



**Universidad Central de
Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología**

Detección e Identificación de Biosurfactantes y/o
Bioemulsificantes producidos por Aislados Bacterianos
asociados a una Fosa Petrolera de la Faja Petrolífera del
Orinoco

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por la Br. Oriana Santos como
requisito para optar al Título de
Licenciado en Biología.
Tutora: Dra. Nora Malaver

CARACAS, VENEZUELA

MAYO - 2017



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Dirección

Caracas, 09 de julio de 2015

Estimada ciudadana:
Santos G., Oriana C.
Presente.-

Por medio de la presente me dirijo a usted a fin de informarle que el jurado del Seminario I, correspondiente al proyecto del Trabajo Especial de Grado (TEG) inscrito por usted, titulado: **"Comparación de métodos de detección de biosurfactantes producidos por aislados bacterianos asociados al área de influencia de una fosa petrolera del bloque Junín-Faja Petrolífera del Orinoco"** fue aprobado por el Consejo de Escuela de Biología en su sesión del día 02/07/2015. A partir de la fecha de recibo de la presente notificación, usted deberá revisar el proyecto y fijar conjuntamente con la tutora y los jurados la fecha de presentación dentro del semestre lectivo (**fecha máxima: 13/08/2015**). Este jurado será el mismo que evaluará el Seminario II y TEG y quedo integrado de la siguiente manera:

Tutor(es):	Principales:	Suplentes:
Tutora: Nora Malaver	Jurado: Alejandra Zamora Jurado: Ismael Hernández	Jurado: Angela de Sisto Materano Jurado: Marcia Toro Jurado: José Córdova

Así mismo le informo, que debe comunicar con un **mínimo de cinco días de anticipado**, la fecha de presentación del Seminario I, Seminario II y/o Trabajo Especial de Grado; y entregar en la Dirección de la Escuela: invitación a la presentación, Resumen del Trabajo y resumen de la bibliografía.

Agradeciendo la atención a esta comunicación,

Por el Consejo de Escuela de Biología

Dr. Jesús Guillermo Romero Muñoz
Director



/br.-

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA

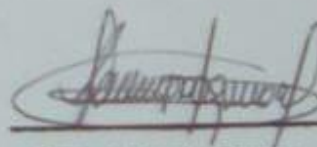
ACTA

Quiénes suscriben la presente acta, miembros del jurado designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el siguiente Trabajo Especial de Grado por la Br. **Oriana Cristina Santos Goncalves**, CI-18.837.801, titulado "Detección e Identificación de Biosurfactantes y/o Bioemulsificantes producidos por Aislados Bacterianos asociados a una Fosa Petrolera de la Faja Petrolífera del Orinoco", para optar al título de Licenciada en Biología mención Ecología, consideramos que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos con los reglamentos respectivos lo consideramos: **APROBADO**.

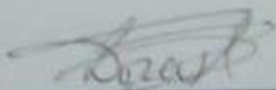
Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 17 días del mes de mayo del año 2017, dejando constar que la Profa. Nora Malaver actuó como coordinadora del jurado examinador.



Prof. Ismael Hernández



Profa. Alejandra Zamora



Profa. Nora Malaver
(Tutora)

Agradecimientos

Ante todo quiero agradecer a Dios, no solo por permitirme finalizar este trabajo de manera satisfactoria, sino también por poner en mi camino a tantas personas maravillosas que sin su ayuda esta tesis no habría podido lograrse.

Mucha gente estuvo apoyándome a lo largo de este trabajo y por ellos es que pude seguir adelante. Entre estas personas esta mi tutora, Nora Malavar y a Mary del Pino, que siempre me brindaron su apoyo y mano amiga en momentos en difíciles. Tambien agradezco a mis jurados, Prof. Ismael Hernandez, Profa. Alejandra Zamora y Prof. José Cordoba, algunos si bien no estaban familiarizados con el tema de este trabajo especial de grado, dan lo mejor de si mismo y presentan un gran interes en como se llevo a cabo todo lo relacionado con el desarrollo de esta tesis de licenciatura. Aquellas personas que me brindaron sus espacios de trabajo, en el laborarotio Prof. Alonso Ojeda y Lic. Ana Jamila del Laboratorio de Ecología de Ecosistemas, M.S.c. María Chaveli y Lic. José Portela del Laboratorio de Geoquímica Ambiental y al Prof. Jimmy Castillo y sus pasantes del laboratorio de Espectroscopia Láser de la Escuela de Química, a todos ellos se merecen una especial agradecimiento de mi parte pues sin su ayuda este trabajo no habriia podido realizarse.

A mis compañeros de laboratorio que me soportaron y apoyaron a lo largo de este trabajo y festejaron conmigo cuando los experimentos mostraban resultados favorables. A todos mis amigos que no solo me ayudaron y apoyaron, sino que también me soportaron en esos momentos donde creía que no iba a poder lograr finalizar este arduo viaje.

Y por sobre todos a mi familia, en especial mis padres, María Irene de Santos y Carlos Santos, que siempre estuvieron a mi lado y me apoyaron en todo momento y nunca dejaron de animarme a que terminara esta tesis y me sintiera orgullosa de todo lo que he logrado hasta este punto.

Contenido

Resumen.....	viii
Indice de Figuras.....	x
Indice de Tablas.....	xii
Indice de Anexos	xiii
I. Introducción.....	1
II. Marco Teórico.....	4
1. Surfactantes.....	4
2. Aplicaciones en ambientes contaminados por la industria petrolera.....	6
3. Biosurfactantes.....	7
3.1. Tipos de biosurfactantes	9
3.2. Bioemulsificantes	12
3.3. Tipos de Bioemulsificantes	14
4. Factores que afectan la producción de biosurfactantes.....	16
• Fuente de carbono.....	17
• Factores ambientales.....	19
• Tiempo de producción	20
5. Métodos de detección de Biosurfactante	21
a. Métodos basados en la medición y el comportamiento de la tensión superficial/interfacial	24
b. Métodos de detección por comportamiento específico.....	25
6. Mecanismos de extracción de biosurfactantes/bioemulsificantes	26
7. Identificación de los biosurfactantes	28
III. Antecedentes	31
1. Antecedentes internacionales	31
2. Antecedentes nacionales	35
3. Hipótesis	40
IV. Objetivos.....	40
1. Objetivo General	40
2. Objetivos específicos.....	40
V. Metodología.....	41
1. Selección de las cepas bacterianas con potencial de producción de biosurfactante	41

1.1	Selección de las cepas	41
1.2	Construcción de cepario.....	42
2.	Obtención del biosurfactante	42
2.1	Producción del biosurfactante	42
2.2	Extracción del biosurfactante	43
3.	Metodología para detectar cepas Productoras de Biosurfactante	43
3.1	Estudio de Producción de Espuma	43
3.2	Actividad Hemolítica	44
3.3	Agar Azul.....	44
3.4	Producción de Lipasa.....	45
3.5	Actividad Emulsificante.....	45
3.6	Adhesión Bacteriana a un Hidrocarburo (BATH)	46
3.7	Prueba con Para Film-M	47
3.8	Método del colapso de la gota, modificado (DC).....	48
3.9	Dispersión de aceite (OSM)	48
3.10	Medición de la tensión superficial.....	49
4.	Selección de cepas productoras de Biosurfactantes y Bioemulsificantes	50
5.	Extracción del Biosufactante.	50
6.	Caracterización del biosurfactante	50
6.1	Identificación de los géneros bacterianos	50
6.2	Medición de la actividad antibacteriana.....	51
6.3	Medición de la actividad antimicótica	52
6.4	Determinación de la carga iónica del Biosurfactante/Bioemulsificante	52
7.	Efecto del tiempo en la producción de biosurfactantes	53
8.	Análisis estadístico	53
VI.	Resultados y Discusion.....	54
1.	Producción de Biosurfactante	54
2.	Determinación de las cepas productoras de biosurfactantes	55
3.	Selección y Extracción de cepas productoras de BS/BE	65
4.	Medición de actividad antimicrobiana.....	67
4.1.	Actividad Antibacteriana.....	67
4.2.	Actividad Antimicótica	70

5.	Identificación del género bacteriano y carga iónica del BS/BE	72
6.	Estudio del efecto del tiempo en la producción de BS/BE	74
7.	Relación entre las pruebas	92
VII.	Conclusiones	102
VIII.	Recomendaciones	102
IX.	Bibliografía	103
X.	Anexos	121

Resumen

La contaminación con hidrocarburos representa un serio riesgo para el medioambiente y una amenaza a la salud pública. Ante este problema la biorremediación surge como una tecnología que brinda una solución alternativa. Dicha tecnología se fundamenta en la degradación biológica de estos contaminantes, sin embargo, esta es más que los tratamientos químicos y físicos. Una forma de acelerar este proceso es mediante el uso de biosurfactantes, los cuales intensifican la emulsificación de hidrocarburos e incrementan su biodisponibilidad para la degradación microbiana. Los biosurfactantes son compuestos constituidos por un grupo de moléculas bioquímicas estructuralmente diversas, con propiedades tensoactivas, producidos por microorganismos. La principal dificultad que se tiene al trabajar con estos compuestos es poder detectar a través de métodos rápidos, sencillos efectivos y económicos, microorganismos con potencial para producirlos. En este trabajo, enmarcado dentro del proyecto Misión Ciencia “Desarrollo y validación de nuevas tecnologías para el saneamiento ambiental de pasivos generados por la actividad petrolera”. Se ensayó el potencial de producción de biosurfactante de 23 cepas bacterianas aisladas del pozo petrolero LG-276-F1, del bloque Junín de la Faja Petrolífera del Orinoco (FPO). Dichas cepas fueron seleccionadas bajo un criterio fenotípico, que incluyó caracterización de respuesta positiva frente a los sustratos Lignina, Celulosa y Crudo. Luego se procedió a la producción del biosurfactante, comparando dos factores relevantes: el tipo de fuente de carbono utilizada, (glucosa, acetato de sodio, gasoil y aceite de oliva), y el tiempo de incubación, (3 días y 7 días). Se determinó la presencia del biosurfactante a nivel extracelular liberado por las cepas bacterianas durante el tiempo de incubación, al recuperar el sobrenadante y el pellet. Para la detección de biosurfactante se utilizaron y compararon las pruebas: Actividad Hemolítica, Agar Azul y Producción de Lipasa, medición de actividad emulsificante ($E_{\%}$), dispersión de aceite (OSM), prueba de la adhesión bacteriana a un hidrocarburo (BATH), método de la gota colapsada (DC), método del Parafilm y medición de la tensión superficial (SFT). Finalmente se caracterizó el biosurfactante producido al estudiar su capacidad antimicrobiana, tanto para bacterias como para hongos, la taxonomía de las bacterias que lo producen y la carga iónica del compuesto tensoactivo. Los resultados obtenidos indican la presencia de 14 aislados bacterianos con potencial de producción de biosurfactantes, los cuales tras la identificación del género bacteriano, la caracterización de la actividad antimicrobiana y el tipo de carga iónica del compuesto tensoactivo, llevó a la identificación de 4 cepas productoras de biosurfactantes y 10 cepas productoras de bioemulsificantes, así como la verificación del uso de distintas fuentes de carbono afecta la producción de biosurfactantes, indicando que los mejores resultados en actividad tensoactiva se observan en glucosa, mientras que mejores niveles de producción se encontraron en presencia de

aceite de oliva. En cuanto al efecto del tiempo de incubación, solo se pudo observar un efecto sobre la producción de biosurfactantes, al estudiar su relación con la fuente de carbono y las cepas de producción, indicando que la presencia de cepas productoras de biosurfactantes requieren de tiempos cortos para la producción de los mismos, mientras que los bioemulsificantes requieren de periodos largos en presencia de fuentes de carbono solubles en agua, y para fuentes de carbono hidrofóbicas requieren de periodos cortos. Los resultados de la relación de las pruebas de detección cualitativa de los biosurfactantes, mostraron que las pruebas de Parafilm, DC y OSM tienen una buena correlación con la SFT, con valores de ($r_s = 0,70$ y $g = -0,6$) para los índices de Pearson y Spearman respectivamente, mientras que actividad hemolítica y producción de lipasa mostraron una relación intermedia ($r_s = 0,3$ y $g = -0,32$). El índice de Pearson, para las pruebas de E% muestra una baja correlación ($r_s = -0,15$), mientras que muestra una correlación intermedia en el índice de Spearman ($g = -0,036$), caso contrario ocurre en la prueba de BATH, bajo el índice de Spearman la correlación es baja ($r_s = 0,16$) y la correlación es intermedia ($r_s = 0,47$) en el índice de Pearson. Finalmente las pruebas de Agar Azul y Producción de Espuma mostraron la menor correlación con SFT bajo ambos índices ($r_s = 0,027$, $g = 0,14$ y $r_s = 0,17$, $g = 0,091$, respectivamente). Este comportamiento es típico de suelos ricos en cepas productoras de bioemulsificantes.

Palabras clave: Bioemulsificantes, Biorremediación, Biosurfactantes, Hidrocarburos, Microorganismos, Tensoactivos

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura de las moléculas de los surfactante	5
Figura 2. Curva de formación de la CMC	6
Figura 3. Estructuras de biosurfactantes de los microorganismos hidrocarburoclásticos más estudiados ...	9
Figura 4. Foto de la fosa LG-276-F1	41
Figura 5. Esquema del ensayo de actividad emulsificante	46
Figura 6. Fórmula utilizada para el cálculo del porcentaje de bacterias que adsorbieron el hidrocarburo	47
Figura 7A. Imagen de la estructura del equipo utilizado para la medición de la tensión superficial	49
Figura 7B. Evaluación del radio de curvatura del apéndice de la gota con la fórmula de Laplace y como se registran los cambios en la tensión superficial.....	49
Figura 8. Comportamiento de las cepas en las pruebas de detección utilizando como fuente de carbono Gasoil a los 7 días	58
Figura 9. Comportamiento de las cepas en las pruebas de detección utilizando como fuente de carbono Acetato de sodio a los 7 días.	58
Figura 10. Comportamiento de las cepas en las pruebas de detección utilizando como fuente de carbono Glucosa a los 7 días	58
Figura 11. Comportamiento de las cepas en las pruebas de detección utilizando como fuente de carbono Aceite de Oliva a los 7 días	58
Figura 10. Comparación de las medias generadas de la tensión superficial por las distintas fuentes de carbono. Las letras indican el valor de significancia entre las fuentes de carbono	63
Figura 13A. Foto de la extracción de los biosurfactantes, tras agregar los solventes.....	66
Figura 13B. Foto de la extracción de los biosurfactantes, una vez evaporados los solventes.....	66
Figura 14. Capacidad de inhibición de las dos cepas con respuesta antibacteriana.....	67
Figura 15. Capacidad de inhibición de las 6 cepas con respuesta antifúngica.....	70
Figura 16. Actividad emulsificante de la cepa MR1-5 bajo las cuatro fuentes de carbono a los 3 y 7 días de inoculación.	76
Figura 17. Actividad emulsificante de la cepa MN3-4 bajo las cuatro fuentes de carbono a los 3 y 7 días de inoculación.	76
Figura 18. Actividad emulsificante de la cepa BR2-26 bajo las cuatro fuentes de carbono a los 3 y 7 días de inoculación.	76
Figura 19. Actividad emulsificante de la cepa MN3-1 bajo las cuatro fuentes de carbono a los 3 y 7 días de inoculación.	76
Figura 20. Grado de adherencia de todas las cepas en la prueba de BATH bajo las cuatro fuentes de carbono a los 3 y 7 días de inoculación.	79

Figura 21. . Grado de repuesta de las cepas en la prueba de Parafilm bajo las cuatro fuentes de carbono a los 3 y 7 días de inoculación.	80
Figura 22. Grado de repuesta de las cepas en la prueba de DC bajo las cuatro fuentes de carbono a los 3 y 7 días de inoculación.	81
Figura 23. Capacidad de dispersión de todas 1as cepas en la prueba de OSM bajo las cuatro fuentes de carbono a los 3 y 7 días de inoculación.....	83
Figura 24. Medición de tensión superficial (SFT) bajo las cuatro fuentes de carbono a los 3 y 7 días de inoculación ..	85
Figura 25. Comparación de las medias de la tensión superficial en los dos periodos de tiempo bajo las distintas fuentes de carbono	87
Figura 26. Comparación de las medias de las medias de la tensión superficial en los dos periodos de tiempo de las cepas seleccionadas.....	88
Figura 27. Comparación de las medias de la tensión superficial de las cepas seleccionadas en los dos periodos de tiempo bajo las distintas fuentes de fuentes de carbono.	89
Figura 28. Dendograma del índice de Pearson	93
Figura 29. Dendograma del índice de Spearman.....	95
Figura 30. Flujograma de los pasos a seguir en la detección y diferenciación de las cepas productoras de biosurfactantes y bioemulsificantes.....	99

Índice de Tablas

Tabla 1. Tipos de biosurfactantes junto con los microorganismos que los producen y su actividad biológica	12
Tabla 2. Tipos de bioemulsificantes junto con los microorganismos que los producen y su actividad biológica	15
Tabla 3. Comparación de métodos de detección de biosurfactantes, sus fundamentos, ventajas, desventajas y aplicabilidad como método de detección	22
Tabla 4. Procesos de recuperación y mecanismos de extracción del biosurfactante	28
Tabla 5. Actividad antimicrobiana de varios biosurfactantes y los microorganismos que los producen.....	31
Tabla 6. Observaciones realizadas durante la incubación a lo largo de los 7 días	54
Tabla 7. Métodos de detección por actividad específica	55
Tabla 8. Resultados de los géneros bacterianos de las cepas con potencial de producción y la medición de la carga iónica de los biosurfactantes producidos por las mismas y la identificación del mismo.....	72
Tabla 9. Potenciales géneros bacterianos que coinciden con los resultados obtenidos de las cepas bacterianas de interés	73

Índice de Anexos

Anexo I. Resultados de los metodos cualitativos	121
Anexo II. Resultados del índice de emulsificación a las 24, 48, 72 y 96 horas	123
Anexo III. Resultados de las mediciones de tensión superficial	126
Anexo IV. Resultados de los métodos de detección a nivel de respuesta de todas las cepas bajo las cuatro fuentes de carbono.....	127
Anexo V. Resultados de los métodos de comportamiento específico	128
Anexo VI. Resultados de los métodos cualitativo/cuantitativo de las cepas seleccionadas para la incubación de los 3 días.....	129
Anexo VII. Resultados del índice de emulsificacion de las cepas seleccionadas para la incubación de los 3 días	129
Anexo VIII. Matriz de similitud de Pearson	130
Anexo IX. Matriz de similitud de Spearman	130
Anexo X. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas sobre los 14 aislados bacterianos con potencial de producción de biosurfactantes	131
Anexo XI. Resultados de la actividad antimicrobiana	132
Anexo XII. Fotografía de los resultados de la actividad hemolítica	133
Anexo XIII. Fotografía de los resultados de la producción de lipasas	133
Anexo XIV. Fotografía de los resultados de la prueba de Agar Azul	133
Anexo XV. Fotografía de los resultados de la actividad emulsificante (E%).....	133
Anexo XVI. Fotografía de los resultados de la dispersión de aceite (OSM).....	134
Anexo XVII. Fotografía de los resultados de la prueba de Parafilm.....	134
Anexo XVIII. Fotografía de los resultados de la prueba de BATH	134
Anexo XIX. Fotografía de los resultados de la actividad antimicrobiana.....	135
Anexo XX. Fotografía de los resultados en la doble difusión con agar (ADD)	135

I. Introducción

En las últimas décadas, los ecosistemas terrestres se han visto severamente afectados para la presencia de agentes contaminantes de origen orgánico, sobre todo por la presencia de hidrocarburos. La problemática que tiene este tipo de contaminantes es su alta afinidad por las partículas de suelo y su baja solubilidad de agua, lo cual complica los procedimientos de limpieza. La presencia de estos agentes contaminantes no pone en riesgo solo la microfauna debido a la privación de elementos nutricionales y esenciales, como el oxígeno y el agua, sino también a toda la biota y al ser humano por las propiedades peligrosas de estos contaminantes sobre la salud y la calidad de vida de todos los organismos.

Ante esta problemática, se ha buscado el uso de sustancias capaces de mejorar la solubilidad y la movilización de los agentes contaminantes para mejorar su remoción del ambiente. Una de las soluciones es el uso de surfactantes sintéticos, los cuales por sus propiedades pueden cambiar la tensión superficial e interfacial, mejorando así la capacidad de extracción de estos agentes orgánicos (Saenz-Marta y col., 2015). Sin embargo, estos agentes son altamente tóxicos, difíciles de remover una vez cumplieron su función de agentes de limpieza y presentan propiedades fisicoquímicas altamente inestables. (Cha, 2000; Batista y col., 2006; Tambekar y Gadakh 2013). En busca de una solución a esta nueva problemática se planteó sustituir los surfactantes por unos compuestos llamados biosurfactantes, que, como su nombre lo indica, son moléculas con las mismas propiedades que los surfactantes, con la diferencia de que son de origen biológico (Cameotra y Makkar, 1998; Lakshimapathy y col., 2010; Yañez-Ocampo, 2013; Liang y col., 2014).

Los biosurfactantes presentan una amplia variedad de ventajas sobre los surfactantes sintéticos, como lo son biodegradabilidad, baja toxicidad, biocompatibilidad, producción económica, especificidad, eficacia en condiciones extremas. (Desai y Banat, 1997; Cameotra y Makkar, 1998; Kosaric, 2001). Además, los microorganismos que producen biosurfactantes son aislados

normalmente de zonas que son o fueron impactadas o con derivados del petróleo: suelos contaminados, efluentes, aguas negras. Esta propiedad de los biosurfactantes de poder ser producidos *in situ* es otra de las ventajas que presentan los biosurfactantes respecto a los surfactantes sintéticos.

Bajo este contexto, en la última década, los biosurfactantes han adquirido un rol importante en las tecnologías implementadas para la biorremediación y recuperación mejora de crudo con microorganismos (MEOR). Sin embargo, hoy en día no se conocen muchos trabajos publicados sobre el uso de biosurfactantes *in situ*. Situación que pudiera ser atribuida a la limitación e inconsistencia de los métodos de detección y comportamientos de los biosurfactantes durante su producción (Desai y Banat, 1997; Cameotra y Makkar, 1998; Ron y Rosenberg, 2002).

