó dimetil sulfóxido deuterado. Los solventes utilizados pueden dar origen a ligeras variaciones.

Propiedades de los biosurfactantes

En la Tabla 4 se representan los resultados de la prueba de emulsión. En las muestras provenientes de la cepa *P. putida* BIOMI E4 no se observó emulsión; en muestras correspondientes a *P. aeruginosa* BIOMI E5 se reportó un porcentaje de emulsión del 50%, mientras que para BIOMI E3 el porcentaje fue de 83,13%. En las muestras originadas de *P. putida* BIOMI E1 se obtuvo un valor del 16,6%. Adicionalmente, se pudo observar que la emulsión de la parafina causada por los biosurfactantes de *P. aeruginosa* BIOMI E5 es similar en cuanto a la apariencia de la distribución, a la emulsión causada por el extracto de la cepa BIOMI E3, a pesar de que el porcentaje de parafina emulsionada para el extracto de la cepa BIOMI E3 es mayor que el de la cepa BIOMI E5. Ya que los resultados arrojados por los análisis de TLC, de IRTF y de RMN indican que se tratan

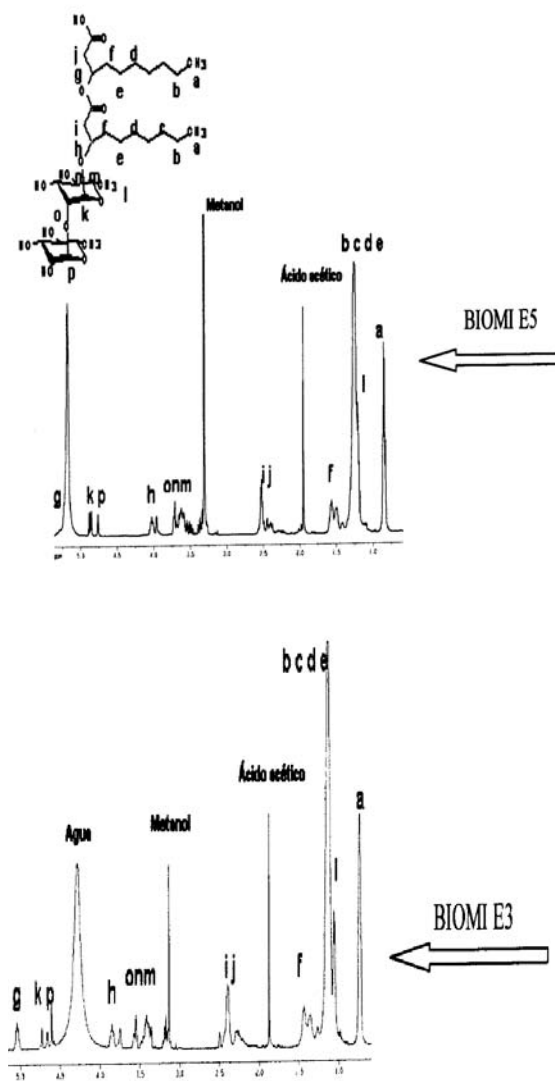


Figura 2. Espectros de RMNH^1 de los extractos crudos de *P. aeruginosa* BIOMI E5 comparado con el espectro de RMNH^1 de *P. aeruginosa* BIOMI E3, el primero fue realizado con metanol deuterado como solvente y para el segundo se utilizó como solvente dimetil sulfóxido.

de moléculas similares, la diferencia señalada anteriormente podría deberse a que el extracto crudo de la cepa BIOMI E3 estuviese enriquecido con el biosurfactante. En cuan-

Tabla 4
Índice de emulsión de las soluciones de biosurfactantes

	CONTROL	BIOMI E1	BIOMI E3	BIOMI E4	BIOMI E5
%PE ₁₂	0	16,6	83,13	0	50

%PE₁₂ representa la cantidad de parafina líquida emulsionada durante 2 minutos y mantenida a 30°C durante 12 horas. Los valores se obtuvieron midiendo la cantidad de parafina no emulsionada en tubos calibrados de 15 mL y posteriormente relacionando este valor con el volumen total de parafina agregada. La fases internas de las emulsiones fueron parafina líquida (6 mL) y la fases externas fueron 4 mL de la solución de biosurfactante de cada cepa. El control fue el extracto del medio con glicerol, sin inocular.

to a la estabilidad de las emulsiones producidas por las soluciones de los biosurfactantes de *P. aeruginosa* BIOMI E5 y BIOMI E3 a temperatura ambiente, su duración fue de 4 a 8 meses, mientras que la estabilidad de la emulsión producida por la solución del extracto de *P. putida* BIOMI E1 se mantuvo solo por algunos días. Estas diferencias presentes en el tipo de emulsión y tiempo de estabilidad podría deberse a los grupos funcionales detectados por IRTF que alteran el balance hidrofílico lipofílico (HLB) del biosurfactante, originando un comportamiento distinto al observado en las emulsiones producidas por las soluciones de los biosurfactantes de *P. aeruginosa* BIOMI E5 y BIOMI E3. Adicionalmente se determinó la presencia de actividad hemolítica en los biosurfactantes de *P. putida* BIOMI E1, *P. aeruginosa* BIOMI E3 y BIOMI E5.

Solubilización de crudo pesado

Se determinó visualmente la capacidad que tienen el compuesto o mezcla originado por la cepa de *P. aeruginosa* BIOMI E3 para permitir la remoción del crudo pesado, dejando las paredes del tubo de ensayo libre del mismo. Esto demuestra la capacidad detergente de este tipo de compuesto (22- 24). Los demás biosurfactantes no se utilizaron debido a que no se contaba con suficiente solución para esta prueba.

Es relevante destacar que los compuestos tenso-activos producidos por las bacterias estudiadas principalmente correspondiente a *P. aeruginosa* soportan cambios bruscos de pH y temperatura. Aspecto que se

evidencia desde los cultivos así como en los sucesivos pasos de extracción, tanto la temperatura como el pH se han variado drásticamente, desde temperaturas de 121°C en el paso de esterilización, hasta temperaturas de - 20°C durante congelamiento.

Tensión superficial

En cuanto a la tensión superficial, tenemos que para el agua fue de 68,42 dinas/cm. La pequeña disminución que se observa con respecto al valor estándar puede deberse a la modificación implementadas para medir volúmenes menores a los requeridos por el aparato y temperatura operativa. Los resultados de tensión superficial de las soluciones de los biosurfactantes fueron de 30,86 dinas/cm para la cepa BIOMI E1; 28,51 dinas/cm para la cepa BIOMI E3; 51,03 dinas/cm para la BIOMI E4 y 30,5 dinas/cm para la cepa BIOMI E4. El control presentó un valor de 51,03 dinas/cm. Adicionalmente, se puede ver que todos los extractos que presentan caída en la tensión superficial tienen valores muy aproximados entre sí, estos valores no se pueden tomar como pertenecientes a un solo compuesto ya que se trata de biosurfactantes crudos.

Conclusiones

Se comprobó que los microorganismos que conforman los cultivos mixtos utilizados en la biodegradación de gasoil y dibenzotiofeno disueltos en parafina en trabajos anteriores (10, 11) forman emulsiones debido a la producción de biosurfactantes. Esta característica aunada a la capacidad de las

cepas para degradar hidrocarburos las hace potencialmente útiles en procesos de biorremediación y tratamiento de contaminantes.

Las cepas *P. aeruginosa* BIOMI E5 y *P. aeruginosa* BIOMI E3 producen biosurfactantes en medio salino con glicerol como fuente de carbono. Adicionalmente, se comprobó que son β -hemolíticas a los 2 días de crecimiento. Los sustratos óptimos para la producción de estos biosurfactantes y para el crecimiento de los microorganismos en cuestión resultaron ser los aceites vegetales de maíz, ajonjolí, resino y otras mezclas comerciales (Coposa). Estos aceites podría ser una elección adecuada a la hora de producir estos compuestos en sustratos económicos y podemos pensar que aparte de los biosurfactantes se producirían otros metabolitos provenientes de la degradación de los aceites con propiedades también tenso activas. Tal vez, por esta razón encontramos los valores más bajos de tensión superficial en los sobrenadantes de los cultivos realizados con estos aceite vegetales.

En cuanto a las cepas de *P. putida* BIOMI E1 y *P. putida* BIOMI E4 son α -hemolíticas a los 7 días de incubación. Se determinó que la cepa de *P. putida* BIOMI E1 mantenida durante este tiempo en incubación, produce un compuesto tenso-activo de naturaleza glicolípida con características similares a los biosurfactantes producidos por las cepas de *P. aeruginosa* BIOMI E5 y *P. aeruginosa* BIOMI E3. Pese a que no se realizaron estudios concluyentes al respecto es interesante el resultado anterior ya que se trata de una especie no patógena que podría utilizarse en la producción del biosurfactante.

Los biosurfactantes estudiados poseen la actividad hemolítica registradas en las cepas que los producen. Se determinó que estas sustancias tenso-activas soportan cambios bruscos de temperatura y de pH, y que además son eficientes en la formación de emulsiones de hidrocarburos tales como parafina líquida y petróleo. Estas fueron estables por más de 3 meses y se comprobó tam-

bién su eficientes en la remoción (detergencia) de crudo pesado.