Ante esta problemática, los investigadores han venido realizando estudios orientados al desarrollo de métodos rápidos, precisos y capaces de detectar de manera simultánea un gran número de microorganismos con el potencial de producción, basándose en las propiedades de los biosurfactantes bajo distintas condiciones de crecimiento. Así, hoy en día existen numerosos trabajos que emplean diferentes métodos de detección y determinación de microorganismos productores de biosurfactantes (Al-Mallah y col., 1990; Youssef y col., 2004; Plaza y col., 2006; Techaoei y col., 2007; Afshar y col., 2008; Satpute y col., 2008; Anandaraj y Thivakaran 2010; Viramontes-Ramos y col., 2010; Thavasi y col., 2011; Saimmai y col., 2012a; Hamzah y col., 2013; Liu y col., 2013; Mariashobana y col., 2014; Panjiar y col., 2014; Saminathan y Rajendran, 2014; Deepa y col., 2015). Sin embargo, la mayoría de las metodologías utilizadas para la detección están basadas en las mediciones indirectas de las propiedades físico-químicas de los surfactantes, y esto requiere que los microorganismos con el potencial de producción, sean sometidos a una inoculación preliminar, la cual a su vez genera resultados impredecibles considerando que la producción de biosurfactantes está influenciada por diversos factores, tales como las fuentes de carbono, las condiciones externas, así como las concentraciones de diferentes elementos utilizados en la incubación, para obtener el producto de interés (Perfumo y col., 2010).

Otro aspecto a considerar incluyen las limitaciones correspondientes a los equipos especiales requeridos para la detección y cuantificación de los biosurfactantes, que no todos los laboratorios poseen, a esto se adiciona el número de organismos con potencial productor de biosurfactantes a ser evaluados, lo cual constituye un obstáculo a enfrentar en esta línea de investigación. Por otra parte, el acercamiento a nivel molecular para la detección de cepas productoras de biosurfactantes aún se encuentra en etapas tempranas, debido a que las rutas de biosíntesis y los genes relacionados en las mismas están altamente conservados a nivel de especies y el conocimiento en este aspecto está restringido a unos pocos microorganismos (Perfumo y col., 2010).

En Venezuela, los pasivos ambientales generados por la industria petrolera se originan por la acumulación y disposición no adecuada de materiales en desuso y desechos provenientes de las actividades de exploración, producción, refinación y comercialización del petróleo y gas; las cuales degradan el entorno físico, natural y social causando riesgos a la salud y al ambiente en general. Entre estos pasivos ambientales tenemos las llamadas fosas petroleras, las cuales de acuerdo a Arellano, (2008) cita que existe un número de 12.367 fosas de hidrocarburos sin sanear, con unas 96% ubicadas en el oriente del país y un 2% en el occidente. Entre estas fosas, se incluyen las que corresponden a fosas de desechos inactivas las cuales podrían ser fácilmente saneadas por procesos de biorremediación.

En Venezuela existe una gran número de trabajos relacionados con procesos de biorremediación (Gaspar 2002; León y col. 2009; Windevoxhel y col., 2009a,b; Chirinos y col., 2010; Barrios, 2011; Windevoxhel y col., 2011) y estudios de biosurfactantes (Rocha y col., 1992, Hernandez, 1999; Sulbarán 2002; León 2008; Gaspar 2009; Kumar y col., 2006ab, 2007, 2008; Araujo y col., 2008 y Bozo y col., 2012; Barrios 2011; Zamora y col., 2012). Sin embargo, gran parte de estos estudios no cuenta con métodos de detección actualizados, o no incluyen la detección de microorganismos productores de biosurfactantes utilizando distintos métodos de detección y la posterior identificación de los biosurfactantes encontrados. Otro aspecto es el no considerar, la

distinción entre biosurfactantes y bioemulsificantes, lo cual es importante al momento de desarrollar los mecanismos de biorremediación que se deseen implementar (Pacwa-Plociniczak y col., 2011; Banat y col., 2010; Mnif y Ghribi, 2015b; Saenz-Marta y col., 2015).

En este trabajo se realizó un estudio de biosurfactantes y bioemulsificantes producidos por aislados bacterianos del proyecto Mision Ciencias “Desarrollo y validación de nuevas tecnologías para el saneamiento ambiental de pasivos generados por la actividad petrolera.”, bajo la consideración de dos parámetros distintos (fuente de carbono y tiempo de producción), además de la detección y diferenciación de dichos productos mediante métodos basados en las propiedades de las moléculas surfactantes y una posterior identificación del producto por la identificación del género bacteriano y la capacidad antimicrobiana del biosurfactante, que si bien está ampliamente reportada para biosurfactantes y bioemulsificantes específicos, no ha sido reportada como método de identificación de los mismos.

II. Marco Teórico

1. Surfactantes

Los surfactantes son moléculas anfipáticas formadas por una región hidrofóbica (no polar) y una región hidrofílica (polar), que generan una separación entre la interface de sustancias que presentan distintos niveles de polaridad y puentes de hidrógeno, como es el caso de la mezcla de agua-aceite, o la interface entre aire/agua. Usualmente, la región hidrofóbica es un hidrocarburo, y la región hidrofílica puede ser no iónica (surfactante no ionico), cargada positiva (surfactante catiónico) o negativamente (surfactante anionico) (Georgiou y col., 1992; Desai y Banat, 1997). Cuando se juntan varias moléculas con estas características, generan una biocapa entre ambas interfaces, disminuyendo la tensión interfacial, y esto se traduce en una disminución de la tensión superficial, siendo esta la característica más importante de este grupo de sustancias (Gautam y Tyagi, 2006; Cameotra y col., 2010).

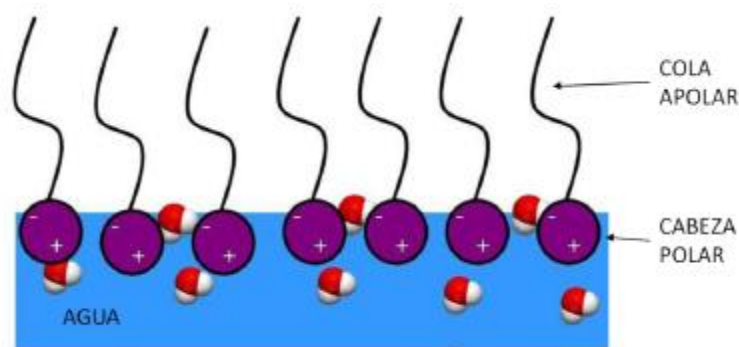


Figura 1. Estructura de las moléculas de los surfactante. (Imagen modificada a partir de la publicada en Pacwa-Płociniczak y col., 2011).

Una de las propiedades importantes que poseen los surfactantes, se muestra al incrementar su concentración en sistema de aceite/agua o agua/aire, genera una disminución de la tensión superficial a un punto crítico donde el surfactante, que en principio se encontraba en forma de monómeros, puede formar estructuras como micelas, bicapas o vesículas. Esta concentración se define como concentración micelar crítica (CMC) y es el punto donde los monómeros libres comienzan a agruparse, y disponen la región hidrofóbica de los surfactantes en el centro rodeando el compuesto hidrofóbico y la región hidrofílica en contacto con el agua para luego concentrarse en la interface aceite/agua, logrando así la máxima reducción de la tensión superficial/interfacial (Saenz-Marta y col., 2015). Hay moléculas surfactantes que son capaces de reducir la tensión superficial del agua de 72 a 27 mNm^{-1} , siendo esta medida indicadora para la escogencia de un buen surfactante.

Otra de las propiedades que poseen los surfactantes es que, cuando se encuentran mezclados con agua y aceite, éste se ubica en la interface agua/aceite; dependiendo de su estabilidad a estos sistemas se les llama emulsiones o microemulsiones. Estas características les confieren excelentes cualidades como detergentes y emulsificantes, agentes espumosos y capacidades de dispersión, con lo cual se constituye en uno de los compuestos químicos más versátiles del mercado (Saenz-Marta y col., 2015).

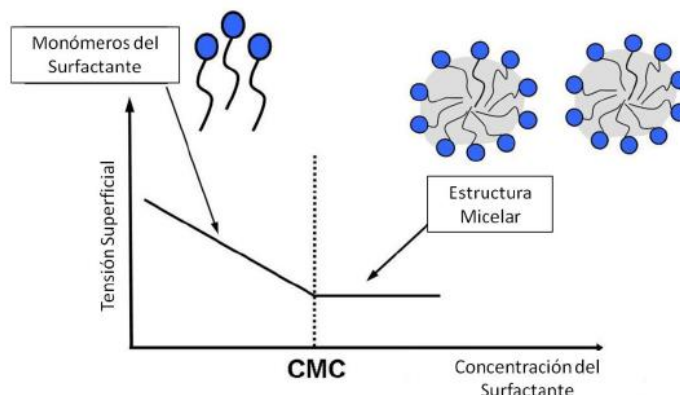


Figura 2. Curva de formación de la CMC. (Imagen modificada a partir de la publicada en Pacwa-Płociniczak y col., 2011)

2. Aplicaciones en ambientes contaminados por la industria petrolera

Durante la actividad de la industria petrolera y por accidentes o manejo inadecuado del crudo, grandes cantidades de hidrocarburos son liberados a sistemas acuáticos o terrestres. De esta manera, solo un 10% del total de contaminación en el ambiente marino es derivado de los derrames petroleros que resultan también en contaminación de las costas (Saenz-Marta y col., 2015). Las moléculas de estos contaminantes se unen a las del suelo mediante enlaces formados por afinidad con las partículas del mismo, haciendo difícil su eliminación debido a la baja solubilidad que tienen estos compuestos orgánicos y los altos niveles de tensión interfacial con el agua, además pueden ser arrastrados hacia las aguas superficiales. (Ron y Rosenberg, 2002; Saenz-Marta y col., 2015). Los desechos generados por los pozos petroleros presentan una problemática similar. Por otro lado, los componentes de hidrocarburos livianos, generalmente tóxicos, tienden a ser altamente volátiles en la atmósfera, reduciendo la calidad del aire y poniendo en riesgo la salud de la biota y las personas.

Otro impacto lo constituyen los altos niveles de compuestos sulfurados emitidos en los desechos de la industria petrolera, lo cual requiere de tratamiento adicional a la remediación de los suelos (Van Hamme y col, 2003). Por otra parte los lodos petrolizados formados por la separación de sistemas de agua/crudo en los tanques de almacenamiento de los campos petroleros, tienen muchos de sus componentes son tóxicos cancerígenos y mutagénicos, por lo tanto su manejo inadecuado

puede causar enfermedades, contaminar el suelo y representa una amenaza para las aguas subterráneas (Liu y col., 2010; Sharma y col., 2015a).

Una solución a estos problemas generados por la industria petrolera ha sido la utilización de surfactantes para limpiar el suelo y aguas contaminadas, fundamentados en que dichos compuestos mejoran las interacciones superficie-superficie, mediante la formación de micelas, o actuando como agentes emulsificantes. Sin embargo, si bien los surfactantes son los elementos de mayor uso y con mejores resultados en los trabajos de recuperación de petróleo, generalmente son tóxicos, lo cual genera una adición de contaminante al medio, con baja especificidad por el sustrato y en ocasiones el nivel de respuesta requerido es muy bajo y pueden llevar a la formación de metabolitos intermediarios tóxicos (Cha, 2000; Batista y col., 2006; Tambekar y Gadakh 2013). Una posible solución a este problema es la sustitución de los surfactantes por moléculas con propiedades tensoactivas similares y de origen biológico, llamadas biosurfactantes.

3. Biosurfactantes

Los biosurfactantes, son un grupo estructuralmente diverso de moléculas superficie-activas que son sintetizadas por microorganismos. Comúnmente, están compuestos por un componente hidrofílico, que pueden ser catiónico o aniónico, y un componente hidrofóbico (Banat y Desai 1997; Banat y col., 2000; Makkar y col., 2011). Actúan como metabolitos secundarios de los microorganismos durante la fase estacionaria de crecimiento bacteriano y presentan gran variedad de roles fisiológicos involucrados en la accesibilidad de los microorganismos a nutrientes limitantes y tolerancia a sustratos hidrofóbicos. También están involucrados en el crecimiento sobre sustancias hidrofóbicas y la motilidad celular junto con la formación de biopelículas al reducir la tensión superficial. Otra función que cumplen los biosurfactantes es como agentes antimicrobianos. (Van Hamme y co., 2006, Saenz-Marta y col., 2015).

Entre las propiedades más importantes que presentan los biosurfactantes en su similitud con los surfactantes sintéticos se destacan:

- La capacidad de reducir la tensión superficial e interfacial mediante el rompimiento de las interfaces entre aire/agua y agua/aceite (Cooper y Goldenberg, 1987; Desai y Banat, 1997; Ron y Rosenberg, 1999; Thaniyavarn y col., 2003; Satpute y col., 2010; Pacwa-Plociniczak y col., 2011);
- La capacidad de producir emulsiones, dispersando un líquido en otro, en forma de microgotas, así como el proceso inverso en el cual se rompe las emulsiones mediante la ruptura de la estabilidad entre las microgotas y la superficie en la interface (Satpute y col., 2010; Mnif y Ghribi, 2015a);
- La adsorción del compuesto lo cual ayuda a las bacterias a la retención de moléculas hidrofóbicas, facilitando las interacciones en la superficie de moléculas activas en el sedimento. La reducción de la viscosidad o mojabilidad, lo cual permite una mayor movilidad y transporte de compuestos insolubles (Satpute y col., 2010);
- La capacidad de actuar como agente dispersante, la cual consiste en reducir las fuerzas de atracción entre partículas de naturaleza similar logrando así mantener partículas insolubles en suspensión (Satpute y col., 2010; Mnif y Ghribi, 2015a);
- La capacidad de actuar como agente “espumoso”, es decir, las moléculas de biosurfactante se acumulan en la interface gas-líquido llevando a la formación de burbujas en el líquido y en la interface, lo que conlleva a la formación de espuma (Satpute y col., 2010);
- La solubilización de elementos insolubles, mediante la formación de micelas que encapsulan las moléculas insolubles, permitiendo así la dilución de las mismas (Ron y Ronsenberg, 2002; Youssef y col., 2005; Banat y col., 2010; Satpute y col., 2010; Liang y col., 2014; Saenz-Marta y col., 2015).

Estas propiedades hacen a los biosurfactantes excelentes agentes desde el punto de vista fisicoquímico y biológico para la biorremediación de contaminantes orgánicos y metales pesados. Estos compuestos incrementan la biodisponibilidad de los hidrocarburos, estimulando el crecimiento bacteriano que a su vez se traduce en la degradación de los contaminantes por la acción de las bacterias hidrocarbonoclasticas presentes en el suelo contaminado (Pacwa-Plociniczak y col., 2011).

Comparado con los surfactantes químicos, los biosurfactantes tienen amplias ventajas, tales como una baja toxicidad, alto nivel de biodegradación, mejor compatibilidad con el ambiente, alta productividad de emulsiones, alto nivel de selectividad y actividad específica a temperaturas, pH y salinidad extremos, así como la habilidad de sintetizar sistemas de retroalimentación renovables en el ambiente. (Desai y Banat, 1997; Cameotra y Makkar, 1998).

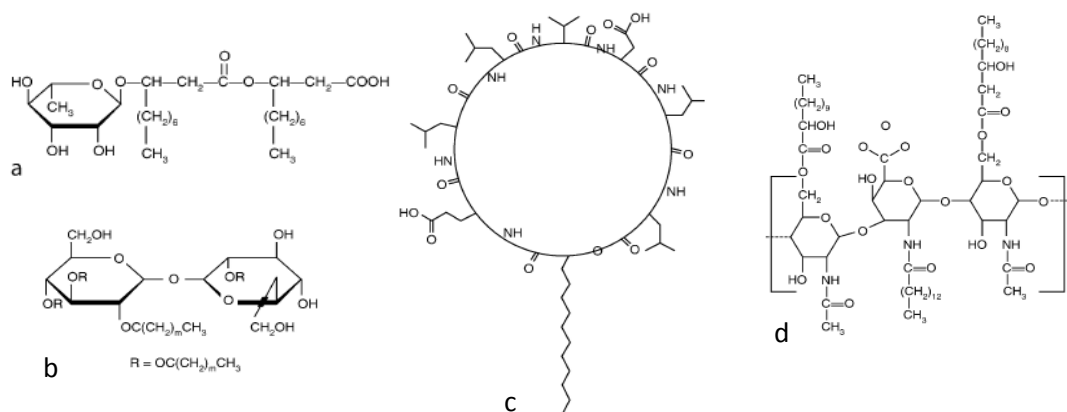


Figura 3. Estructuras de biosurfactantes de los microorganismos hidrocarburoclásticos más estudiados. (a) Monoramnolípido (C_{10} - C_{10}) de *P. aeruginosa*; (b) Trehalosa-tetraester de *Rhodococcus* sp.; (c) Surfactina de *Bacillus* sp.; (d) Emulsan de *Acinetobacter* RAG-1. (Imagen modificada a la publicada por de Perfumo y col., 2010)

3.1. Tipos de biosurfactantes

Los biosurfactantes están categorizados según su composición química, peso molecular, propiedades físico-químicas, disociación en el agua, y origen microbiano. Puede dividirse en dos grandes grupos basados en su peso molecular: los de bajo peso molecular, incluyen glucolípidos, fosfolípidos y lipopeptidos; y los de alto peso molecular incluyen biosurfactantes/bioemulsificantes, en los cuales se encuentran los polisacáridos anfílicos, proteínas, lipopolisacáridos, lipoproteínas o

mezclas complejas de biopolímeros, y debido a sus estructuras químicas únicas, presentan una gran variedad de propiedades las cuales pueden ser explotadas comercialmente (Banat y col., 2002; Guatam y Tyagi, 2006; Martinez-Checa y col., 2007; Pacwa-Plociniczak y col., 2011; Saenz-Marta y col., 2015).

Por su composición química

En general, la estructura química de los biosurfactantes incluye un grupo hidrofílico consistente de aminoácidos, péptidos aniónicos o catiónicos; mono-, di-, o polisacáridos; y un grupo hidrofóbico constituido por ácidos grasos saturados o insaturados. La mayor parte de los biosurfactantes incluye glucolípidos, lipopéptidos, lipoproteínas, fosfolípidos y ácidos grasos (Desai y Banat, 1997; Mondragon, 2011)

- **Glucolípidos:** Es uno de los grupos más conocidos entre los biosurfactantes. Son carbohidratos en combinación con una larga cadena alifática de ácidos y ácidos hidroxílicos. Generalmente son compuestos de carga aniónica, excelentes agentes tensoactivos y tienen la capacidad de generar cambios en la hidrofobicidad de la membrana bacteriana. Entre los glucolípidos conocidos, los más estudiados son los ramnolípidos, trehalolípidos, y soforolípidos (Desai y Banat, 1997; Guatam y Tyagi, 2006).
- **Lipopéptidos y lipoproteínas:** Es el segundo grupo de biosurfactantes microbiano mas estudiado, representado por gran número de lipopeptidos, que son simples moléculas organizadas en un compuesto cuyo esqueleto está conformado por un péptido cíclico unido a una cola de ácido graso, sin embargo, existen numerosas variantes en su estructura que generan cambios en su comportamiento como agente tensoactivo. Son sintetizados por un amplio grupo de géneros bacterianos, los cuales incluyen desde *Pseudomonas* fluorescentes hasta bacilos (Desai y Banat, 1997; Perfumo y col., 2010; Mondragon, 2011), siendo la surfactina el biosurfactante más conocido de este grupo.

- Ácidos grasos, fosfolípidos y ácidos neutros: Este tipo de biosurfactante es producido por una gran variedad de especies bacterianas y levaduras durante su crecimiento sobre n-alcános. El balance hidrofílico o lipofílico de los ácidos grasos está relacionado con la longitud de la cadena de hidrocarburo. Los ácidos grasos que disminuyen considerablemente la tensión superficial e interfacial, son aquellos que en su molécula presentan entre 12 y 14 átomos de carbono (Desai y Banat, 1997; Guatam y Tyagi, 2006; Mondragon, 2011).

Mayores detalles sobre estos aspectos se resumen en la tabla 1.

Por su peso molecular y mecanismo de acción-biosurfactante y bioemulsificante

En relación a su tamaño, los compuestos pueden ser de bajo peso molecular, (biosurfactantes), y alto peso molecular (bioemulsificantes) (Ronsenberg y Ron 1997; Banat y col., 2010; Saenz-Marta y col., 2015). Las propiedades fisicoquímicas de los biosurfactantes de bajo peso molecular están influenciadas por los residuos de ácidos grasos que contienen, los cuales a su vez dependen de la cepa bacteriana utilizada y también en las condiciones de crecimiento y nutrientes presentes. Los biosurfactantes de alto peso molecular son usualmente una compleja mezcla de macromoléculas que están constituidas por proteínas, polisacáridos y residuos de lípidos (Velioglu y Urek 2014; Saenz-Marta y col., 2015).

En relación al mecanismo de acción, algunos compuestos son mejores disminuyendo la tensión superficial (biosurfactantes), y otros son capaces de producir emulsiones estables en el tiempo (bioemulsificantes) (Karnat y col, 1999; Batista y col., 2006; Saenz-Marta y col., 2015).

En la literatura los términos de biosurfactante y bioemulsificadores son considerados como intercambiables, sin embargo ese no debería ser el caso, si consideramos las diferencias significativas tanto en la estructura química como en la función biológica que cumplen ambos compuestos en las bacterias (Uzoigwe y col., 2015). Aunque todos los bioemulsificadores son considerados

biosurfactantes, no todos los biosurfactantes son capaces de producir emulsiones estables en el tiempo (Desai y Banat, 1997; Ron y Rosenberg, 1997; Ron y Rosenberg 2002).

Tabla 1. Tipos de biosurfactantes junto con el microorganismo que lo produce y su actividad biológica. (Tabla modificada tomada a partir de la publicada por Pacwa-Płociniczak y col., 2011)

Biosurfactante		Organismo	Valores de la tensión superficial (mN/m)	Actividad biológica
Glucolípidos	Ranolípidos	<i>P. aeruginosa</i>	29	Buenos agentes tensoactivos y emulsificantes. Aumentan la hidrofobicidad de la membrana bacteriana
		<i>Pseudomonas</i> sp.	25-30	
	Trehalolípidos	<i>R. erythropolis</i>	32-36	Excelentes agentes tensoactivos. Aumento en la biodisponibilidad de los hidrocarburos
		<i>N. erythropolis</i>	30	
		<i>Mycobacterium</i> sp.	38	
	Soforolípidos	<i>T.bombicola</i>	33	Excelentes agentes tensoactivos y con amplia tolerancia a condiciones extremas. Malos agentes emulsificantes
		<i>T. apicola</i>	30	
		<i>T. petrophilum</i>	-	
	Cellobiolípidos	<i>U. zaeae</i> , <i>U. maydis</i>		
Lipopeptidos y lipoproteínas	Péptido-lípidos	<i>B. licheniformis</i>	27	Excelentes agentes espumosos, muy activos en la interface, debido a sus grandes propiedades de disminuir en gran medida los niveles de tensión interfacial a bajas concentraciones. Modulan la hidrofobicidad de la membrana bacteriana.
	Serrawettina	<i>S. marcescens</i>	28-33	
	Viscosina	<i>P. fluorescens</i>	26,5	
	Surfactina	<i>B. subtilis</i>	27,32	
	Subtilisina	<i>B. subtilis</i>	-	
	Gramicidinas	<i>B. brevis</i>	-	
	Polymyxinas	<i>B. polymyxa</i>	-	
Ácidos grasos, lípidos neutros, fosfolípidos	Proteína-lípida-manoproteína	<i>C. tropicalis</i>	-	Excelentes agentes tensoactivos
	Proteína-lípida-carbohidrato	<i>P. fluorescens</i>	27	
		<i>D. polymorphis</i>	-	
	Proteína PA	<i>P. aeruginosa</i>	-	

3.2. Bioemulsificantes

Los compuestos de alto peso molecular, también llamados bioemulsificantes (BE), son mucho más eficientes en la formación de espuma y en la estabilización de aceite en agua o la estabilización de agua en emulsiones formadas por aceites, pero no necesariamente reduce la tensión superficial o interfacial (Bonilla y col., 2004; Lopez y col., 2014; Gudiña y col., 2015). Usualmente los bioemulsificantes consisten en estructuras poliméricas, en algunos casos llamados biosurfactantes poliméricos. Son anfipáticos por naturaleza y similares a los biosurfactantes de bajo peso molecular, como los glucolípidos y los lipopeptidos (Perfumo y col., 2010). Aunque no han sido estudiados

ampliamente como los biosurfactantes, se sabe que varias especies de bacterias, levaduras, y hongos filamentosos son capaces de producirlos (Gudiña y col., 2015).

Su capacidad emulsificante se debe al alto número de grupos reactivos expuestos a lo largo de las cadenas que conforman estas moléculas, pueden unirse intrínsecamente con los hidrocarburos y aceites, así como formar una barrera que previene el colapso de dicha unión. Por estas propiedades, estos compuestos han mostrado tener la habilidad de estabilizar emulsiones, destacando el hecho que a menudo son referidos como bioemulsificantes (Perfumo y col., 2010). Los bioemulsificantes producidos por microorganismos, además de su capacidad emulsificante, pueden utilizarse para separar emulsiones de aceite/agua, debido a su alta actividad desemulsificante (Hou y col., 2013).

Sus propiedades de emulsificación/desemulsificación, espumabilidad, dispersión, solubilización de hidrocarburos, los convierten en potenciales candidatos para la biorremediación de hidrocarburos en zonas impactadas (Mnif y Ghribi, 2015b).

Adicionalmente de sus capacidades emulsificantes, los bioemulsificantes juegan un papel muy importante en la regulación de la unión-separación de los microorganismos, de y hacia las superficies, ya que se adhieren a la pared celular de la bacteria de manera extracelular. (Lopez y col., 2014). Muchas bacterias y hongos que utilizan hidrocarburos como fuente de carbono poseen actividad emulsificante, debido a la presencia de compuestos extracelulares los cuales actúan como sustancias superficialmente activas e incluso haciendo que la misma célula actúe como un agente bioemulsificante (Saimmai, y col., 2012a) incrementa la solubilidad de los hidrocarburos, al mismo tiempo, la emulsificación hace que los compuestos insolubles se dispersen en el agua, haciéndolos así disponibles no solo para los microorganismos hidrocarburoclásticos, sino también para otros organismos presentes en el ambiente y mejorando así la biodisponibilidad en el sustrato (Thavasi y Jayalakshmi 2003).

3.3. Tipos de Bioemulsificantes

Numerosos microorganismos han sido caracterizados por la síntesis de una amplia variedad de bioemulsificantes desde bajo hasta alto peso molecular. Generalmente los bioemulsificantes de alto peso molecular son proteínas, polisacáridos, lipopolisacáridos, lipoproteínas o un compuesto surtido de varios de estos biopolímeros. También algunas de las estructuras dentro de las células bacterianas, como vesículas, y fimbrias o pelos (apéndices filamentosos rectos y rígidos, más cortos y más finos (3-10 nm de diámetro) que los flagelos, y que aparecen en muchas bacterias, sobre todo Gram-negativas), actúan como agentes emulsificantes. Los bioemulsificantes poliméricos más estudiados son: emulsan, alasan, liposan, manoproteínas y otros complejos de proteínas de polisacáridos (Mnif y Ghribi, 2015b).

- Familia de emulsan: El emulsan es un compuesto de polisacáridos acilado de carácter extracelular, producido en su mayoría por bacterias gram negativas, en especial especies de *Acinetobacter*, y es uno de los bioemulsificantes poliméricos más populares en el campo de investigación (Mnif y Ghribi, 2015b), por ser un agente emulsificante muy efectivo sobre hidrocarburos en agua a muy bajas concentraciones, con valores que van de 0,001-0,01% (Desai y Banat 1997; Guatam y Tyagi, 2006; Perfumo y col., 2010; Mnif y Ghribi, 2015b). Entre los miembros de esta familia, los más estudiados son: emulsan, alasan y manoproteínas.
- Ácidos grasos, fosfolípidos y lípidos neutrales: esta familia de bioemulsificantes, puede ser producida por diversos microorganismos cuando se inoculan en presencia de n-alcanos (Mnif y Ghribi, 2015b). Resaltan entre los bioemulsificantes porque algunos tienen la capacidad de disminuir la tensión superficial e interfacial. Entre los más estudiados tenemos: biosurfactantes derivados de ácidos grasos; fosfolípidos y lípidos neutrales.
- Bioemulsificantes exopolisacáridos: son carbohidratos poliméricos de alto peso molecular activos a nivel extracelular. Pueden ser producidos por varios microorganismos marinos mediante una capa que rodea a las células, permitiéndoles resistir condiciones adversas y

extremas del medio ambiente, al ofrecer una alta diversidad estructural (Saptute y col., 2010; Mnif y Ghribi, 2015b). Algunos ejemplos de polisacáridos son: xanthan dextran y gellan, los cuales son ampliamente utilizados en biotecnología (Bonilla y col., 2004)

- Biosurfactante en partículas y/o en toda la célula bacteriana: Numerosas cepas bacterianas liberan vesículas de la membrana a nivel extracelular, las cuales son conocidas como biosurfactantes en partículas, que son responsables de la separación de las moléculas de hidrocarburo en forma de microemulsiones que tiene un papel fundamental en la toma de alcanos como sustrato por los microorganismos. Más aun, algunas partículas de biosurfactante pueden ser sintetizadas y mantenerse adheridas a la superficie de las células, haciendo que la célula bacteriana actúe como bioemulsificante (Mnif y Ghribi, 2015b).

En la tabla 2 se pueden observar algunos ejemplos de cepas productoras de bioemulsificantes y las funciones biológicas de los mismos dentro del microorganismo.

Tabla 2. Tipos de bioemulsificantes junto con los microorganismos que los producen y su actividad biológica (Tabla modificada a partir de la publicada en Mnif y Ghribi, 2015b)

Tipos de bioemulsificantes	Cepa productora	Actividad biológica
Emulsan: complejo de polisacáridos acilados	<i>Acinetobacter venetianus</i> RAG-1	Actividad emulsificante y aumentan la hifrofobicidad de la membrana bacteriana
	<i>A. calcoaceticus</i> (PTCC13-18)	Actividad emulsificante
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Candidata para MEOR
Alasan: complejo aniónico hetepolisacárido y proteínas	<i>A. radioresistens</i> KA53	Agente emulsificante
	<i>A. venetianus</i> RAG-1	Agente de cobertura
	<i>Acinetobacter</i> sp.	Actividad emulsificante y aumentan la hifrofobicidad de la membrana bacteriana
Manoproteína	<i>Kluyveromyces marxianus</i> FII 510700	Actividad emulsificante
	<i>S. cerevisiae</i>	Actividad antiadhesiva y evita la formación de biopelícula
Ácidos grasos	<i>Arthrobacter paraffineus</i>	Agente tensoactivo activo
	<i>Corynebacterium lepus</i>	Actividad superficial
	<i>Candida ingens</i>	Actividad superficial
	<i>R. Erythropolis</i> 3C-9	Agente tensoactivo activo, solubilizante y biodegradador
	<i>P. citronellolis</i> KHA	Actividad superficial y agente emulsificante
Fosfolípidos	<i>Acinetobacter</i> sp.	Componentes de agentes tensoactivos
	<i>Sphingobacterium</i> sp.	Agente tensoactivo
Complejo de polisacáridos y lípidos	<i>Candida lipolytica</i> (Liposan)	Actividad emulsificante
	<i>Burkholderia cepacia</i>	Lípidos complejos adyuvantes
	<i>Gordonia</i> sp. JE-1058	Actividad de dispersión y "lavado"

Complejo de lípidos, proteínas y polisacáridos		<i>P. marginalis</i> PD-14B	Actividad emulsificante y degradadora de hidrocarburos
		<i>C. glabrata</i> UCP 1002	Bioemulsificante
		<i>C. lipolytica</i>	Bioemulsificante
		<i>B. licheniformis</i> K125	Candidata para MEOR
		<i>Alcaligenes</i> sp. S-XJ-1	Actividad como bioemulsificante
Biodispersante: (polisacárido aniónico extracelular)		<i>A. calcoaceticus</i> A2	Actividad dispersante
Exopolisacárido		<i>P. putida</i> ML2	Bioemulsificante
		<i>Halomonas eurihalina</i> , <i>B. subtilis</i>	Actividad emulsificante
		<i>Alcaligenes faecalis</i> y <i>Enterobacter</i> sp.	Actividad emulsificante
		<i>A. calcoaceticus</i> CBS 962.97	Actividad emulsificante
		<i>B. cereus</i> y <i>Brachybacterium</i> sp.	Actividad emulsificante
		<i>S. callcoacerius</i>	Actividad emulsificante
Proteína		<i>Pseudomonas</i> PG-1	Aumento en la tasa de biodegradación de hidrocarburos
		<i>P. aeruginosa</i> S7B1	Actividad emulsificante
		<i>Acinetobacter</i> sp. A3	Relacionada en los procesos de biodegradación de hidrocarburos
		<i>Aeromonas salonicida</i>	Actividad inmunomoduladora
		<i>Lactobacillus fermentum</i>	Actividad antiadhesiva
		<i>Brevibacillus brevis</i> (Gramicidin S)	Actividad antifúngica
		<i>Staphylococcus aureus</i>	Actividad inmunomoduladora
		<i>B. mojavensis</i> XH-1	Actividad bioemulsificante
Biosurfactantes particulados	Vesículas y fimbrias	<i>A. calcoaceticus</i>	Actividad emulsificante y aumentan la hidrofobicidad de la membrana bacteriana
	Toda la célula	Variedad de bacterias	

El potencial comercial de los bioemulsificantes incluye la biorremediación de suelos y aguas contaminadas con petróleo, MEOR, reemplazo de solventes clorados en la limpieza de tuberías de crudo y la formación de emulsiones estables de agua/aceite para la comida y la industria de cosméticos. Sin embargo, como se puede ver en la tabla 2, la aplicación varía de acuerdo al microorganismo que produce el biosurfactante (Gudiña y col., 2015; Uzoigwe y col., 2015).

4. Factores que afectan la producción de biosurfactantes

La producción del biosurfactante depende en gran medida de la composición del medio, y como este afecta la eficiencia de su producción (Xia y col., 2012; Velioglu y Urek 2014). La mayoría de estos compuestos son lípidos de alta complejidad, los cuales normalmente se producen bajo

condiciones aerobias (Saenz-Marta y col., 2015). La composición química de un biosurfactante es altamente variable y depende de la cepa, el sustrato y las condiciones de incubación, así como las características de las fases de crecimiento bacteriano (Al-Mallah y col., 1990). Las propiedades fisicoquímicas de los biosurfactantes de bajo peso molecular son influenciadas por los residuos de los ácidos grasos que contienen, y estos a su vez se ven afectados por la bacteria que los produce y al mismo tiempo por las condiciones de crecimiento y los nutrientes presentes (Saenz-Marta y col., 2015).

En experimentos de laboratorio, el cambio de la fuente de carbono afecta tanto la cantidad de biomasa producida, como la secreción de biosurfactante (Xia y col., 2012).

- **Fuente de carbono**

Uno de los factores importantes a tomar en cuenta en la producción de biosurfactantes es la fuente de carbono utilizada, ya que algunos microorganismos producen estos compuestos en presencia de sustratos insolubles en agua, como aceites minerales y vegetales, mientras que otros prefieren el uso de carbohidratos, como fuentes de carbono solubles en agua (glucosa, fructosa, entre otros) (Bognolo, 1999; Krepsky y col., 2007; Viramontes y col., 2010). También existen microorganismos que pueden producir biosurfactantes en presencia de diferentes tipos de sustratos, incluyendo carbohidratos y otros compuestos insolubles en agua (Cameotra y Makkar 1998; Banat y col., 2000; Cameotra y Makkar 2004; Van Hamme y col., 2006, Makkar y col., 2011; Saenz-Marta y col., 2015). El tipo de fuente de carbono utilizado como sustrato influye directamente sobre la calidad y cantidad del biosurfactante (Mondragon, 2011), por otra parte la fuente de carbono utilizada por el microorganismo para la producción de biosurfactantes puede influenciar en la estructura del mismo (Saenz-Marta y col., 2015).

Adicionalmente, la disponibilidad de un sustrato específico influye en la biosíntesis del biosurfactante en este sentido, se han propuesto que la disponibilidad de la fuente de carbono puede

constituir un estimulador o inhibidor de la síntesis del compuesto (Nasrin y col., 2007; Xia y col., 2012). Es por ello que mucho de los trabajos realizados en este campo están relacionados con los factores fisiológicos que regulan la producción de biosurfactantes, con el fin de mejorar la eficiencia en la producción de los mismos (Xia y col., 2012).

La fuente de carbono también puede afectar la diferenciación entre biosurfactantes o bioemulsificantes, ya que en el caso de los bioemulsificantes poliméricos, éstos son reconocidos por sus propiedades emulsificantes. Sin embargo, al ser considerados como biosurfactantes siguen siendo capaces de generar cambios sobre la tensión superficial/interfacial, y el valor que alcanza depende de la naturaleza de la fuente de carbono (Satpute y col., 2010; Mnif y Ghribi, 2015b).

Otra característica que poseen los biosurfactantes y les confiere una ventaja desde el punto de vista económico y competitivo es el hecho de que puedan ser producidos a partir de desechos industriales agrícolas, alimenticios, entre otros (Gautam y Tyagi., 2006; Saenz-Marta y col., 2015). Además son capaces de ser ajustados a las distintas aplicaciones que puedan tener los biosurfactantes. (Cameotra y Makkar 1998, 2004; Banat y col., 2000; Van Hamme y col., 2006, Makkar y col., 2011).

Wei y col., (2005) y Prats y col., (2008) plantearon que las mejores condiciones de producción de biosurfactantes se logran mediante el uso de fuentes de carbono hidrofóbicas, como es el caso del aceite de oliva y el crudo; mientras que Saimmai y col., (2012a,b), reportan que los biosurfactantes producidos en fuentes de carbono solubles en agua (glucosa y sucrosa) presentan una mayor actividad como agentes tensoactivos a nivel de tensión superficial.

Sin embargo, la selección de la fuente de carbono no debería depender solamente de obtener la mayor tasa de producción, o la mejor calidad del biosurfactante, sino también de los procedimientos a seguir durante el estudio de estos compuestos activos. Como indica Morita y col., (2007) el aceite de soya es el mejor sustrato para la producción de lípidos de manitoltritol (MEL), pero sus procesos de producción y recuperación son complicados, por la remoción de los residuos del sustrato después

de la incubación, purificación y separación del MEL, además se requiere de una segunda purificación y separación de los productos de degradación por acción de lipasas, como lo son monoglicéridos y diglicéridos y ácidos grasos. Para mejorar la producción de MEL, el uso de fuentes solubles a agua y no de aceites vegetales, se presenta como mejor opción, haciendo de glucosa y glicerol las mejores fuentes de carbono solubles en agua para la producción de biosurfactante (Morita y col., 2007).

- **Factores ambientales**

La producción de biosurfactantes como muchas otras reacciones químicas, puede verse afectada por varios factores ambientales y condiciones de crecimiento, los cuales incrementan o inhiben su producción. Acorde a esto, factores ambientales como pH, salinidad, agitación, oxígeno disuelto y temperatura afectan la producción de biosurfactante (Gautam y Tyagi., 2006; Mondragon 2011).

El pH juega un papel clave en la producción de surfactolípido por *T. bombicola*. La producción de rhamnolípido en *Pseudomonas* sp., alcanza su punto máximo en rangos de pH entre 6 y 6,5, y disminuye drásticamente con valores por encima de 7. Adicionalmente, la tensión superficial y la CMC del biosurfactante debe ser capaz de ser estable en amplios rangos de pH, mientras que la actividad emulsificante está muy marcada por los rangos de pH (Gautam y Tyagi., 2006).

Una cepa termófila *Bacillus* sp., crece y produce biosurfactante a temperaturas por encima de los 40 °C. Tratamiento de calor sobre el biosurfactante no generan cambios significativos en las propiedades del biosurfactante, como lo son cambios en la tensión superficial e interfacial y la capacidad emulsificante, todas permanecen estables después de haber pasado por un tratamiento de 120 °C por 15 minutos (Gautam y Tyagi., 2006).

Gunther y col., (2005) muestran como los cambios de temperatura pueden afectar el comportamiento de las cepas de *Pseudomonas* sp., en la producción de glucolípidos. La producción de rhamnolípido alcanzó su mejor punto a temperatura ambiente, con crecimiento estático en el medio mínimo. Dichas condiciones de producción son opuestas a las condiciones óptimas de crecimiento de

P. aeruginosa, que incluyen una temperatura de 37 °C y una constante agitación, lo cual debería disminuir el costo energético requerido en proceso de producción de ramnolipidos. El potencial de este ahorro energético en concordancia con el uso de microorganismos no patógenos, hace más atractiva la producción de ramnolipidos utilizando la cepa en *P. chlororaphis*, (Gunther y col., 2005).

- **Tiempo de producción**

Los microorganismos tienen la habilidad de producir metabolitos tanto primarios como secundarios durante la curva de crecimiento. Los metabolitos primarios son producidos durante la fase exponencial, mientras que los metabolitos secundarios son producidos durante la fase estacionaria. Los metabolitos secundarios son muy importantes y altamente atractivos a nivel comercial desde el punto de vista de producción (Kalpana y col., 2012).

Los biosurfactantes son compuestos producidos por reacciones de metabolitos secundarios relacionados a las funciones de capacidad adhesión de las células y la motilidad, diferenciación y accesibilidad al sustrato y a las moléculas de carbono, así como almacenamiento de energía (Van Hamme y col., 2006).

En el caso de los ramnolipidos, estos son sintetizados cuando la fuente de carbono está en suficiente concentración para el crecimiento bacteriano, pero en condiciones restrictivas. Los ramnolipidos, cuya producción ocurre constitutivamente a bajo nivel, ya sean en sustratos solubles o insolubles en agua, son metabolitos secundarios producidos y cuya concentración incrementa durante una fase tardía en la fase exponencial, y una fase temprana de la fase estacionaria como consecuencia del incremento en la densidad celular (Vasllewa-Tonkova y Gesheva 2007; Pantazaki y col., 2010; Perfumo y col., 2010).

Sin embargo se debe vigilar constantemente la producción de una vez alcanzadas dichas fases de crecimiento. Desai y Banat, (1997) reportaron que cuando los nutrientes iniciales presentes en el medio de cultivo se vuelven deficientes, el biosurfactante puede ser metabolizado como la fuente de

carbono de los microorganismos, y esto puede llevar a que los mismos sean degradados en períodos largos de incubación, disminuyendo así su concentración en el medio (Zhou y col., 2015).

Utilizando como fuente de carbono melaza, y un tiempo de incubación total de 144 horas, Noparat y col., (2014a) tuvieron el mayor registro en la actividad del biosurfactante (27 mNm^{-1}), así como la mayor concentración a las 108 horas de incubación, cuando las células alcanzaron la mitad de la fase estacionaria. Los mayores registros de actividad del biosurfactate se encontraron cuando el crecimiento bacteriano se detuvo, o fue casi constante. La razón de estos resultados es posiblemente que la liberación del biosurfactante de la membrana bacteriana, mediante el rompimiento de su unión con esta, durante la fase estacionaria 96 horas, lo que llevo a un incremento en la actividad del biosurfactante en el medio (Noparat y col., 2014a).

Thavasi y col., (2008) reportaron que la concentración de biosurfactante producido por *Bacillus megaterium* fue mayor al alcanzar una etapa temprana de la fase estacionaria a las 132 horas, lo cual puede deberse a la liberación del biosurfactante de su unión a la membrana de las bacterias directamente al medio de cultivo, lo cual conlleva a un aumento en la concentración de biosurfactante extracelular. Esto demuestra que existe un patrón en las etapas de crecimiento y la producción de biosurfactantes. También se observó una disminución en la concentración de biosurfactante en el tiempo (Thavasi y col., 2008).

5. Métodos de detección de Biosurfactante

El interés en la producción de biosurfactantes ha llevado al desarrollo de métodos rápidos y eficientes, que sean capaces de identificar un gran número de microorganismos con potencial de producción en cultivos de gran escala, así como permitir la cuantificación del producto de interés (Mukherjee y col., 2006; Satpute y col 2008; Thavasi y col., 2011; Varjani y col., 2014, Mnif y Ghribi, 2015a; Saenz-Marta y col., 2015). Generalmente estos métodos de detección se basan en las propiedades de los surfactantes, sobretodo en la capacidad de disminuir la tensión superficial/

interfacial, generar emulsiones estables en el tiempo, la habilidad de las bacterias de interferir en la hidrofobicidad de la interface de las soluciones. Adicionalmente tenemos los métodos colorimétricos como es el caso del Agar Azul, que son idóneos para grupos específicos de biosurfactantes. (Walter y col, 2000; Mnif y Ghribi, 2015a). En la tabla 3, se describe brevemente algunos de los métodos más utilizados en la detección de los biosurfactantes.