Se elucidaron los posibles grupos funcionales presentes en los biosurfactantes por la técnica de IR, la cual indicó que los compuestos originados por las cepas de *P. aeruginosa* BIOMI E3 y *P. aeruginosa* BIOMI E5 contenían grupos como alcoholes, ácidos carboxílicos, carbonilos, grupos metilos y cadenas de metilenos mayores o iguales a cuatro miembros, además se sugirió por medio de esta técnica que probablemente son sustancias muy similares. Las conclusiones de los análisis de Resonancia Magnética Nuclear nos permiten conocer que los biosurfactantes producidos por las bacterias de *P. aeruginosa* BIOMI E3 y *P. aeruginosa* BIOMI E5 son rhamnolípidos de tipo III y probablemente también se encuentre presente el de tipo I.

Agradecimientos

El siguiente trabajo fue financiado por el proyecto C-1111-01-03-F del CDCHT de la Universidad de Los Andes.

Referencias Bibliográficas

1. FIECHTER A. *Trends Biotechnol* 10: 208-217, 1992.
2. DESAI J.D., BANAT I.M. *Microbiol Mol Rev* 61: 47-64, 1997.
3. BANAT I.M., MAKKAR R.S., CAMEOTRA S.S. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 459-508, 2000.
4. VAN DYKE M.I., GULLEY S., LEE H., TREVORS J.T. *Can J Microbiol* 39: 1071-1080, 1993.
5. GEORGIU G., LIN S.C., SHARMA M. *Biotechnology* 10: 60-65, 1992.
6. KHIRE J.M., KHAN M.I. *Enzyme Microb Technol* 16: 170-172, 1994.
7. KHIRE J.M., KHAN M.I. *Enzyme Microb Technol* 16: 258-259, 1994.
8. LAYMAN P.L. *Chem Eng News* 23: 23-48, 1985.

9. KOSARIC N., CAIRNS W.L., GRAY NCC. **Surfactant science series** Dekker, New York (USA), pp 247-331, 1987.
10. ROJAS J.O. Procesos biotecnológicos aplicables a la industria petrolera nacional. Parte I Formación de un cultivo mixto bacteriano para la biodegradación del gasoil (Trabajo de Ascenso). Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela) pp. 64, 2000.
11. MONTILLA L., JULIO C. Selección, identificación y caracterización fenotípica y fisiológica de *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de muestras de petróleo pesado venezolano (Tesis de Grado). Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela) pp. 58, 2002.
12. NIELSEN T.H., CHRISTOPHERSEN C., ANTHONI U., SORENSEN J. **J Appl Microbiol** 86: 80-90, 1999.
13. RÖMLING U., WINGENDER J., MÜLLER H., TÜMMLER B. **Appl Environ Microbiol** 60: 1734-1738, 1994.
14. CHAWALA C., JIAN WU., LU-KWANG JU. **Biotechnol And Bioeng** 72(1): 25-33, 2001.
15. DUBOIS M., GILLES K., HAMILTON J., REBER P., SMITH F. **Analytical Chemistry** 3: 350-356, 1956.
16. YUSTE L., CORBELLA M.E., TURIÉGANO M.J., KARLSON U., PUYET A., ROJO F. **FEMS Microbiol Ecol** 32: 69-75, 2000.
17. COOPER M.C., GOLDENBERG. B.G. **Appl Environ Microbiol** 53: 224-229, 1987.
18. GUERRA S., L.H., KAPPELI O., FLECHTER A. **Appl Microbiol Biotechnol** 24: 443-448, 1986.
19. HOMMEL R.K., WEBER L., WEISS A., HIMMELREICH U., RILKE O., KLEBER H.P. **J Biotechnol** 33:147-155, 1994.
20. KONEMAN E. **Diagnóstico Microbiológico** Texto y Atlas a color. Quinta Edición. Editorial Panamericana. pp 590-591, 1999.
21. ULEVA B.K., IVANOV G.R., NELLY E.C. **Z Naturforsch** 57C: 356-360, 2002.
22. OBERBREMER A., MULLER-HURTIG R., WAGNER F. **Appl Microbiol Biotechnol** 32: 485-489, 1990.
23. SCHIEBENBOGEN K., ZYTNER R.G., LEE H., TREVORS JT. **J Chem Technol Biotechnol** 59:53-59, 1994.
24. ZHANG Y., MAIER W.J., MILLER RM. **Environ Sci Technol** 31:2211-2217, 1997.