Tabla 3. Comparación de métodos de detección de biosurfactantes, sus fundamentos, ventajas, desventajas y aplicabilidad como método de detección (Tabla modificada a partir de la publicada en Mnif y Ghribi, 2015")

Método de Detección	Fundamentación	Ventajas	Desventajas	Aplicabilidad	Tipo de metodología
Técnica de la Forma de la gota colgante	Registra cambios en la tensión superficial e interfacial al registrar el perfil de una gota colgada en un soporte.	Puede ser utilizado para la medición cuantitativa de la tensión superficial e interfacial. Requiere de bajos volúmenes	Requiere del uso de equipos especiales y/o software que en su mayoría requieren inversión monetaria	Utilizado para la detección de cepas productoras de BS y puede ser utilizado para monitorear la producción de BS en bacterias	Método Cuantitativo
Medición de la actividad emulsificante	Detección de las propiedades emulsificantes, al medir la altura y estabilidad en el tiempo de una capa de emulsión de aspecto cremoso, que se forma al agitar dos líquidos inmiscibles.	Fácil de ejecutar. Puede detectar tanto BS como BE	No específica para BS. Depende de la concentración del biosurfactante. No está correlacionada con la tensión superficial	Utilizada para la detección de cepas productoras de biosurfactante o BE.	Método mayormente cualitativo.
Dispersión de crudo	Medición de la tensión superficial por la formación de una dispersión del compuesto hidrofóbico sobre una superficie acuosa.	El área de desplazamiento creada por una solución con surfactante, es directamente proporcional a la concentración. Sensible a bajas concentraciones de BS	No diferencia BS de BE	Utilizada para la detección de cepas productoras de biosurfactante.	Método semicuantitativo
Método del colapso de la gota	Detección por cambios en la tensión interfacial al estudiar el comportamiento de una gota sobre una superficie hidrofóbica (aceite).	Método sensible y fácil de producir para la detección de BS. También La estabilidad de la gota esta correlacionada con la tensión superficial e interfacial.	No detecta bajas concentraciones de BS y puede generar falsos negativos.	Utilizado para la detección de cepas productoras de biosurfactante.	Método cualitativo, aunque puede ser utilizado para determinar cuantitativamente la concentración del BS.
Prueba de Para Film	Detección por cambios en la tensión	Rápida y sencilla. Al igual que el método del	Depende de la concentración del	Usada para la detección de	Método cualitativo

	interfacialal estudiar el comportamiento de una gota sobre una superficie hidrofóbica (parafilm).	colapso de la gota, la estabilidad de la gota esta correlacionada con la tensión superficial e interfacial. Puede agregarse agentes colorantes para observar mejor los resultados.	biosurfactante No detecta BE.	cepas productoras de BS.	
Adhesión Bacteriana a un Hidrocarburo (BATH)	Medición del índice de hidrofobicidad de las bacterias por un hidrocarburo mediante el grado de adsorción de las cepas por los mismos.	Algunos autores la recomiendan para detectar BE. No se requiere de ningún equipo especial para su medición.	Método indirecto para la detección de cepas productoras de BS. Varios parámetros pueden alterar los resultados	Aprobado por varios investigadores para evaluar la producción de biosurfactante.	Método cualitativo
Actividad Hemolítica (Agar Sangre)	Detecta microorganismos con potencial de producción por la presencia de moléculas activas de surfactantes mediante la ruptura de las células de sangre (lisis hemolítica)	Prueba simple y fácil de ejecutar para detectar actividad de BS	No es específica, ya que no diferencia entre enzimas líticas o factores virulentos que presentan el mismo comportamiento que los BS. Puede estar limitada por la mala difusión de los surfactantes.	Puede ser calificada como ensayo preliminar para la detección de aislados bacterianos productores de BS y debe ser complementada por estudios de actividad emulsificante y medición de tensión superficial.	Método cualitativo
Agar Azul	Detecta microorganismos con potencial de producción por la formación de un halo en presencia de un surfactante de carga iónica opuesta al biosurfactante producido	Simple y fácil de ejecutar	Detecta grupos específicos de biosurfactantes.	Es utilizado ampliamente para la detección de ramnolipidos	Método cualitativo, aunque también puede ser calificado como método semicuantitativo
Producción de Lipasa (Placas con Tween)	Detecta microorganismos con potencial de producción por su capacidad de degradar fuentes lipídicas gracias a la excreción de lipasas	Simple y fácil de ejecutar.	Solo detecta aquellos organismos capaces de producir lipasas. La producción de lipasas no siempre tiene correlación con la tensión superficial	El estudio de la lipasa, se debe a que estas enzimas pertenecen al grupo de las hidrolasas se encargan de hidrolizar los triglicéridos para dar ácidos grasos libres y glicerol.	Método cualitativo

a. Métodos basados en la medición y el comportamiento de la tensión superficial/interfacial

Fundamentado en las propiedades de los biosurfactantes, se han desarrollado, una avariedad de metodologías para la detección de cepas productoras de estos compuestos, las cuales incluyen tanto medición directa de la tensión superficial/interfacial, como determinación de la actividad interfacial de dichos compuestos, mas no en su medición directa (Walter y col., 2010; Mnif y Ghribi, 2015a).

Para la medición directa del comportamiento de la tensión superficial e interfacial, se utilizan tensiómetros, que son equipos especiales capaces de determinar la tensión superficial/ interfacial de un líquido o compuesto en otro. La presencia de surfactantes en las soluciones disminuye drásticamente la tensión superficial, lo cual hace que este método sea el más confiable para la detección de estos compuestos. Adicionalmente, mediante la medición de la tensión superficial se puede determinar el punto de la CMC (Mnif y Ghribi, 2015a). Entre los métodos utilizados, uno de los más populares es la técnica de la gota colgante (Van der Vegt y col., 1991; Arashiro y Demarquette 1999), la cual al requerir bajos volúmenes de muestra tiene una ventaja sobre otros métodos de medición de tensión superficial. Sin embargo, este método requiere de equipos especiales, además de consumir mucho tiempo ya que no permite hacer varias mediciones en forma simultanea.

Otra ventaja de la medición directa de la tensión superficial/interfacial es que puede ser considerado como un método cuantitativo, el cual tiene adicionalmente la capacidad de diferenciar los biosufacantes de los bioemulsificantes.

La tabla 3 incluye además métodos cualitativos, los cuales detectan la presencia de biosurfactantes de manera indirecta por la medición de los cambios que genera la presencia de biosurfactantes sobre la tensión superficial/interfacial. Entre los métodos presentados están: la *actividad emulsificante* (Cooper y Goldenber, 1987); *dispersión de aceite* (Youssef y col 2004), *Método de Colapso de la Gota* (Bodour y Miller-Maier, 1998), *Prueba con Para-Film* (Kalyani y col. 2014) y *Adhesión Bacteriana a un Hidrocarburo* (BATH) (Thavasi y col., 2011). Estos métodos

cualitativos tienen la ventaja de no requerir equipos especiales y se pueden medir una gran cantidad de muestras de manera simultánea. Sin embargo, su principal desventaja es que al ser cualitativos, y en algunos casos, los resultados de las pruebas no están relacionados con los cambios en la tensión superficial, situación que no garantiza plenamente la presencia de los biosurfactantes (Youssef y col 2004; Plaza y col. 2006; Chen y col, 2007; Mnif y Ghribi, 2015a).

En este contexto el uso de los métodos cualitativos tienen limitaciones, que podrían llevarnos al siguiente problema, si bien la mayoría se fundamenta en cambios que sufre la tensión superficial/interfacial, se conocen agentes biosurfactantes que no generan cambios significativos en la tensión como es el caso de los bioemulsificantes. Esto ha resultado en la eliminación de buenos emulsificantes por presentar resultados negativos en los métodos de detección utilizados. En tal sentido, Maneerat y Dikit (2007); Satpute y col., (2008); Uzoigwe y col., (2015) sugieren el uso de la medición de actividad emulsificante y el índice de BATH como métodos orientados hacia la detección de bioemulsificantes con respecto a los biosurfactantes. La actividad emulsificantes mide la capacidad de emulsificar cualquiera de las superficies de las moléculas activas con diferentes hidrocarburos, mientras que el índice de BATH se basa en la detección de la unión de los agentes emulsificantes a la membrana celular de los microorganismos.

b. Métodos de detección por comportamiento específico

Existen otros métodos de detección que no se basan en los cambios generados sobre la tensión superficial/interfacial, sino más bien se han desarrollado basados en el comportamiento de las bacterias en medios de crecimiento específicos, (Tabla 3), los mismos se fundamentan en que la producción de biosurfactantes genera cambios sobre la membrana de los microorganismos y a nivel extracelular, la presencia de estos se detectara de acuerdo al comportamiento de las cepas en estos medio. Entre estos métodos se incluyen a los denominados: *actividad hemolítica* (Carrillo y col 1996), *agar azul* (Siegmund I y Wagner F, 1991) y *producción de lipasa* (Vanavil y col., 2013).

Un aspecto a considerar en los métodos de detección, es que, independientemente de ser métodos cualitativos o cuantitativos, todos estos procedimientos requieren una previa inoculación, la cual sin una selección preliminar de cepas con potencial de producción, puede llevar a una gran cantidad de gasto de material y tiempo innecesarios. Esto le da una gran ventaja a los métodos de comportamientos específicos, ya que no requieren una inoculación previa, permitiendo así el ahorro de materiales y tiempo al considerar el estudio simultaneo de un gran número de organismos de interés, y en algunos casos, como sucede con el agar azul, pueden indicar que tipo de biosurfactante se está produciendo. Sin embargo, como muestra la tabla 3 estas pruebas también presentan sus limitaciones y desventajas.

En este sentido Satpute y col 2008; Thavasi y col., 2011; Varjani y col., 2014, Mnif y Ghribi, 2015a recomiendan que se utilicen distintos métodos de detección, así como una organización en el esquema de detección, ya que cada prueba presenta sus propias ventajas y desventajas, dando una caracterización primaria, secundaria y terciaria según el uso de los métodos de detección (Youssef y col., 2004).

6. Mecanismos de extracción de biosurfactantes/bioemulsificantes

La recuperación del biosurfactante depende de su carga iónica, su solubilidad en agua y localización en relación al microorganismo (intracelular, extracelular y/o unido por enlaces con la membrana celular) (Gautam y Tyagi, 2006). Varios métodos de extracción han sido ampliamente reportados en la literatura, incluyendo precipitación por ácidos, extracción por solvente, cristalización, precipitación con sulfato de amonio y centrifugación (Youssef y col., 2005; Tonkova y Gesheva, 2007; Thavasi y col., 2008; Anandaraj y Thivakaran 2010; Qiao y Shao, 2010; Saimmai y col., 2012a,b; Xia y col., 2012; Ali y col., 2013; Pradhan y col., 2013; Liu y col, 2013; Chakraborty y col., 2014; Kalyani y col., 2014; Mariashobana y col., 2014; Saminathan y Rajendran, 2014; Velioglu y Urek, 2014; Pathaka y Nakhate 2015; Sharma y col., 2015).

Los métodos clásicos de separación del biosurfactante (extracción por solventes y precipitación) requieren de grandes volúmenes de solventes organicos, como lo son acetona, metanol y cloroformo son en su mayoría tóxicos y dañinos para el medio ambiente (Witeck-Krowiak y col., 2011). Además, para el aislamiento de una muestra se deben de utilizar varios mecanismos de separación de manera simultánea, lo cual consume grandes cantidades de tiempo y dinero en soluciones. Ante esta desventaja se utilizan los métodos continuos para la separación los cuales ayudan en la reducción de costos y permiten la extracción del biosurfactante de varias muestras a la vez en menos tiempo ((Desai y Banat, 1997; Banat, Makkar y Cameotra, 2000; Makkar y Cameotra, 1997; Satpute y col., 2010; Witeck-Krowiak y col., 2011), sin embargo estos no permiten una separación total del biosurfactante de otros elementos presentes en la solución que puedan afectar sus capacidades tensoactivas. Otra medida tomada es la sustitución de estos solventes por otros mucho más económicos y menos tóxicos como el metil terciario butil éter ha sido utilizado con buenos resultados recientemente en *Rhodococcus*. Este tipo de solventes son de bajo costo, menos tóxicos y muy accesibles, pueden utilizarse y reducir el costo de forma sustancial y minimizar el daño ambiental (Gandhimathi y col., 2009). Sin embargo, el proceso de purificación aun requiere de grandes cantidades de gastos y se corre el riesgo de contaminación por con elementos indeseados de la fermentación y/o del mismo mecanismo de purificación (Satpute y col., 2010).

Los procesos más utilizados en el sistema Batch son la extracción con cloroformo:metanol, diclorometano:metanol, butanol, acetato de etilo, pentano, hexano, ácido acético, éter, entre otros. Por su parte el método más utilizado en el sistema continuo es la centrifugación. En la tabla 4, se mencionan los procesos de extracción continuos y Batch más comunes para la recuperación de biosurfactantes

Tabla 4. Procesos de recuperación y mecanismo de extracción del biosurfactante (Tabla modificada a partir de la publicada en Gautam y Tyagi, 2006)

Proceso	
Sistema BATCH	Sistema continuo
Amm, precipitación con sulfato de amonio	Centrifugación
Precipitación por acetona	Adsorción
Precipitación ácida	Separación por formación de espuma y precipitación
Extracción por uso de solventes	Filtración de flujo tangencial
Cristalización	Diafiltración y precipitación
	Ultrafiltración

7. Identificación de los biosurfactantes

La identificación del biosurfactante usualmente se realiza a partir de una muestra purificada partiendo de los métodos de extracción y mediante la caracterización química de la estructura molecular del mismo, a partir de los componentes de su sección hidrofílica e hidrofóbica. Normalmente entre los mecanismos utilizados para esta caracterización tenemos: cromatografía de gases y HPLC, análisis de infrarrojo (FTIR), espectroscopia de masas (NMR), análisis de la resonancia magnética de la estructura nuclear de los componentes del biosurfactante, entre otros (Pornsunthorntaweewee y col., 2008; Bharali y Konwar, 2011; Pradhan y col., 2013; Chakraborty y col., 2014; Noparat y col., 2014b; Gudiña y col., 2015; Sharma y col., 2015a). Sin embargo, los equipos utilizados para estos procesos ocupan grandes espacios y tienen alto costos, por lo que no se encuentran en todos los laboratorios. Otra desventaja es que no permiten la caracterización de varias muestras de manera simultánea y relacionado con la caracterización química, debido al uso de solventes polares para la extracción en ocasiones tanto los biosurfactantes como los bioemulsificantes al ser purificados pueden perder parte del componente que les da la capacidad tensioactiva (Maneerat y Dikit, 2007; Zhang y col., 2008; Olteanu y col., 2011).

El segundo método más utilizado para la caracterización de biosurfactantes es la identificación de la especie o en su defecto del género bacteriano, ya que el tipo de biosurfactante depende en gran medida del microorganismo que lo produce. Por esta razón, se utilizan técnicas de identificación a nivel molecular, que permiten identificar el organismo hasta nivel de especie con un alto grado de confianza (Bodour y col., 2003; Kermanshahi y Peymanfar, 2012; Sathe y col., 2012; Saimmai y col.,

2012a,b; Xia y col., 2012; Al-Bahry y col., 2013; Pradhan y col., 2013; Barin y col., 2014; Chakraborty y col., 2014; Hassan y col., 2014; Kalyani y col., 2014; Mariashobana y col., 2014; Panjiar y col., 2014; Sharma y Saharan, 2014; Al-Sayegh y col., 2015; Sharma y col., 2015; Silva y col., 2015; Zhou y col., 2015) Sin embargo no todos los laboratorios cuentan con los implementos necesarios para una identificación a nivel molecular y al igual que en la caracterización química, no se puede utilizar para estudiar varias muestras de manera simultánea. Es por ello que la mayoría de los investigadores se conforman con llegar al género bacteriano mediante ensayos con pruebas bioquímicas, lo cual permite identificar el género de varias muestras a la vez y esto es suficiente para estimar que tipo de biosurfactante se esta produciendo, además que tiene la ventaja de ser menos costosos que otros métodos mencionados y estar disponible su aplicación en la mayoría de los laboratorios de microbiología (Nasrin y col., 2007; Vasileva-Tonkova y Gesheva, 2007; Viramontes-Ramos y col., 2010; Anandaraj y Thivakaran 2010; Thavasi y col., 2011; Sathe y col., 2012; Al-Bahry y col., 2013; Ali y col., 2013; Pradhan y col., 2013; Chakraborty y col., 2014; Hassan y col., 2014; Kalyani y col., 2014; Pandey y col., 2014; Panjiar y col., 2014; Sharma y col., 2015).

Sin embargo la desventaja de la identificación a través de pruebas bioquímicas radica que en ocasiones una sola especie bacteriana es capaz de producir diferentes tipos de biosurfactantes (Pradhan y col., 2013). Es así el caso de *P. aeruginosa* la cual es una especie bacteriana capaz de producir tanto biosurfactantes como bioemulsificantes, y la estructura de los mismos varía de acuerdo a las condiciones de producción de estos compuestos (Tabla1, Tabla 2).

En este contexto, nos propusimos mediante el presente trabajo utilizar la actividad antimicrobiana de los biosurfactantes producidos para identificarlos, propiedad descubierta recientemente en estos compuestos y cuyos estudios han sido orientados para la sustitucion de antibioticos y otras actividades biomedicas (Rodrigues y col., 2006a; Rodrigues y Teixeira, 2008; Olteanu y col., 2011).

Por la capacidad de los biosurfactantes para generar variaciones en la hidrofobicidad de la membrana bacteriana debido a los cambios en la tensión superficial; la actividad antimicrobiana se genera por los cambios en la permeabilidad de la membrana lo cual permite inducir la formación de poros y canales iónicos en la bicapa lipídica. Como consecuencia de esto se genera la desestabilización de la membrana, al perturbar la integridad y permeabilidad de la misma. Además, la formación de poros en la membrana puede llevar a un aumento en el flujo de iones de la transmembrana, como lo son Na^+ y K^+ , que resulta en la disrupción de la membrana y por lo tanto, la muerte de la célula. Adicionalmente, al tener la habilidad de alterar la hidrofobicidad de la superficie de la célula, la adsorción de los biosurfactantes a superficies sólidas puede inhibir la bioadhesión de bacterias, jugando un papel clave en el control de organismos patógenos, previniendo así la formación de biopelículas. Esta capacidad de los biosurfactantes de inhibir el crecimiento de organismos patógenos es aplicada a nivel bacteriano y fúngico (Mnif y Ghribi, 2015b).

Lo interesante de la actividad antimicrobiana es que si bien esta descrita en casi todos los grupos de biosurfactantes y bioemulsificantes, la misma es extremadamente específica por el biosurfactante, es decir, que solo un tipo de biosurfactante dentro de los grupos estudiados presenta esta capacidad inhibitoria para organismos patógenos específicos. Un ejemplo lo podemos ver nuevamente en *P. aeruginosa*, la cual tiene la capacidad de producir distintos tipos de biosurfactantes. Sin embargo, solo los rhamnolípidos son capaces de presentar una respuesta antimicrobiana, permitiendo así la identificación de los posibles compuestos tensoactivos que se están produciendo. Otro ejemplo relacionado a la especificidad por los organismos patógenos, puede verse en los lipopeptidos producidos por *B. subtilis*, los cuales presentan una amplia actividad antimicrobiana en la mayoría de los agentes tensoactivos que produce, entre ellos destacan surfactina e iturina, sin embargo, a diferencia de surfactina, iturina no presenta actividad antimicrobiana contra ciertos agentes fúngicos.

Entre las ventajas que ofrece la identificación de biosurfactantes por su actividad antimicrobiana es que se pueden estudiar varias muestras de manera simultánea en intervalos de

tiempo cortos (para bacterias y levaduras 16-18 horas, para hongos tres días) para obtener resultados satisfactorios, y no requiere de equipos y/ o metodologías especiales. Todos los materiales necesarios se encuentran en la mayoría de los laboratorios de microbiología

En la tabla 5 podemos ver varios de estos agentes tensoactivos que presentan actividad antimicrobiana.

Tabla 5. Actividad antimicrobiana de varios biosurfactantes y los microorganismos que los producen (Tabla modificada a partir de la publicada en Rodrigues y col., 2006a)

Biosurfactante		Microorganismo	Actividad y Aplicación en biomedicina
Glucolípidos	Ramnolípidos	<i>P. aeruginosa</i>	Actividad antimicrobiana alta sobre todo en cepas Gram positivas, propiedades antifúngicas y antiadhesiva contra varias bacterias y levaduras
	Trehalosa	<i>Mycobacterium</i>	Actividad antibacteriana
	Soforolípidos	Levaduras	Actividad antibacteriana
	MEL	<i>Candida sp.</i>	Actividad antibacteriana sobre cepas gram positivas
	Glucolípido	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Actividad antiadhesiva contra varias bacterias y levaduras de muestras clínicas
Lipopeptidos	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	Actividad antimicrobiana tanto para cepas gram positivas como para gram negativas y propiedades antifúngicas. Actividad antiadhesiva
	Iturina	<i>Bacillus subtilis</i>	Actividad antimicrobiana y propiedades antifúngicas, con la excepción de especies del género <i>Fusarium</i> . Actividad Antiadhesiva
	Surlactina	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Actividad antiadhesiva de <i>P. aeruginosa</i> y varias bacterias entericas
	Lichenisina	<i>Bacillus subtilis</i>	Actividad antibacteriana
Acidos grasos	Fosfolípidos	<i>P. putida</i>	Actividad antiadhesiva de <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermis</i>
Emulsan	Manoproteína	<i>S. cerevisiae</i>	Actividad antiadhesiva de <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermis</i> y en <i>C. albicans</i>
Bioemulsificantes	No identificado	<i>Lactococcus latiss</i>	Actividad antifúngica contra <i>A. flavus</i> , y actividad antiadhesiva en gran variedad de bacterias y levaduras aisladas de muestras clínicas
	No identificado	<i>Lactobacillus paracasei spp.</i>	Actividad antimicrobiana contra gran variedad de bacterias y levaduras
	Acido graso	<i>Halomonas sp.</i>	Actividad antimicrobiana y propiedades antifúngicas

III. Antecedentes

1. Antecedentes internacionales

La habilidad de los microorganismos de degradar los hidrocarburos fue descrita por primera vez en 1895 por Misyoshi, quien reportó la degradación de parafina por acción microbiológica y varios años después, Bushnell y Hass (1941) fueron los primeros en demostrar la capacidad de las

bacterias de producir biosurfactantes, utilizando las cepas de *Corynebacterium simplex* y *Pseudomonas*, haciéndolas crecer en un medio mineral mínimo, el cual tenía kerosen, aceite mineral o parafina (Van Hamme y col., 2006; Saenz-Marta y col., 2015). Desde entonces numerosos estudios se han centrado en los mecanismos involucrados en la producción y función de los biosurfactantes (Zobel 1947; Saenz-Marta y col., 2015). Muchos tipos de especies de microorganismos, como bacterias, levaduras y hongos son capaces de degradar hidrocarburos, y las bacterias han sido descritas como mejores agentes productores de biosurfactantes. Sin embargo, la razón exacta por la cual los microorganismos producen biosurfactantes no es del todo clara (Saenz-Marta y col., 2015).

La recuperación de crudo en zonas impactadas mediante el uso de microorganismos fue propuesta en 1920 y mayormente aceptada a principios de 1980. Entre las tecnologías conocidas para la recuperación de crudo (EOR), tenemos la llamada MEOR, en la cual se usan los mismos microorganismos presentes en la zona de explotación petrolera para mejorar la extracción del crudo (Van Hamme y col, 2003; Mondrangón Mora 2011).

Originalmente, los biosurfactantes llamaron la atención como agentes para disolver hidrocarburos a finales de 1960, siendo considerados como potenciales sustitutos de los surfactantes sintéticos, especialmente en las áreas de desarrollo de la industria de alimentos, farmacéutica e industrias de aceites. Los surfactantes sintéticos usados en la actualidad usualmente son tóxicos y difíciles de degradar por microorganismos, causando daños al medio ambiente (Saenz-Marta y col., 2015). Sin embargo, no es sino hasta finales de 1970, después que se reconoce el impacto de los surfactantes sintéticos en los procesos de recuperación de zonas contaminadas con crudo, que se considera la posibilidad de utilizar los biosurfactantes en los procesos de biorremediación, empleándose principalmente en tecnologías de recuperación de crudo utilizando la acción de los microorganismos. (Shennan y Levi 1987; Cameotra y Makkar, 1998; Lakshimapathy y col., 2010); Yañez-Ocampo, 2013; Liang y col., 2014;).

Entre los estudios de biorremediación más relevantes que utilizandolos biosurfactantes, destacan aquellos relacionados con la biodegradación y el lavado de suelo, mientras que en los estudios de MEOR, resalta la capacidad de recuperar crudo mediante la *producción in situ* de biosurfactantes.

La habilidad de los biosurfactantes para acelerar la degradación de los compuestos orgánicos mediante los agentes biodegradadores, como microorganismos y plantas, entre otros, ha sido ampliamente estudiada para diversos contaminantes, sobre todo aquellos derivados del crudo, como lo son hidrocarburos alifáticos, aromáticos, ramificados y cíclicos. Los trabajos de Barkay y col., (1999); Martinez-Checa y col., (2007); Nieves y col., (2008); Franzetti y col., (2009); Obayori y col., (2009); Redy y col., (2010); Kang y col., (2010); Saimmai y col. (2012a) y Barin y col., (2014), han demostrado la capacidad de los biosurfactatnes, ya sea que fuesen producidos por microorganismos durante la inoculación o incorporación directa de los mismos, para degradar gran cantidad de derivados de hidrocarburos en condiciones de laboratorio, registrando tasas de degradación de los hidrocarburos hasta de un 90%.

Además de los procesos de biodegradación, otros de los usos de los biosurfactantes son las tecnologías involucradas en los lavados de suelo, y como puede sustituir a los surfactantes sintéticos usados para estos mecanismos de limpieza. Varios reportes (Urum y col., 2006; Franzetti y col., 2009; Franzetti y col., 2008; Lai y col., 2009; Kang y col., 2009), han demostrado que, no solo la combinación de los biosurfactantes con surfactantes sintético aumenta la tasa de remoción de crudo de las muestras de suelo contaminado, sino que la presencia de estos compuestos han mostrado una mayor tasa de remoción con respecto a la encontrada en los surfactantes sintéticos, solos o combinados con otros surfactantes, mostrando así su capacidad de poder reemplazar incluso los surfactatnes más utilizados para este tipo de trabajos, como lo son Tween 80/60/20, t Span 20/80/, Triton X-100 y SDS.

La principal ventaja del uso de biosurfactantes, es que estos puede iniciar los procesos de biorremediación mediante la inoculación de los microorganismos productores dentro de las áreas impactadas, sin necesidad de una caracterización química previa al inicio del proceso de biorremediación, como lo demuestran Das y Murkherjee, (2007), quienes al aplicar cultivos de bacterias productoras de biosurfactantes en muestras de suelo contaminado con hidrocarburos, reportaron un descenso en la concentración de crudo inicial presente en el suelo. Mientras que Joseph y Joseph, (2009) utilizaron directamente cultivos bacterianos sobre lodos petrolizados de tanques para el almacenamiento del crudo de los procesos de extracción. En sus resultados no solo reportaron altas tasas de biodegradación de los derivados de hidrocarburo, sino que también con el uso solo del cultivo bacteriano encontraron una alta tasa de remoción de productos que disminuían la calidad del crudo, facilitando así los tratamientos posteriores para la recuperación del crudo deseado en la industria petrolera. Mostrando así, otro de los potenciales usos de los biosurfactantes, en las tecnologías MEOR.

Si bien las tecnologías MEOR, no estan totalmente separadas de los procesos de biorremediación, están más orientadas a la recuperación de crudo durante los procesos de extracción y almacenamiento de crudo y durante los procesos de refinación, con el fin de aprovechar al máximo el material extraído y disminuir la producción de desperdicios que pueden actuar como contaminantes. Pornsunthorntawee y col., (2008), Bordoloi y Konwar (2008), en condiciones de laboratorio demostraron que la tasa recuperación de crudo no solo es más eficiente, tanto con la introducción de biosurfactantes, como con la de microorganismos productores, con respecto a la reportada bajo el uso de surfactantes sintéticos, sino que de acuerdo a Bordoli y Konwar (2008), esta tasa se mantiene distintas temperaturas y la misma no disminuye. Ventaja que se puede aplicar dependiendo de los procesos de manufactura utilizados durante la extracción. Por otra parte, en relación a las aplicaciones *in situ*, además del trabajo de Joseph y Joseph (2009), estan los de Jinfeng y col., (2005) y Haddadin y col., (2009), quienes utilizaron los inoculos bacterianos directamente en

pozos de recuperación y pizarras petrolíferas para mejorar la recuperación de crudo, y así disminuir el gasto energético requerido, reportando buenos resultados.

Sin embargo en la actualidad, aun con todos los trabajos planteados, y a pesar que es una de las prácticas comunes en MEOR, no hay muchos reportes del uso en esta tecnoca de biosurfactantes y biopolímeros producidos por microorganismos (Van Hamme y col, 2003; Mondrangón Mora 2011). La principal razón para ello, es que la producción de biosurfactantes (*ex situ* o *in situ*), siempre se ha visto en desventaja con respecto a los surfactantes sintéticos, debido a que en la producción de los biosurfactantes se genera un mayor gasto económico, requiere un mayor tiempo para su producción a gran escala y a las limitaciones en la detección de microorganismos capaces de producir biosurfactantes. Razones por las cuales, las principales investigaciones realizadas en los últimos tiempos están orientadas al mejoramiento en los procesos de producción por fermentación, estudios genéticos, y aplicaciones a escala comercial. Esto se ha llevado en conjunto al mejoramiento de los procesos de detección de biosurfactantes, desarrollando metodologías mucho más precisas y eficaces (Desai y Banat, 1997).

2. Antecedentes nacionales

Como país petrolero, Venezuela no está libre de los efectos generados por la contaminación de hidrocarburos, así como tampoco se desconoce el potencial de la biorremediación para recuperar dichas zonas contaminadas. En este sentido, se ha generado una extensa bibliografía que está solo orientada a procesos de biorremediación y la caracterización de las comunidades microbianas que pueden utilizarse con este fin (Gaspar 2002; León y col. 2009; Windevoixhel y col., 2009ab; Chirinos y col., 2010; Barrios, 2011; Windevoixhel y col., 2011; Zamora y col., 2012). Dentro de la caracterización de las comunidades microbianas, se destaca la capacidad hidrocarburoclástica de estos agentes microbianos, así como la capacidad de hidrolizar compuestos aromáticos, también el potencial para ser utilizada con el fin de promover la producción de biosurfactantes.

Entre los primeros trabajos que podemos encontrar relacionado a la producción de biosurfactantes en Venezuela es el de Rocha y col., (1992), en el cual, se estudió la capacidad de producción de biosurfactantes de cepas aisladas de distintas fuentes de extracción de crudo. Encontraron que 8 aislados bacterianos eran capaces de producir biosurfactantes y que generaban cambios significativos al crudo utilizado como fuente de carbono, entre los cuales destacan la capacidad de romper la capa de crudo en pequeñas esferas, cambios de coloración, dispersión de crudo, entre otros. Con estos 8 aislados bacterianos, se concentraron en el estudio de dos, los cuales presentaron los mejores resultados en los cambios ocurridos en el crudo. Así, ambas cepas fueron identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* (MEOR 171 y MEOR 172) y se procedió a estudiar las condiciones de producción, así como las capacidades tensoactivas de dichos biosurfactantes producidos, los cuales fueron identificado como ramnolípidos, y presentaban la habilidad de reducir la tensión superficial de 72 mN/m a 29 y 27,5 mN/m respectivamente. Llegando a la conclusión que son excelentes agentes para procesos de recuperación de crudo (EOR), como lo son el transporte, limpieza de tanques de almacenamiento, descontaminación de áreas impactadas y tecnologías MEOR. Este trabajo podría considerarse como pionero en los estudios de producción y caracterización de cepas productoras de biosurfactantes aisladas directamente de zonas impactadas con hidrocarburos.

A partir de este trabajo, se presenta una gran cantidad de reportes en relación a los estudios de producción de biosurfactantes. Bastardo y col., (1996) estudió la cinética de crecimiento de bacterias aisladas de las aguas de formación provenientes de una fosa de desecho de crudos pesados ubicada en la Faja Petrolífera del Orinoco (FPO), y los resultados mostraron la capacidad de degradar algunas fracciones de crudo, así como la capacidad de reducir la tensión superficial de 59,0 mN/m a 40,5 mN/m a las 120h y la formación de emulsiones estables en las interface agua-crudo.

Seguidamente, Hernández (1999), evaluó la producción de surfactantes a partir de distintos sustratos, tales como: sacarosa, aceite de soya, y mezcla de ambos, utilizando un grupo de bacterias aisladas de fosas de reacción de la compañía petrolera Corpoven. Estas bacterias fueron seleccionadas

luego de una serie de pruebas bioquímicas de actividad enzimática que permitieron conocer a su capacidad para degradar y metabolizar ciertos sustratos. Determinó la cinética de crecimiento bajo estos tres sustratos y determinó la presencia del biosurfactante mediante la medición de la tensión superficial. Finalmente, incluyó la determinación de la estructura del mismo mediante la caracterización química. El trabajo de Hernández implicó una preselección de las cepas de acuerdo a su perfil fenotípico específico, además, también determinó en este consorcio bacteriano, que la fuente de carbono idónea para la producción de biosurfactante era la sacarosa.

Trabajos posteriores relacionados al estudio en la producción de biosurfactantes a partir de cepas previamente seleccionadas, bajo condiciones limitantes de crecimiento (Araujo y col., 2008; Sulbarán y col., 2002; Angulo y col., 2015).

Otros trabajos (Sulbarán 2002; León 2008; y Gaspar 2009), reportaron la detección de cepas con potencial de producción de biosurfactantes mediante el estudio de la actividad emulsificante, medición de la tensión superficial, la caracterización de la actividad hemolítica, capacidad de utilizar crudo y acetato como fuente de carbono.

Más recientemente, Barrios (2011) incorporó otro tipo de actividad característica en potenciales cepas productoras de biosurfactantes, como lo es la producción de emulsiones estables en el tiempo de producción del biosurfactante. Sin embargo, el uso de un bajo número de pruebas para la detección de cepas con potencial productor de biosurfactantes, plantea el problema de descartar excelentes compuestos tenso-activos, los cuales podrían ser de utilidad para la industria. Otro aspecto a tomar en consideración es la complejidad de los biosurfactantes, que podrían generar diferentes tipos de respuestas en las pruebas realizadas para su detección, llevando a posibles falsos negativos, donde la prueba no es capaz de detectar la cepa productora de biosurfactante o falsos positivos, en la prueba indica la presencia de cepas con potencial, pero esta no es capaz de producir biosurfactantes.

Entre los trabajos realizados en la investigación de biosurfactantes, encontramos que Kumar y col., (2006a) lograron la producción de biosurfactantes por la cepa *Pseudomona putida*, degradadora de hidrocarburos aromáticos poli cíclico, mediante la medición de la tensión superficial, dispersión de aceite (OSM), colapso de la gota (DC) e índice de emulsificación (E_{24}). Ese mismo año, Kumar y col., (2006b) utilizaron los mismos métodos, esta vez para medir la producción de biosurfactantes nuevamente con *Pseudomona putida*, con el fin de estudiar el nivel de biodegradación de crudo en presencia de una cepa tanto degradadora como productora de biosurfactante.

Continuando con sus investigaciones, Kumar y col., (2007), utilizaron nuevamente estos métodos junto con la adición de la medición de la actividad hemolítica y el estudio de la adherencia bacteriana a un hidrocarburo (BATH), en el estudio de la producción del biosurfactante producido por la cepa termófila *Bacillus* sp. DHT, aislada de un suelo contaminado con hidrocarburo. Finalmente Kumar y col., (2008) reportan nuevamente el estudio la producción de biosurfactante de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* DHT2, aislada también de un suelo contaminado con hidrocarburos, con todos los métodos mencionados anteriormente e incluyendo en esta ocasión el Agar Azul suplementado con CTAB, esto con el fin de poder caracterizar la presencia de ramnolipidos producidos por esta cepa.

En todos sus trabajos, Kumar y col., (2006a, 2006b, 2007, 2008) no solo utilizó varios métodos de detección, sino que también trabajo bajo condiciones de crecimiento limitante con fuentes de carbono solubles (Kumar y col., 2006b) e insolubles en agua (Kumar y col., 2006a, Kumar y col., 2007; Kumar y col., 2008), así como períodos de tiempo muy cortos (24 horas; Kumar y col., 2006b) o medianamente largos (4 días; Kumar y col., 2006a, Kumar y col., 2007; Kumar y col., 2008), de acuerdo a la fuente de carbono utilizada. Sin embargo, todos estos trabajos estaban orientados al estudio de cepas específicas, más no a el uso de dichos métodos para la detección de cepas con el potencial de producción de biosurfactantes y/o bioemulsificantes sin una previa identificación.

Por otro lado, Bozo y col., (2012), si utilizaron los métodos de detección para la selección de cepas con potencial de producción de biosurfactante sin previa identificación de las mismas. De igual manera, sometieron las cepas bacterianas a condiciones idóneas para la producción de biosurfactantes. Sin embargo para este trabajo solo se utilizaron los métodos de detección de medición de la actividad emulsificante y tensión superficial.

Si bien hay una gran variedad de trabajos, no podemos encontrar alguno en el cual se haga una detección de la comunidad bacteriana capaz de producir biosurfactantes, mediante una gran cantidad de métodos que aseguren la presencia de dichos compuestos y adicionalmente, el estudio en los cambios de producción por distintos parámetros como lo son factores ambientales o tipos de sustrato a utilizar, y finalmente también incluyan una identificación de aquellos compuestos que presenten características tensoactivas. Más aun el termino bioemulsificante que sabemos es de gran importancia en la identificación de estos agentes no ha sido utilizado. Este tipo de estudios es muy importante pues requiere de una caracterización correcta del tipo de compuesto que se esta produciendo para poder desarrollar la tecnología adecuada en la producción de dichos compuestos, sobre si el proceso de biorremediación es *in situ*.

Es importante destacar que Venezuela como país petrolero, se requeriría actualizar las metodologías implementadas en relación a la detección de cepas productoras de biosurfactante y su utilización en diferentes ambientes, tomando en cuenta que algunos de estos productos son más eficientes en ambientes acuáticos. Mientras que otros son más apropiados para la remoción de metales, y otros en la recuperación mejorada de crudo MEOR, lo que implica que, dependiendo de los objetivos de la investigación, habría que considerar el tipo de biosurfactante a utilizar.

3. Hipótesis

El ensayar métodos cuantitativos, cualitativos y de actividad específica para seleccionar cepas productoras de biosurfactante y/o bioemulsificante, permitirá obtener una metodología alternativa eficiente para la selección de cepas bacterianas con esta capacidad.

IV. Objetivos

1. Objetivo General

Utilizar métodos cuantitativos, cualitativos y de actividad específica así como condiciones de producción, para seleccionar e identificar cepas potenciales productoras de biosurfactantes y/o bioemulsificantes, a fin de proponer una metodología que recopile aspectos relevantes que permita de forma eficiente la selección de cepas con esta capacidad.

2. Objetivos específicos

1. Determinar si el tiempo de incubación y diferentes fuentes de carbono afectan la producción de biosurfactanes y/o bioemulsificantes.
2. Evaluar la eficiencia de distintos métodos utilizados para la detección de biosurfactantes y/o bioemulsificantes.
3. Utilizar como criterio para la identificación de los biosurfactantes y/o bioemulsificantes producidos: la taxonomía de las cepas bacterianas productoras, su actividad antimicrobiana y la caracterización química de dichos compuestos.

V. Metodología

1. Selección de las cepas bacterianas con potencial de producción de biosurfactante

1.1 Selección de las cepas

Se seleccionaron aislados bacterianos del cepario del proyecto Misión Ciencia, "Desarrollo y validación de nuevas tecnologías para el saneamiento ambiental de pasivos generados por la actividad petrolera.", provenientes de la fosa petrolera LG-276-F1, (o Fosa Meteorizada) del bloque Junín FPO, localizada a 8°55'7,3" N. y 63° 48' 9,4" W, abierta hace unos 30 años. Según la información suministra por PDVSA respecto al proyecto, actualmente la fosa se encuentra inactiva y presenta un proceso de meteorización, y el tipo de crudo ahí depositado es mediano-liviano.

En total se seleccionaron 23 cepas bacterianas que presentaron un perfil fenotípico específico, es decir, se caracterizaron por presentar una respuesta positiva al crecimiento en caldo de petróleo (Cu+), indicador de la tolerancia de las cepas a este medio, y en lignina (Lig+) y celulosa (Cel+), indicadores de crecimiento ante moléculas de alta complejidad, lo cual las hace posibles productoras de biosurfactantes (Barrios 2011).



Figura 4. Vista de la fosa LG-276-F1.

1.2 Construcción de cepario

Las cepas seleccionadas fueron activadas en viales con 3 ml de Caldo Nutritivo (CN), y se incubaron a 37 °C por 24-48 horas. Luego se sembraron por agotamiento en placas de AN, para verificar el estado de pureza de las cepas. Tras comprobar que las muestras seleccionadas solo presentaran un morfotipo bacteriano, se procedió a constituir el cepario a ensayar, tomando una muestra de la placa y sembrándola por agotamiento en tubos con AN en forma de pico de flauta e incubados a 37 °C por 24-48 horas, para asegurar el crecimiento de las mismas en los tubos.

Cuando las bacterias presentaron un crecimiento positivo en los tubos con medio se almacenaron a temperatura ambiente hasta su próximo uso.

2. Obtención del biosurfactante

2.1 Producción del biosurfactante

Las cepas seleccionadas se activaron en 15 ml de CN, y se incubaron a 37 °C por 24 horas. Posteriormente se uso una concentración bacteriana utilizando solución salina al 0,85% y la turbidez de la solución Mcfarland N°2 como patrón para la concentración de las bacterias () (Hassan y col., 2014).

Una vez preparada la muestra, se tomó una alícuota de 4 ml de la cepa y se mezcló en fiolas de 125ml de capacidad, con 36 ml de Medio Mínimo Salino (MMS) (Barrios, 2011). Se estudió el efecto de distintas fuentes de carbono sobre la producción de biosurfactante al comparar: Glucosa, Acetato de sodio, Gasoil y Aceite de Oliva (Pradnya y Dhiraj, 2014; Hassam y col., 2014) Todas las fuentes de carbono se agregaron hasta alcanzar una concentración final del 2% v/v (Pradnya y Dhiraj, 2014; Hassam y col., 2014). Las mismas fueron incubadas a temperatura ambiente (Pradnya y Dhiraj, 2014) en un agitador orbital a 50 rpm, por siete días (Kalyani y col, 2014) y por duplicado.

Durante los siete días de incubación, se hicieron observaciones referentes al crecimiento y la presencia o ausencia de biopelículas. Adicionalmente, se clasificaron de manera cualitativa los niveles de crecimiento encontrados de la siguiente manera: (-) no se observó turbidez en el medio; (+) turbidez desde muy leve hasta intermedia; (++) turbidez densa; (+++), turbidez densa y con presencia de materia en suspensión.

2.2 Extracción del biosurfactante

Cumplido el tiempo de incubación, tres y siete días respectivamente, todas las cepas fueron centrifugadas a 4500 r.p.m durante 30 minutos (Hassam y col., 2014). El sobrenadante de las cepas para los métodos cualitativos y cuantitativos, y el pellet que contiene el material biológico para la prueba de BATH. Ambos fueron almacenados a 4 °C (Anandaraj y Thivakaran, 2010; Thavasi y col., 2011).

3. Metodología para detectar cepas Productoras de Biosurfactante

Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Se utilizó *Pseudomona aeruginosa*, proveniente de la muestra B9I9, del mismo proyecto Misión Ciencia como control positivo para las pruebas de detección por actividad específica. Para los métodos de detección de biosurfactantes basados en los cambios de tensión superficial/interfacial, directa e indirecta se utilizó Lauril Sulfato de Sodio (SDS) al 2% como control positivo y como control negativo agua destilada.

3.1 Estudio de Producción de Espuma

Durante el período de incubación señalado en el punto 2.1, se hizo seguimiento a las cepas a los 4, 5, 6 y 7 días de iniciada la incubación en búsqueda de agentes espumosos, como un indicadores de la producción de biosurfactante (Barrios, 2011). Las cepas fueron clasificadas según su capacidad de producir espuma en: (-) no productoras; (+) formación de microgotas; (++) formación de ligera capa de espuma estable; (+++) formación de altas cantidades de espuma.

3.2 Actividad Hemolítica

La actividad hemolítica se midió al inocular por punción una colonia de las cepas en AN, en placas de Agar Sangre suplementadas con sangre desfibrilada de conejo (50gr/l), e incubadas a 37 °C por 48-72 horas. Al momento en que se realizó la prueba, con ayuda de una varilla de aluminio, se procedió a calentar la punta y a abrir unos pocillos en las placas de agar, con una profundidad de 5 mm (Gunther y col., 2005). Se considerarán positivas aquellas cepas que presentaron una zona clara alrededor de las colonias (Anandaraj y Thivakaran 2010).

Las cepas se clasificaron utilizando como criterio el diámetro del halo observado alrededor de las cepas: (-) no presenta hemólisis; (+) hemólisis completa con un halo de diámetro <1 cm; (++) hemólisis completa con un halo de diámetro >1 cm pero < 3 cm; (+++) hemólisis completa con halo de diámetro $\geq$ 3 cm, (Youssef y col, 2004). Adicionalmente, se clasificaron de acuerdo al tipo de comportamiento del halo, donde α -hemólisis se presenta cuando la colonia está rodeada por una zona difusa de color verde, β -hemólisis, cuando la colonia está rodeada por una zona clara, y γ -hemólisis, cuando no se presenta ningún cambio alrededor de la colonia, (Carrillo y col., 1996; Saravanan y Vijayakumar, 2012)

3.3 Agar Azul

La presencia de un biosurfactante/bioemulsificante, se determinó mediante su naturaleza iónica a través del método del Agar Azul. Para ello, se prepararon placas de agar medio mínimo mineral (Barrios, 2011), suplementado con 20 gr/l glucosa como fuente de carbono y 0,005 gr/l de azul de metileno (Siegmund I y Wagner F, 1991). Para la naturaleza aniónica y catiónica del biosurfatante, se utilizaron 0,5 gr/l de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) como agente catiónico y 0,5 gr/l de sodio dodecil sulfato (SDS) como agente anionico (Saranya y col., 2015). Al momento en que se realizó la prueba, con ayuda de una varilla de aluminio, se procedió a calentar la punta y a abrir unos pocillos en las placas de agar, con una profundidad de 5 mm (Gunther y col., 2005).

En cada pocillo del agar, utilizando un asa de platino, se agregó una muestra de los aislados bacterianos activados en CN. Las placas incubaron a 37 °C por 48-72h (Saranya y col., 2015), siendo revisadas periódicamente. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se almacenaron a 4°C durante 24 horas, con la finalidad de oscurecer los halos formados en el medio, permitiendo así una mejor observación de aquellas cepas que presentasen bajas concentraciones de biosurfactantes (Gunther y col., 2005).

Las cepas se clasificaron utilizando el siguiente criterio: (-) ausencia de algún tipo de pigmentación; (+) pigmentos visibles en el pocillo; (++) pigmentos alrededor del pocillo; (+++) pigmentos alejados del pocillo (Pinzon y Ju, 2009).

3.4 Producción de Lipasa

La capacidad de producir compuestos degradadores de lípidos (lipasa), se realizó al estudiar el comportamiento de las cepas bacterianas al crecer en medio cuya composición será de: 1 gr de peptona, 0,5 gr de NaCl, 0,001 gr de CaCl₂, 1.5 gr de Agar y 1 gr de Tween 80 en 100 ml de agua destilada (Vanavil y col., 2013). La producción de lipasa se midió al sembrar por agotamiento una colonia de las cepas sembradas en AN, a las placas del medio mencionado, y que luego se incubarán durante 7 días a 28 °C (Lakshmipathy y col., 2010). La hidrólisis del Tween 80 se observó al encontrar un halo alrededor de las colonias, siendo esta la evidencia de la producción de enzimas lipolíticas (Vanavil y col., 2013).

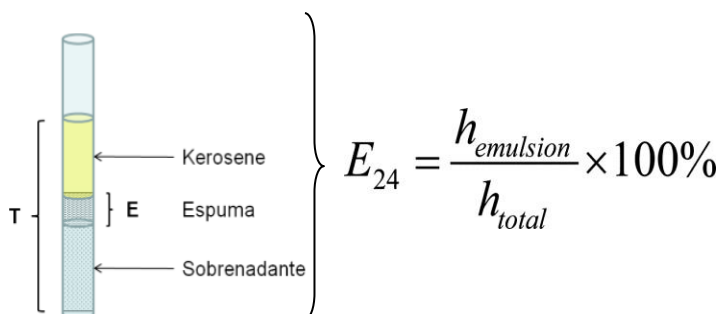
Para este trabajo, se establecieron los siguientes niveles de respuesta encontrados en esta prueba: (-) ausencia de cambios en el medio; (+), ligera opacidad alrededor de la colonia; (++) halo opaco rodeando la colonia; (+++) niveles muy altos de opacidad en los alrededores de la colonia.

3.5 Actividad Emulsificante

La actividad emulsificante se determinó mediante el índice de emulsión (E%) al mezclar 2 ml de kerosén con 2 ml del sobrenadante que se obtuvo en la sección (2.2) (Techaoei y col., 2007; Shaik y

col., 2013; Mariashobana y col., 2014). Se considera como respuesta positiva la formación de espuma estable entre las dos fases (orgánica con kerosene y acuosa con el sobrenadante), tras 2 minutos de agitación en vortex (Cooper y Goldenberg, 1987). Se tomaron las medidas de la altura de la capa de emulsión (cm) y la altura total de la solución (cm) evaluada a las 24, 48, 72 y 96 horas (Suresh y col., 2007; Lopes y col., 2014).

El índice de emulsión (E_{24}) es la altura de la capa de emulsión (E), dividido por la altura total (T) y multiplicado por 100.



$$E_{24} = \frac{h_{emulsion}}{h_{total}} \times 100\%$$

Figura 5. Esquema del ensayo de actividad emulsificante, utilizando kerosene, junto con la formula a utilizar para el cálculo del índice. Se destacan los parámetros para calcular el índice E_{24} ; la altura de la capa de emulsión (E) y la altura total (T).

Para este trabajo, se establecieron los siguientes niveles de respuesta encontrados en esta prueba: (-) no productora de espuma, (+) formación de emulsión, índice de $\geq 40\%$ a las 48 horas, (++) formación de emulsión, índice de $\geq 40\%$ a las 72 horas, (+++) formación de emulsión, índice de $\geq 40\%$ a las 96 horas.

3.6 Adhesión Bacteriana a un Hidrocarburo (BATH)

Utilizando la biomasa recuperada en la sección (2.2), la cual fue lavada dos veces utilizando solución salina al 0,85%, para evitar la presencia de biosurfactantes que pudiesen afectar los resultados de la prueba (Xia y col., 2012).

Una vez lavado el material biológico, este se midió en un espectrofotómetro, bajo 600 nm, y se ajustó la concentración bacteriana, a un rango de lectura de 0,4-0,6 de D.O., mediante dilución seriada con solución salina al 0,85% (Van der Mei y col., 1995). Luego, se tomaron 3 ml de esta solución bacteriana y se mezclaron con 150 μ l de crudo (Van der Mei y col., 1995; Thavasi y col., 2011), por triplicado. La mezcla se agitó por vortex durante 3 minutos, formado dos fases, la fase orgánica que

contiene el crudo, y la fase acuosa que contiene el material biológico. Tras la agitación, se permitió la separación del hidrocarburo y la fase acuosa durante 1 hora (Thavasi y col., 2008; Thavasi y col., 2011). Finalmente, se recuperó la fase acuosa del medio con ayuda de una micropipeta, y se midió la densidad óptica de la misma (Thavasi y col., 2008; Thavasi y col., 2011). Para la estimación de la hidrofobicidad de las células, se utilizó la siguiente fórmula:

$$H = \left(1 - \frac{A}{A_o}\right) \times 100\%$$

Figura 6. Fórmula utilizada para el cálculo del porcentaje de bacterias que adsorbieron el hidrocarburo. A_o =lectura obtenida antes de la agitación con hidrocarburo. A = lectura obtenida tras la agitación con hidrocarburo

Donde A_o representa la lectura de la fase acuosa original, y A representa la lectura de la fase acuosa tras ser agitado con el hidrocarburo (Walter y col., 2010).

Las cepas se clasificaron de acuerdo a los resultados al porcentaje de adsorción de las células de la siguiente manera: (-) 0-39% porcentaje de adsorción de las células; (+) 40-59% porcentaje de adsorción de las células; (++) 60-89% porcentaje de adsorción de las células; (+++) >90% de porcentaje de adsorción de las células (Thavasi y col., 2011).

3.7 Prueba con Para Film-M

A 2 ml de sobrenadante se les agregó una gota de azul de metileno. Luego se tomaron 10 μ l de esta mezcla y se colocaron sobre un fragmento de Para Film-M, asegurándose de dejar una gota sin perturbar sobre este. La forma de la gota fue examinada 1 minuto después de ser colocada sobre el Para Film-M. Si la gota mantuvo su forma entonces, se considerará como negativo, mientras que si la gota toma una forma plana o “colapsa”, se considerará positivo (Kalyani y col., 2014).

Para este trabajo, se establecieron los siguientes niveles de respuesta encontrados en esta prueba: (-) no cambia su forma; (+) la gota colapsa tras 1 minuto; (++) la gota colapsa a los 30 segundos, (+++) la gota colapsa inmediatamente.

3.8 Método del colapso de la gota, modificado (DC)

Esta metodología se realizó en un kit de poliestireno de 96 pocillos (12,7 x 8,5 cm). Antes de su uso en la prueba, dicho kit debe ser lavado tres veces en agua caliente, seguido de etanol al 95% y finalmente en agua destilada (Bodour y Miller-Maier, 1998; Pemmaraju y col., 2012). Tras esta preparación, cada pocillo del kit se cubrió con 2 μ l de aceite para motor 10W-30 marca Castrol, asegurándose de que todo el pocillo quede cubierto de aceite. La capa de aceite en los pocillos se dejara reposar durante 1 hora en un cuarto a temperatura ambiente, para asegurarse de que esta sea uniforme en todo el pocillo. Finalmente, se agregaron 5 μ l de alícuota del sobrenadante recuperado en la sección 2.2, en un ángulo de 45° sobre el pocillo. Los resultados se observarán tras 1 minuto de haber agregado la alícuota. Si la gota de alícuota se mantuvo intacta, entonces se considera negativo. Si la forma de la gota se dispersó en el pocillo, se considera positivo (Bodour y Miller-Maier, 1998).

Las cepas se clasificaron de acuerdo a la capacidad de dispersión de la gota sobre la capa de aceite de la siguiente manera: (-) sin dispersión de la gota; (+) dispersión pequeña de la gota; (++) gota medianamente dispersa; (+++) amplia dispersión de la gota (Al-Mulla., 2010).

3.9 Dispersión de aceite (OSM)

El método de dispersión de aceite, (OSM en inglés), se llevó a cabo utilizando la metodología de Morikawa y col. (2000), la cual fue modificada de acuerdo a los objetivos del trabajo.

Para determinar las cepas capaces de producir biosurfactantes, 5 ml de agua destilada se agregaron a una Placa de Petri pequeña (3,5 cm). Luego se colocaron 40 μ l de aceite de motor (para vehículos) usado sobre la superficie del agua, formando una capa homogénea sobre la misma. Inmediatamente se agregaron 40 μ l del sobrenadante de la sección 2.2, al centro de la capa de crudo. Se consideró una respuesta positiva la dispersión de aceite en agua, al observarse una zona clara sobre la capa de aceite, con forma de halo y que se mantenga durante un minuto.

Las cepas se clasificaron de acuerdo al tamaño del halo formado sobre la capa de aceite de la siguiente manera: (-) sin dispersión del aceite; (+) dispersión de aceite con un halo entre 0,5 cm y 0,9 cm; (++) dispersión de aceite con un halo entre 1 cm y 1,5 cm; (+++) dispersión de aceite con un halo entre 1,5 cm < X < 2,1 cm; (+++++) dispersión de aceite con halo entre 2,1 < X < 3 cm (Youssef y col., 2004).

3.10 Medición de la tensión superficial

Se determinó la tensión superficial (SFT) de las muestras por medio del método de la forma asimétrica de una gota colgante (Van der Vegt y col, 1999), utilizando el Tensiómetro de gota del laboratorio de Espectroscopia Láser de la escuela de química de la UCV.

Previo a la medición de la SFT, se tomó 1 ml de todas las muestras, el cual fue centrifugado nuevamente en una microcentrifuga por 5', con el fin de eliminar cualquier que altere los resultados. Una vez cumplido este paso se recuperó el sobrenadante y se almacenó en viales previamente esterilizados y se procedió con la medición. Para ello, se tomaron 100 µl de sobrenadante y se dejó caer en forma de gotas frente a una cámara. Al momento de caer la gota, se tomaba una fotografía de este y con ayuda de un programa computarizado se determinaba la tensión que presentaba la gota al momento de caer, la cual, dependiendo de la tensión superficial varía (Van der Vegt y col., 1991; Asahiro y Demarquette 1999).

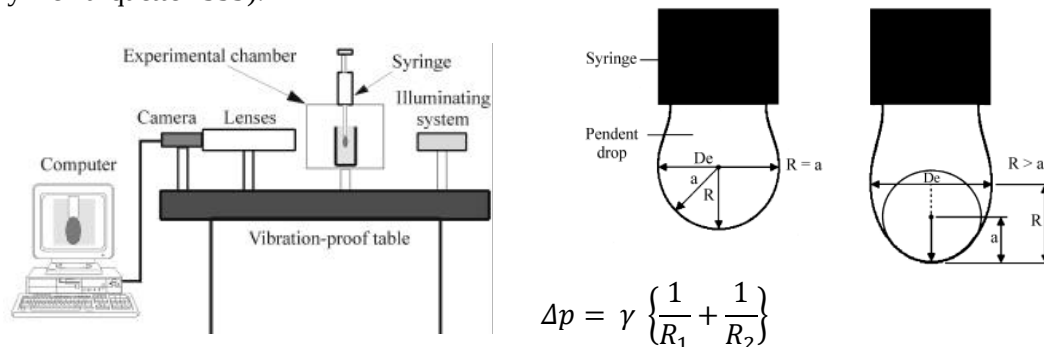


Figura 7. (A) Representación esquemática del equipo utilizado para la medición de la tensión superficial a partir de la forma de la gota de una solución. (B) Evaluación del radio de curvatura del apéndice de la gota con la formula de Laplace y como se registran los cambios en la tensión superficial. Cuanto la tensión superficial disminuye, el radio R_1 (en este caso a) disminuye en relación al radio R_2 (en este caso R). Estos cambios afectan directamente los resultados en la ecuación Laplace y se registran como un descenso dentro de los valores iniciales de la tensión interfacial. (Imagen modificada a partir de la publicada en Arashiro y Demarquette 1999)

Las cepas se clasificaron de acuerdo al nivel de la SFT de la siguiente manera: (-) no hay actividad surfactante; (+) tensión superficial entre 51-70 mN/m; (++) tensión superficial entre 41-50 mN/m; (+++) tensión superficial ≤ 40 mN/m (Thavasi y col., 2011).

4. Selección de cepas productoras de Biosurfactantes y Bioemulsificantes

Se seleccionaron aquellas cepas que presentasen como mínimo una categoría de respuesta nivel 2 en la mayoría de las pruebas y cuyo rango de respuesta en la medición de la tensión superficial estuviera entre (++) para los bioemulsificantes y (+++) para los biosurfactantes, al menos en dos de las fuentes de carbono utilizadas.

5. Extracción del Biosurfactante.

Para la extracción del biosurfactante, se utilizó el método de cloroformo:metanol (2:1) (Qiao y Shao 2010; Chakraborty y col., 2014). Las cepas seleccionadas y crecidas en glucosa, para evitar alguna reacción de los solventes con las otras fuentes de carbono, y se volvieron a centrifugar para garantizar una mayor pureza del compuesto (Qiao y Shao 2010). Posteriormente se tomó una alícuota de 10 ml de sobrenadante y se le agregó ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 96% hasta ajustar el pH a 2. Seguidamente se agregó en igual volumen la mezcla cloroformo:metanol (2:1) y se agitó vigorosamente por unos minutos hasta lograr una mezcla total de los componentes. La aparición de un precipitado blanco será el indicador de la presencia del biosurfactante (Chakraborty y col., 2014). Luego se dejaron las muestras evaporar durante la noche en la estufa a 45 °C (Qiao y Shao 2010).

6. Caracterización del biosurfactante

6.1 Identificación de los géneros bacterianos

Las cepas seleccionadas fueron caracterizadas a través del comportamiento microbiológico y los resultados de pruebas bioquímicas, como lo son: Tinción Gram, Fermentación de Carbohidratos (Glucosa, Lactosa, Sacarosa, Fructosa, Maltosa, Manitol, Inositol y Xylosa), Producción de H_2S , Prueba de Indol, Rojo Metilo, Uso de citrato, Prueba de Urea, Prueba de Catalasa, Prueba de Oxidasa,

Hidrólisis del Almidón, Licuefacción de Gelatina, Reducción de Nitratos, Hidrolisis de Esculina, Pruebas de descarboxilasa (Lisina, Arginina y Ornitina), y/o el uso de medios específicos, como el Agar Cetrimide (Viramontes-Ramos y col., 2010; Ali y col., 2013).

Los resultados de las pruebas bioquímicas fueron usados para hallar la mayor similitud entre los géneros bacterianos de acuerdo al Manual de Bergey (Ali y col., 2013).

6.2 Medición de la actividad antibacteriana

Para la medición de la actividad antibacteriana se utilizará el método de difusión por discos, también conocido como método de Kirby-Bauer, en el cual, placas de Agar Mueller Hinton, se sembrarán para formar un césped de distintos géneros bacterianos (Lotfabad y col, 2013).

Las bacterias patógenas seleccionadas para este trabajo fueron: *Pseudomona aeruginosa*; *Staphylococcus epidermis*; *Staphylococcus aureus*; *Bacillus subtilis*; *Escherichia coli*; *Salmonella enteridis*; *Klebsiella* sp.; *Proteus vulgaris*; *Enterobater aerogenes* y *Enterococcus* sp (Al-Mulla, 2010; Lotfabad y col, 2013; Ramachandran y col., 2014), las cuales son provenientes del cepario de referencia del Laboratorio de Ecología Microbiana del Centro de Ecología Aplicada del IZET.

Dichas bacterias fueron incubadas en 3 ml de caldo cerebro-corazón a 37 °C por 24h, para garantizar su rápido y optimo crecimiento. Posteriormente se sembraron en las placas de Agar Mueller-Hinton 0,2 ml de la cepa y se sembró por rastrilleo (Saimmai y col., 2012b). Una vez dispersado uniformemente el inóculo, se agregaron 50 µl de sobrenadante a discos de 1 cm (previamente esterilizados a 121°C por 5 minutos), que luego fueron colocados directamente sobre el medio. Las placas se incubaron por 16-18 horas a 37 °C (Lotfabad y col, 2013).

La formación de un halo alrededor de los discos y que en este no se pueda observar crecimiento bacteriano será indicador de que el biosurfactante presenta características antibacterianas. Como control positivo, se utilizaron discos de antibióticos comerciales (Lotfabad y col, 2013).

6.3 Medición de la actividad antimicótica

La determinación de la actividad antimicótica que pueden presentar los biosurfactantes, se realizó en base al método de la concentración mínima para la inhibición (MIC), la cual fue modificada para ajustarse a los objetivos del trabajo.

Las cepas fúngicas utilizadas en este trabajo fueron: *Candida sp*; *Cryptococcus sp*; *Geotricum sp*; *Aspergillus niger*, *Fusarium sp.*; *Penicillium sp* (Al-Mulla, 2010; Olteanu y col., 2011; Lotfabad y col, 2013; Ramachandran y col., 2014). Estas cepas son provenientes del cepario de referencia del Laboratorio de Ecología Microbiana del Centro de Ecología Aplicada del IZET.

Este método consiste en la siembra de las cepas de distintos géneros fúngicos, en placas de Agar Papa Dextrosa (PDA), al mismo tiempo, en las mismas placas se colocó una gota de sobrenadante (10-15 µl) directamente sobre el agar, a 2,5 cm del sitio de siembra de la cepa fúngica (Olteanu y col., 2011). Dichas placas se incubarán a 25°C (temperatura ambiente) durante 10 días, con revisión a los 3, 5, 7 y 10 días. La actividad antimicótica consiste en la disminución visual del crecimiento del hongo a lo largo de su desarrollo en la placa (Olteanu y col., 2011; Lotfabad y col, 2013).

6.4 Determinación de la carga iónica del Biosurfactante/Bioemulsificante

La carga iónica fue determinada utilizando el método de la doble difusión con agar (ADD), el cual consiste en utilizar una placa de agar agar con un 1% de dureza, y en el mismo se abrieron dos pocillos (Saranya y col., 2015), utilizando la boca de un tubo de ensayo de diámetro, se procedió a calentar la misma y a perforar el agar. Posteriormente se retiró la sección perforada con ayuda de unas pinzas estériles (Arashiro y Demarquette 1999).

En uno de los pocillos se agregaron 100 µl del biosurfactante/bioemulsificante, mientras que en el otro se agregaron 100 µl de surfactantes de carga iónica conocida, los cuales fueron el SDS (0,5g/l) y el CTAB (0,5 g/l) (Saranya y col., 2015). La carga iónica se determinó al observar un precipitado

entre el pocillo de la muestra y el surfactante sembrado, lo cual se debe a la naturaleza ionica del biosurfactante en presencia de su ion contrario (Saranya y col., 2015).

7. Efecto del tiempo en la producción de biosurfactantes

Para el estudio del efecto del tiempo sobre la producción se tomaron las cepas seleccionadas anteriormente y fueron incubadas por un periodo de 3 dias bajos las mismas condiciones e idénticas fuentes de carbono y se hicieron las mismas observaciones utilizadas en los 7 días (a los parámetros de producción de espuma; crecimiento y biopelícula).

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la extracción del biosurfactante siguiendo la metodología planteada en la sección (2.2). Conservando tanto el sobrenadante como el material biológico. Luego se procedió a realizar todas las pruebas: OSM; DC; BATH; E%, Parafilm y SFT.

8. Análisis estadístico

Mediante la aplicación de un ANOVA de una vía se estudio el efecto de las fuentes de carbono sobre la producción de los biosurfactatnes, y un ANOVA factorial para el efecto del tiempo sobre la producción de biosurfactantes. Para estudiar la relación entre las pruebas utilizadas se realizará un análisis de correlación linear con un nivel de significancia ($p < 0,05$), y el índice de Pearson y Spearman. Se utilizaron los paquetes estadísticos: STATISCAL 3.02, MVSP y Excel para el desarrollo y graficación de dichos análisis.

VI. Resultados y Discusion

A continuación se presentan los resultados de los ensayos realizados para la selección e identificación de las cepas productoras de biosurfactantes.

1. Producción de Biosurfactante

En la Tabla 6, se muestran los resultados de las observaciones realizadas durante el periodo de incubación de siete días de las 23 cepas.

Tabla 6. Observaciones realizadas durante la incubación a lo largo de los 7 días

Observaciones	Fuente de Carbono							
	Glucosa		Acetato de Sodio		Gasoil		Aceite de Oliva	
	Nivel de respuesta	Número de cepas	Nivel de respuesta	Número de cepas	Nivel de respuesta	Número de cepas	Nivel de respuesta	Número de cepas
Crecimiento	+	0	+	5 (22%)	+	18 (78%)	+	4 (17%)
	++	16 (70%)	++	13 (56%)	++	5 (22%)	++	8 (35%)
	+++	7 (30%)	+++	5 (22%)	+++	0 (%)	+++	11 (48%)
Espuma	+	0	+	0	+	13 (56%)	+	0
	++	1 (4%)	++	0	++	0	++	1 (4%)
	+++	0	+++	0	+++	0	+++	1 (4%)
Biopelícula	4 cepas (17%)		3 cepas (13%)		2 cepas (9%)		2 cepas (9%)	

De acuerdo a los resultados expresados en la tabla 6, los 23 aislados seleccionados se observó cierto nivel de crecimiento en las 4 fuentes de carbono. 15 cepas (65%) mostraron la capacidad de generar algún tipo de emulsión, al menos en una de las fuentes de carbono, y 6 cepas (26%) presentaron formación de biopelícula en alguna de las cuatro fuentes de carbono. Se decidió estudiar la presencia de la biopelícula ya que varios de los microorganismos productores de biosurfactantes a menudo forman una densa biopelícula en la interface agua aceite y consumen el hidrocarburo emulsificado (Krepsky y col., 2007)

Al estudiar la turbidez observada en las cuatro fuentes de carbono, podemos decir que los resultados más altos, se dieron en los medios con glucosa y aceite de oliva. Las cepas crecidas en glucosa mostraron un medio turbio y de aspecto espumoso, mientras que las crecidas en aceite de

oliva mostraroun un aspecto lechoso alrededor a las gotas del aceite. Esto concuerda con lo reportado con Viramontes y col., (2010).

Por otra parte, al estudiar la capacidad de emulsionar, llama la atención que de las 15 cepas, hubo 13 que fueron capaces de producir emulsiones de nivel “+” en presencia de gasoil, de las cuales únicamente 2 fueron capaces de producir emulsiones también en oliva, pero de nivel “++”, y en presencia de glucosa, solamente 1 cepa fue capaz de producir emulsiones de nivel “+++”. Finalmente, una sola cepa produjo un nivel de emulsión de nivel “+++”, utilizando como fuente de carbono el aceite de oliva. Dicha cepa también fue la única en producir algún tipo de emulsión en glucosa.

2. Determinación de las cepas productoras de biosurfactantes

En la tabla 7 se presentan los resultados de los métodos dedeteccion de biosurfactantes de acuerdo al comportamiento específico para la selección de las cepas productoras de biosurfacantes

Tabla 7. Métodos de detección por actividad específica

Nivel de respuesta	Actividad Hemolítica	Agar Azul		Producción de Lipasa
		CTAB	SDS	
-	4 (17%)	18 (78%)	18 (78%)	13 (57%)
+	5 (22%)	4 (17%)	1 (4%)	1 (4%)
++	13 (57%)	0	0	7 (30%)
+++	1 (4%)	1 (4%)	4 (17%)	2 (9%)

Los resultados obtenidos de las pruebas de actividad específica de biosurfactantes se muestran en la tabla 7: de las 23 cepas bacterianas, un 83% presentó al menos un nivel de respuesta positiva en actividad hemolítica, mientras que el 17%, mostró respuesta negativa, y según estos resultados, podríamos suponer que este 83% de las cepas presenta el potencial de producción de biosurfactantes, ya que su presencia propicia la ruptura de la moléculas hemolíticas, dando como resultado la formación del halo transparente alrededor de la bacteria y, en tal sentido (Carrillo y col., 1996; Youssef y col., 2004; Plaza y col., 2006; Thavasi y col., 2008) plantea que, a mayor diámetro del halo, mayor será la concentración del biosurfactante producido. Contrario a este planteamiento, Youssef y col. (2004), seguido de muchos otros investigadores, determinaron que el tamaño del halo

es irrelevante en la cantidad de biosurfactante producido, y no existe una correlación directa de esta prueba con la producción de biosurfactantes, resultando poco fiable para detectar biosurfactantes por la complejidad del medio (Mulligan y col., 1984; Makkar y Cameotra, 1997; Youssef y col., 2004; Satpute y col., 2004, 2010). Sin embargo, actualmente dicha prueba sigue siendo uno de los principales criterios para la selección preliminar de cepas con potencial de producción de biosurfactantes (Mulligan y col., 1984; Makkar y Cameotra, 1997; Kosaric, 2000; Thavasi y col., 2008; Satpute y col., 2008, 2010).

Con respecto a los resultados obtenidos en las placas de agar azul, la respuesta fue totalmente opuesta a la encontrada en la actividad hemolítica: de las 23 cepas ensayadas, un 78%, presentó respuesta negativa, mientras que de las 5 restantes, el 22% mostró al menos un nivel de respuesta positiva. Se destaca en la tabla 7, que los valores se invierten al utilizar distintos surfactantes, porque las mismas 5 cepas presentaron una respuesta positiva tanto en CTAB como en SDS. En presencia de CTAB, solo 1 formó un halo uniforme con nivel de respuesta ‘+++’, mientras las otras 4 cepas mostraron un halo difuso en el medio, correspondiendo a una respuesta de nivel ‘+’. Sin embargo, utilizando el surfactante SDS, con carga opuesta al CTAB, las 4 cepas anteriores mostraron un nivel de respuesta ‘+++’, mientras que, la cepa con mayor nivel de respuesta en CTAB presentó el menor nivel de respuesta con SDS.

Considerando que la prueba de agar azul tiene la función de detectar biosurfactantes según su naturaleza iónica (Saranya y col., 2015), si la cepa bacteriana tiene la capacidad de producir biosurfactantes con carga iónica, y se encuentran en presencia de un surfactante con carga opuesta, ya sea negativamente como el SDS, o positivamente como el CTAB, las bacterias con potencial generarán un biosurfactante con un ion insoluble que precipitará y será catiónico en el medio con SDS, o aniónico en el medio con CTAB.

Entonces, la respuesta positiva se visualizará alrededor del punto de siembra con formación de un halo azul, que será más definido y de mayor diámetro a una concentración mayor del

biosurfactante, (Pinzon y Ju, 2009). Algo que no se menciona en la bibliografía consultada, es la posible respuesta del biosurfactante en presencia de un surfactante con la misma carga iónica. En el presente trabajo encontramos ese tipo de respuesta, lo cual nos lleva a plantear que en presencia de un surfactante con la misma carga iónica, las condiciones del medio son las indicadas para que las bacterias puedan producir el biosurfactante en cuestión, y que como consecuencia de ello, se observe un halo difuso alrededor de la cepa, que se deberá considerar como una respuesta al menos de nivel '+'. Es importante destacar que esta prueba, a pesar de su potencial, está limitada solo a los biosurfactantes iónicos (Siegmund I y Wagner F, 1991; Satpute y col., 2010).

Los resultados del estudio de producción de lipasa reportados en la tabla 7 muestran que el 57% de las cepas seleccionadas presentaron una respuesta negativa, mientras que el 43% presentó algún tipo de respuesta positiva. Este 43%, que equivale a 10 de las cepas estudiadas, son capaces de hidrolizar compuestos grasos, tales como el Tween 80, mediante la producción de lipasas, siendo este un potencial indicador de la producción de biosurfactantes. La síntesis de lipasa ocurre posiblemente debido a la necesidad de los microorganismos de metabolizar compuestos insolubles en agua, proceso que también ocurre en la producción de biosurfactantes (Colla y col., 2010). Además, sabemos que los biosurfactantes pueden ser producidos por síntesis orgánica mediante el uso de lipasas, haciendo a estas, potenciales indicadores de las cepas productoras de biosurfactantes. Sin embargo, debido a que no existe una clara correlación entre la producción de lipasas y la producción de biosurfactantes, no puede considerarse como una prueba definitiva (Colla y col., 2010).

En las figuras 8, 9, 10 y 11 se presentan los resultados de los métodos cualitativos/cuantitativos utilizados para la selección de las cepas productoras de biosurfactantes.

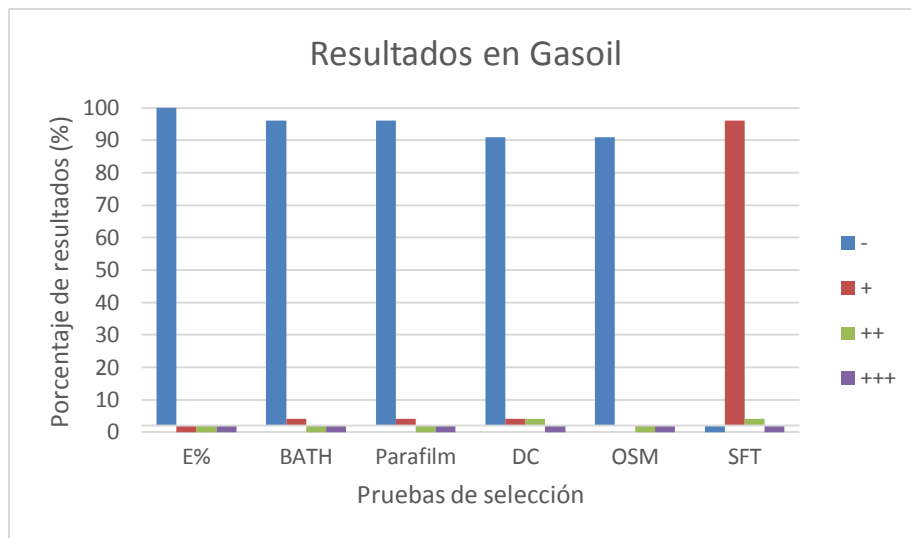


Figura 8. Comportamiento de las cepas en las pruebas de detección utilizando como fuente de carbono Gasoil a los 7 días.

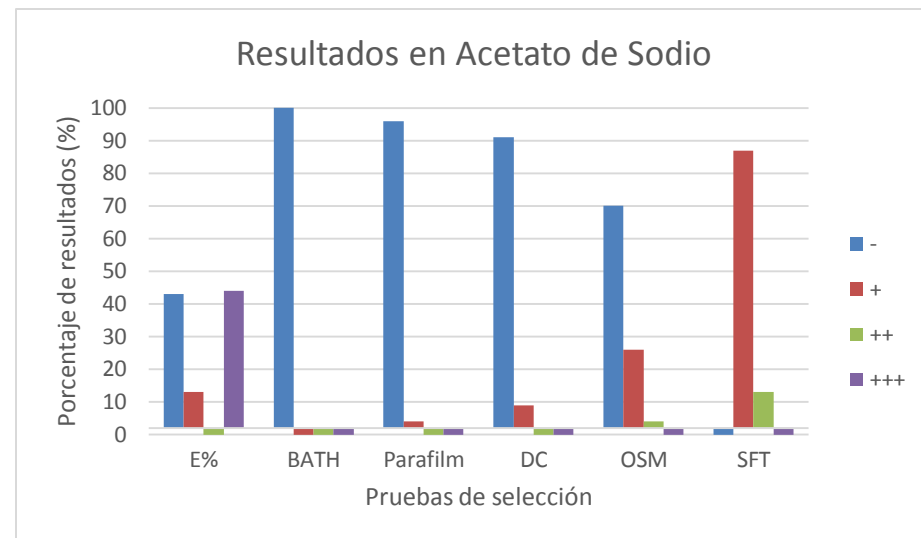


Figura 9. Comportamiento de las cepas en las pruebas de detección utilizando como fuente de carbono Acetato de Sodio a los 7 días.

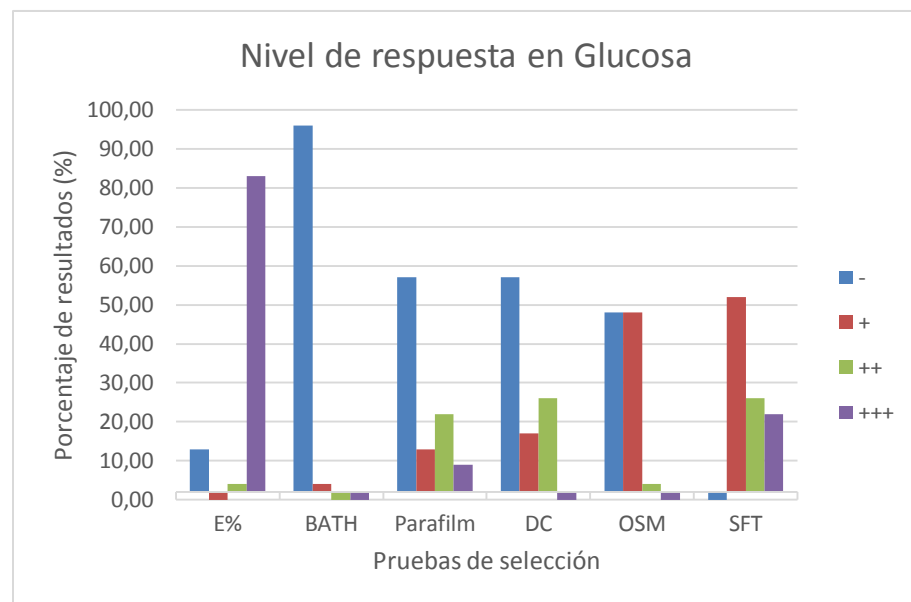


Figura 10. Comportamiento de las cepas en las pruebas de detección utilizando como fuente de carbono Glucosa a los 7 días.

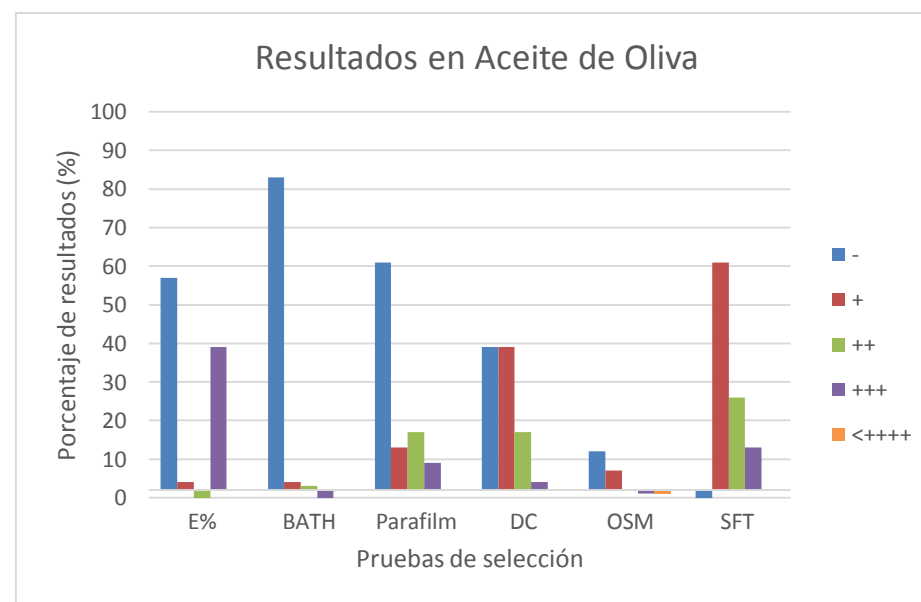


Figura 11. Comportamiento de las cepas en las pruebas de detección utilizando como fuente de carbono Aceite de Oliva a los 7 días.

En la figura 8 se destaca el hecho de que los métodos cualitativos (E%; BATH; Parafilm; DC y OSM), se encontró que el 90% de los ensayos realizados presentó una respuesta negativa ‘-’ en todas las pruebas, mientras que en el método cuantitativo, (SFT), no se encontraron cambios significativos en la tensión superficial, mostrando que bajo estas condiciones de producción el gasoil no parece ser una fuente eficiente en la producción de biosurfactantes o bioemulsificantes, pues no se observó un porcentaje de la población que presentase algún comportamiento similar al de agentes tensoactivos o emulsificantes.

El acetato de sodio mostró resultados similares a los de gasoil (Figura 9), con la excepción de las pruebas: de E%, donde el 43% de las cepas tuvo respuesta negativa ‘-’ y un 44% con el nivel de respuesta ‘+++’. La prueba OSM tuvo un 70% de respuesta negativa, el 30% restante presentó al menos un nivel de respuesta positivo. Por otro lado, los resultados de la tensión superficial indican que, más del 80% mostró un nivel de respuesta ‘+’ y 13% mostraron un nivel de respuesta ‘++’ (Anexo IV). Estos resultados son indicadores de la presencia de moléculas surfactantes, que presentarán mejores facultades como agentes emulsificantes, que como agentes reductores de la tensión superficial indicando que el acetato es idóneo para la producción de bioemulsificantes. Resultados similares fueron reportados por Ron y Rosenberg, (1985).

En cuanto a la glucosa (Figura 10) como fuente de carbono, se observó una gran variabilidad en las respuestas en todas las pruebas. En la prueba de E%, podemos ver que en presencia de esta fuente de carbono de las veintitrés cepas, solamente tres mostraron una respuesta negativa ‘-’, mientras que diecinueve arrojaron respuestas de nivel más alto ‘+++’, destacando lo idóneo de esta fuente de carbono para la producción de agentes con capacidad emulsificante.

Caso contrario es lo que ocurre con la prueba de BATH, en la cual solo una cepa fue capaz de mostrar algo de adherencia al hidrocarburo (Anexo IV). Esto contradice lo reportado por Neu y Poralla, (1990) y Putri y Cameotra (1997), quienes en experimentos similares al de este trabajo, con la excepción del tiempo de incubación que fue mucho más corto, encontraron altos niveles de

hidrofobicidad bajo la misma fuente de carbono. Adicionalmente, por las observaciones hechas por Ron y Rosenberg (1985), indican que la fase de crecimiento bacteriano afecta los resultados que se puedan obtener en esta prueba, es posible pensar que el factor del tiempo juega un papel en los resultados obtenidos en esta prueba.

En las pruebas de OSM, Parafilm y DC, se obtuvieron resultados bastante similares, con una variaciones poco significativa en los porcentajes reportados, como se puede ver en la figura 10. La prueba OSM estudia los cambios de la tensión superficial al estudiar la presencia de agentes dispersantes, mientras que las pruebas de Parafilm y DC estudian los cambios de la tensión interfacial mediante el comportamiento de una gota sobre una superficie hidrofóbica. Los datos más similares los encontramos entre OSM y DC, casi el 50% de los ensayos realizados mostraron una respuesta negativa ‘-’, y cerca de un 45% mostró una respuestas entre los niveles ‘+’ y ‘++’. Youssef y col., (2004) demostraron que existe una alta correlación entre estas dos pruebas, siendo la OSM la más sensible de las dos, e indica la presencia de cepas medianamente productoras de biosurfactante en presencia de glucosa. En Parafilm se encontró una tendencia similar a DC, con la excepción se que existe un mayor porcentaje en los resultados de nivel ‘+++’ (Anexo IV). Finalmente los resultados de la tensión superficial, indican que un 48% de las cepas estudiadas muestra la capacidad de reducir significativamente la tensión superficial con niveles de respuesta entre ‘++’ y ‘+++’ (Anexo IV). Por estos resultados se puede decir que la glucosa parece ser una fuente idónea para la producción tanto de biosurfactantes como de bioemulsificantes. Esto es respaldado por muchos investigadores (Bonilla y col., 2004; Morita y col., 2007; Vaslleva-Tonkova y Gesheva 2007; Nasrin y col., 2007; Chakraborty y col., 2014; Zhou y col., 2015)

Los resultados obtenidos de las pruebas con aceite de oliva (Figura 11) como fuente de carbono, vemos que los valores en E%, encontramos que el comportamiento es totalmente contrario al observado en glucosa, ya que el 57% de los ensayos realizados mostró una respuesta negativa ‘-’, solo un 39% de respuesta positiva alta ‘+++’, totalmente opuesto al 93% encontrado en los ensayos

con glucosa. Estos resultados son similares a los reportados por Bonilla y col., (2004); Morita y col., (2007); Gandhimathi y col., (2009) y Zhou y col., (2015), quienes indican que la glucosa presenta mejores niveles en el índice de emulsificación con respecto al aceite de oliva.

Estos resultados pueden estar relacionados con el hecho que el aceite de oliva es una fuente hidrofóbica, y para poder acceder a los nutrientes, las bacterias tienen que adherirse a las gotas de aceite que están en suspensión en el medio, y para ello requieren que el biosurfactante este aún unido a la membrana de la bacteria. Entonces es posible que la concentración del emulsificante sea relativamente baja en el medio de cultivo y por esta razón, la actividad emulsificante es menor que la registrada en glucosa.

En la figura 11, vemos que las últimas tres pruebas cualitativas restantes presentaron un comportamiento similar al encontrado en glucosa. Sin embargo, a diferencia de glucosa, vemos que los valores más altos registrados en la prueba de OSM, están en las muestras con aceite de oliva, donde encontramos la única cepa de generar una respuesta positiva de nivel alto ‘+++’, e incluso con una cepa que fue capaz de generar un diámetro de halo por encima de los valores estandarizados ‘>++++’. Esto puede ser indicador de que en presencia de aceite de oliva hay una mayor producción de biosurfactante. Según Youssef y col., (2004) el diámetro del halo en la dispersión del aceite está directamente correlacionado con la concentración de biosurfactante, y los resultados de este trabajo concuerdan con lo reportado por Hajfarajollah y col., (2014), quienes observaron que al cambiar la fuente de carbono de glucosa a aceites vegetales, obtuvieron a una mayor producción de biosurfactante.

De acuerdo a estos resultados, se propone que, el uso de aceites vegetales como fuente de carbono en lugar de glucosa induce a las células a un cambio en la ruta metabólica, y por ende, la cantidad de biosurfactante producido incrementa. Otra razón puede ser que en presencia de un aceite, la bacterias son inducidas a producir más biosurfactante, para así poder utilizar fuentes de carbono insolubles como sustratos (Makkar, Cameotra y Banat; 2011; Hajfarajollah y col., 2014).

En relación a las pruebas de Parafilm y DC, los resultados de la figura 10 y 11 son muy similares, diferenciándose en el hecho de que en Parafilm, la figura 10 muestra un porcentaje ligeramente mayor de cepas con resultado ‘++’ al reportado en la figura 11, mientras que en la prueba de DC se observa un mayor porcentaje de cepas con respuesta de nivel ‘+ y ‘+++’ en presencia de aceite de oliva que en glucosa (Anexo IV).

Finalmente, en relación a los valores de SFT en la figura 11, vemos que nuevamente tienen un comportamiento similar al observado en la figura 10 con la excepción de los valores registrados en los niveles altos de respuesta. Mientras que los porcentajes obtenidos en los niveles de respuesta ‘++’ fueron iguales para ambas fuentes de carbono (26% c/u), observamos que el número de cepas que mostraron una respuesta de nivel ‘+++’ fue ligeramente mayor que en el caso del aceite de oliva (22% y 13% respectivamente).

Ahora bien, sabiendo por los resultados obtenidos hasta ahora, vemos que el aceite de oliva mejora la producción de biosurfactante, ¿porque tenemos un menor número de resultados con altos niveles de respuesta? Una posible explicación puede ser que estamos en presencia de una población bacteriana con la capacidad de producir tanto biosurfactantes como bioemulsificantes. Esto se puede corroborar con los resultados obtenidos en los índices de emulsificación en presencia de glucosa, y según la bibliografía, sabemos que la glucosa es una fuente idónea para la formación de agentes emulsificantes.

Cooper y Goldenberg, (1987); Saptute y col., (2010); Bozo-Hurtado y col., (2012) y Sapt Al-Bahry y col., (2013) reportan que se consideran cepas productoras de biosurfactantes aquellas capaces de disminuir los valores de tensión superficial a valores $40 \text{ mN/m} \geq X$. Mientras que aquellos resultados que correspondan a valores alrededor de 40 mN/m , son considerados como bioemulsificantes (Rosenberg y col., 1979; Cooper y col., 1987; Al-Mallah y col., 1990; Bodour y Maier, 2002; Plaza y col., 2006).

Esto, junto a los resultados reportados hasta ahora, indica que estamos ante un grupo de cepas bacterianas que tienen una mayor tendencia a producir bioemulsificante que biosurfactantes. Adicionalmente, los resultados de los métodos de medición indirecta de la tensión interfacial (DC y Parafilm) presentaron un mayor porcentaje de cepas con niveles de respuestas entre ‘++’ y ‘+++’ en comparación a los resultados de OSM, indicando una mayor actividad a nivel interfacial, propiedad característica también de los bioemulsificantes, sobre todo de aquellos pertenecientes a la familia de fosfolípidos (Mnif y Ghribi, 2015b).

El análisis de varianza (ANOVA de una vía, $F=13,074$ $df=180$; $p<0,05$, $p=9,183E-08$), señala que utilizando distintas fuentes de carbono, al menos una de las medias de la tensión superficial es distintas de las otras tres fuentes de carbono. En la figura 12, se presentan los resultados del análisis a posteriori, donde encontramos que las medias bajo la glucosa y el aceite de oliva son iguales ($0,05<a$, $a=0,255336$). Esto indica que ambas fuentes de carbono presentan la misma capacidad de generar la disminución en la tensión superficial, independientemente de las cepas utilizadas.

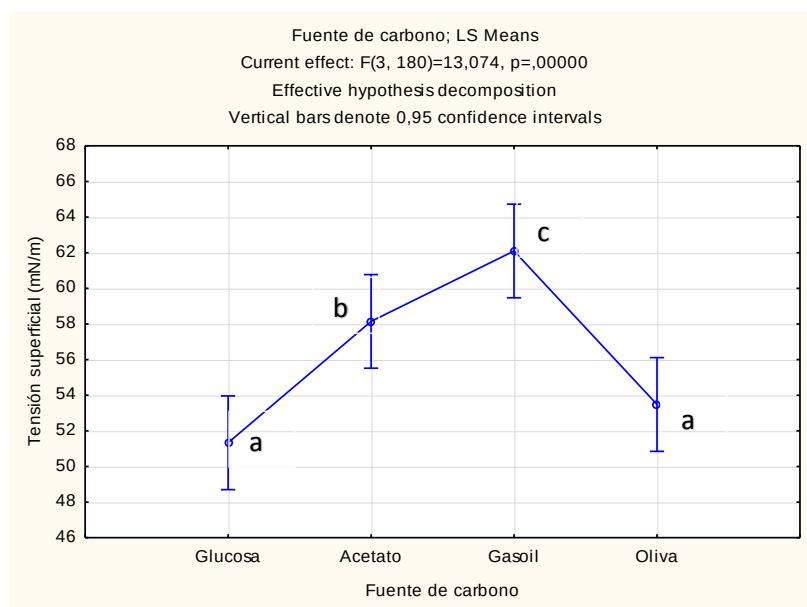


Figura 12. Comparación de las medias generadas de la tensión superficial por las distintas fuentes de carbono. Las letras indican el valor de significancia entre las fuentes de carbono.

Cómo pudimos ver con con los del método cuantitativo confirmamos que en efecto distintas fuentes de carbono ejercen distintos efectos sobre la producción de biosurfactantes y bioemulsificantes. Con el análisis de ANOVA, adicionalmente se encontró que la glucosa y el aceite de oliva presentan la misma capacidad de producción de agentes tensoactivos.

Sin embargo, en base a la información encontrada en los métodos cualitativos, es posible diferenciar ambas fuentes de carbono. En el caso de la glucosa, esta mostró importantes cambios en la tensión superficial, mientras que el aceite de oliva fue más propenso a alargar el tiempo de producción de biosurfactantes/bioemulsificantes. Esto puede deberse a que el aceite de oliva está compuesto por fracciones carbono lipídicas constituidas por grasas saturadas e insaturadas con cadenas carbonatadas de 16-18 átomos de carbono, y tomando en cuenta que la concentración de nitrógeno y de lípidos quienes están entre los factores que afectan la producción y limitan la capacidad de producción de biosurfactante, hasta que la degradación total de lípidos y la fuente de nitrógeno dentro del aceite de oliva no se agote, el biosurfactante/bioemulsificante seguirá produciéndose.

Por otro lado, en presencia de fuentes de carbono solubles, como la glucosa, los biosurfactantes tienen una mejor actividad tensoactiva, y esto se debe a que a diferencia de los sustratos hidrofóbico, estas fuentes de carbono solubles pueden ser accedidas de forma instantánea, por lo cual las células bacterianas producen el biosurfactante y lo liberan inmediatamente al medio extracelular. Mientras que en presencia de fuentes de carbono insolubles, los biosurfactantes se acumulan en la membrana bacteriana hasta cierto grado de saturación y luego son liberados al medio extracelular.

Es por ello, que en presencia de fuentes de carbono solubles los biosurfactante tienen mejor condición tensoactiva. De hecho algunos investigadores plantean que de acuerdo al tiempo de producción, los biosurfactantes elaborados a partir de fuentes de carbono simples, como la glucosa, el glicerol, y la fructosa, se comportan como metabolitos primarios, mientras que en presencia de

compuestos orgánicos de alta complejidad como aceites vegetales y el crudo, entre otros, se comportan como metabolitos secundarios (Chakraborty, y col., 2014).

Mientras que la glucosa y el aceite de oliva fueron los sustratos más idóneos para la producción de biosurfactantes/bioemulsificantes, encontramos que el gasoil y el acetato de sodio no presentaron indicios de producción de biosurfactantes. En presencia de acetato de sodio, las cepas seleccionadas mostraron un comportamiento similar al observado por bioemulsificantes, como lo reportado por Rosenber y col., (1985), quienes también indican que esta fuente de carbono no es la más idónea para estudios de producción de biosurfactantes. Por otro lado, los resultados con gasoil, a pesar de ser una de las fuentes reportadas como potencial sustituto de las fuentes más utilizadas, no mostró indicios de producción de biosurfactantes, o bien no fueron registrados en el tiempo de inoculación utilizado. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de la presencia de bioemulsificantes por el hecho que no es solo una fuente hidrofóbica sino también es un hidrocarburo. Posiblemente la baja producción registrada se deba a que como hidrocarburo de cadena corta, el biosurfactante producido fue consumido inmediatamente, debido a la baja energía que proporciona esta fuente de carbono a las bacterias. Resultados similares fueron reportados por otros autores (Rosenberg y col., 1979; Plaza y col., 2005; Suresh, Mody y Jha., 2007; Nasrin y col., 2007)

3. Selección y Extracción de cepas productoras de BS/BE

Tras realizar las pruebas de selección se determinó que de las 23 cepas con potencial de producción 14 mostraron la capacidad de producir biosurfactante/bioemulsificantes. Con estos resultados, se decidió realizar el proceso de extracción. Para ello se tomaron las muestras correspondientes a glucosa, no solo por tener el mayor número de resultados positivos entre los niveles ‘++’ y ‘+++’ (Anexo IV), sino también para evitar la interferencia por la presencia de microgotas de aceite de oliva presentes en las muestras, de acuerdo a Morita y col., (2007).

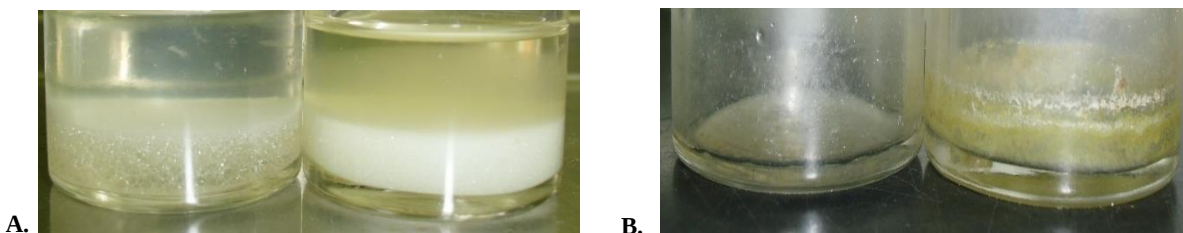


Figura 13. (A) Observaciones de la extracción del biosurfactantes, tras agregar los solventes. Cepa MN3-1 a la izquierda y cepa MN3-4 a la derecha. (B) Observaciones de la extracción del biosurfactantes, tras el tiempo de incubación, una vez evaporados los solventes. Cepa MN3-1 a la izquierda y cepa MN3-4 a la derecha

De las 14 muestras seleccionadas para la extracción, solo 5 fueron capaces de formar el precipitado blanco esperado por este método de extracción (Vasileva-Tonkova y Gesheva, 2007; Thavasi y col., 2008; Anandaraj y Thivakaran, 2010; Qiao y Shao 2010; Saimmai y col., 2012a,b; Xia y col., 2012; Pradhan y col., 2013; Shaikh y col., 2013; Chakraborty y col., 2014; Saminathan y col., 2014; Velioglu y Urek, 2014; Pathaka y Nakhate, 2015; Sharma y col., 2015). Esto puede deberse a que la mayoría de las muestras contiene bioemulsificantes, y si bien este método de extracción ha sido ampliamente reportado para la extracción de biosurfactantes y bioemulsificantes, se sabe que está más orientado a la extracción de biosurfactantes, más específicamente de glucolípidos (Anandaraj y Thivakaran, 2010; Qiao y Shao 2010; Shaikh y col., 2013; Saminathan y col., 2014).

Posteriormente, luego de la formación del precipitado blanco, se colocaron todas las muestras en la estufa a 45 °C, con el fin de evaporar el solvente y recuperar el biosurfactante. Sin embargo, transcurrido el tiempo indicado, encontramos en las muestras muy poca material para continuar con los análisis de identificación química (Figura 13B). Eso puede deberse a que al no haber una alta concentración de biosurfactante/bioemulsificantes no se pudo extraer suficiente material para poder realizar la caracterización química. La baja concentración del compuesto puede confirmarse por los resultados de la prueba de OSM (Anexo I), la cual está intrínsecamente relacionada con la concentración del biosurfactante en medio acuoso (Morikawa y col., 2000). El requerir de altas concentraciones de biosurfactante para poder obtener el material necesario para una caracterización

química es otra de las desventajas que presentan los métodos de extracción por solventes, problemática también reportada por Krowiak y col., (2011).

4. Medición de actividad antimicrobiana

Se realizó la medición de la actividad antimicrobiana de los 14 productos de los aislados bacterianos. Cada una de las pruebas se hizo por triplicado, usando los sobrenadantes con la respuesta positiva más alta ‘+++’ en los resultados de tensión superficial (Anexo III). Los biosurfactantes muestran actividad antimicrobiana contra bacterias, virus, levaduras y hongos, la cual se determina por la zona de inhibición de crecimiento, o por la concentración mínima de inhibición. Algunos biosurfactantes también presentaron propiedades antiadhesivas (Rehman y col., 2014).

4.1. Actividad Antibacteriana

En la figura 14, se presentan con los resultados obtenidos de la medición de la actividad antibacteriana.

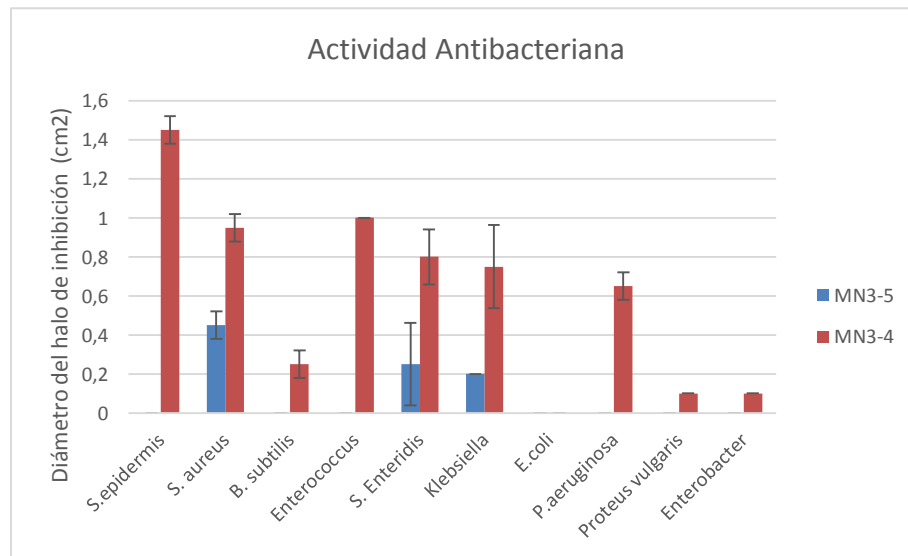


Figura 14. Capacidad de inhibición de las dos muestras con respuesta antibacteriana

De las 14 muestras estudiadas en esta prueba, solo dos mostraron capacidad de inhibir el crecimiento de algunas bacterias seleccionadas. La muestra de MN3-5 inhibió el crecimiento de *S. epidermis*; *Klebsiella* sp y *S. enteridis*, mientras que la muestra de MN3-4, fue capaz de inhibir a

todas las cepas seleccionadas, excepto *E. coli*. Las cepas bacterianas que MN3-5 pudo inhibir presentan las siguientes características: *Klebsiella* sp y *S. enteridis* son bacilos gram negativo y pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*; mientras que *S. aureus* es una bacteria coco gram positiva perteneciente a la familia *Staphylococcaceae*. De las tres cepas, que MN3-5 pudo inhibir, *S. aureus* presentó el halo de inhibición más grande.

Llama la atención que a pesar de la amplia cantidad de reportes que indican la gran capacidad inhibitoria de los biosurfactantes sobre *S. aureus*, adicional a su propiedad antiadhesiva, (Bharali y Konwar, 2011; Madhu y Prapulla 2013; Hajfarajollah y col., 2014; Mnif y Ghribi, 2015b), encontramos que esta inhibición fue relativamente baja, de igual manera son los casos de las cepas *Klebsiella* sp y *S. enteridis* cuando otros reportes indican que estos patógenos también son altamente sensibles a estos compuestos (Pradhan y col., 2013; Ramachandran y col., 2014; Madhu y Prapulla 2013). Una posible explicación podemos encontrarla en el trabajo de Hajfarajollah y col., (2014), quienes reportaron tanto la capacidad antibacteriana de un lipopéptido producido por la bacteria *Propionibacterium Freudenreichii*. En sus resultados, indican que este biosurfactante tiene la capacidad de inhibir estas tres cepas, junto a otros patógenos, (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Rhodococcus erythropolis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Alternaria alternantherae*, *Salmonella typhimurium*, y *Klebsiella pneumonia*), sin embargo, una diferencia importante fue que el porcentaje de inhibición sobre *K. pneumonia* y *S. typhimurium* fue superior al 50% en concentraciones bajas de este biosurfactante (3,2 mg/ml), mientras que para el resto de patógenos, se requirió del doble e incluso del triple de concentración para alcanzar el mismo rango de inhibición. Esto es importante porque la sensibilidad de la cepas gram negativas depende en gran medida de la concentración del biosurfactante, ya que por las propiedades constituyentes de la membrana de este grupo bacteriano, su inhibición requiere de una mayor concentración de agentes antibacterianos, así como del tipo de estructura de los mismos (Bharali y Konwar, 2011).

Con base en lo anterior y, sabiendo que la concentración de los biosurfactantes producidos en este trabajo fue insuficiente o deficiente, es posible que este biosurfactante en particular está en concentraciones por debajo de 3,2 mg/ml, y podemos suponer entonces que estamos en presencia de un lipopéptido el cual presenta características similares a los producidos por bacterias probióticas, como por ejemplo *Lactobacillus lactis*.

En el caso de MN3-4, todas las cepas bacterianas probadas, con excepción de *E. coli*, mostraron una respuesta inhibitoria. Al comparar el diámetro de inhibición entre las cepas, vemos que los registros más altos los encontramos en 3 cepas gram positiva (*S. epidermis*; *S. aureus*; *Enterococcus* sp), mientras que la última gram positiva (*B. subtilis*) mostró un pequeño halo de inhibición. En relación a la cepas restantes, 3 de las cepas gram negativa registraron niveles de inhibición altos (*Klebsiella* sp., *S. enteridis* y *P. aeruginosa*) y las otras 2 mostraron niveles de inhibición bajos (*P. vulgaris* y *Enterobacter* sp.). Esto, adicional a la falta de inhibición en *E. coli*, parece indicar que este biosurfactante tiene menor efectividad antibacteriana sobre cepas gram negativa, con respecto a las gram positiva.

Lo anterior concuerda con lo reportado por Lotfabad y col, (2013), quienes demostraron que las cepas gram positivas presentan una mayor sensibilidad con respecto a las gram negativas en presencia de ramnolípidos. Sin embargo al comparar el reporte de estos investigadores con los resultados de los niveles de inhibición sobre las cepas *Klebsiella* sp; *S. enteridis* y *P. aeruginosa*, así como el bajo nivel de inhibición encontrado en *B. subtilis* los valores no concuerdan, Esto se debe a que, según Ballot (2009), la capacidad de inhibición de los ramnolípidos varía por la composición de la mezcla de los mismos, y también se sabe que el tipo de ramnolípidos producido está fuertemente influenciado por la cepa bacteriana productora, la fuente de carbono utilizada y el mecanismo de producción del mismo (Lotfabad y col, 2013). Con base a lo anterior, podemos suponer que estamos ante un ramnolípido cuya composición genera un comportamiento que no necesariamente concuerda con otros reportes.

4.2. Actividad Antimicótica

En la figura 15, se observa la gráfica con los niveles de inhibición de las cepas fúngicas utilizadas en este experimento.

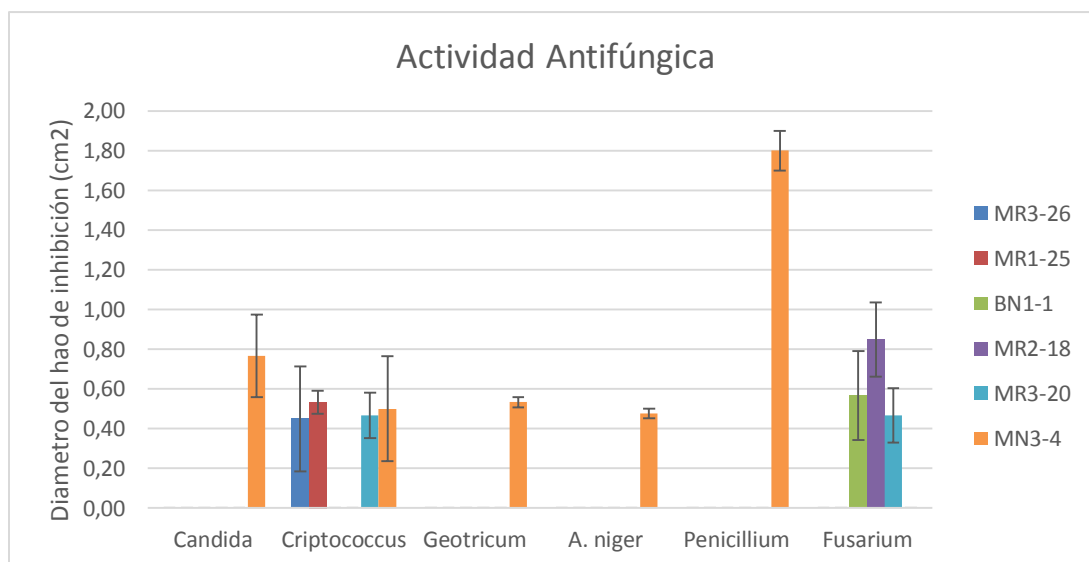


Figura 15. Capacidad de inhibición de las 6 muestras con respuesta antifúngica

De las 14 muestras estudiadas en esta prueba, solamente seis fueron capaces de presentar la capacidad de inhibir el crecimiento de algunas cepas fúngicas seleccionadas. Nuevamente vemos que la muestra MN3-4 muestra cierta actividad en la mayoría de los patógenos seleccionados para este estudio, con la excepción de *Fusarium* sp., y un bajo nivel de inhibición ($0,10 \pm 0,03 \text{ cm}^2$) en la cepa *A. niger*. En el caso de las levaduras, *Criptococcus* sp., y *Geotricum* sp., presentan niveles de inhibición muy similares ($0,50 \pm 0,26 \text{ cm}^2$ y $0,53 \pm 0,21 \text{ cm}^2$, respectivamente) mientras que *Candida* sp., muestra un nivel de inhibición medianamente mayor ($0,77 \pm 0,23 \text{ cm}^2$). Finalmente tenemos que la cepa con el mayor nivel de inhibición fue *Penicillium* sp, donde más que un halo de inhibición, lo reportado es la distancia desde el punto de siembra del biosurfactante y la cepa fúngica, ya que fuera de este punto de siembra no se observó crecimiento en ninguna de las 3 réplicas.

Los resultados encontrados por MN3-4, si bien no hay registros en relación a *Geotricum* sp., y *Criptococcus* sp., la respuesta positiva en *Candida* sp., *A. niger* y *Penicillium* sp., son características de ramnolípidos, como indica Lotfabad y col, (2013). Los niveles de inhibición dependerán de la

susceptibilidad de la cepa al biosurfactante, y del tipo de estructura que presente el ramnolípido, ya que algunos presentan mejores propiedades antibacterianas que antifúngicas (Lotfabad y col, 2013). Esta información, unida a la actividad antibacteriana de esta muestra, nos permite llegar a la conclusión que este biosurfactante es un ramnolípido.

En relación a las levaduras, solamente 3 biosurfactantes mostraron capacidad de inhibición pero solo en la levadura, *Cryptococcus* sp. Algo similar ocurre con las cepas de hongos, donde solo se encontró inhibición en *Fusarium* sp. También observamos que solo la cepa MN3-20, fue capaz de presentar inhibición tanto en *Cryptococcus* sp., como en *Fusarium* sp., con resultados similares en ambas cepas fúngicas. Esta capacidad de poder inhibir tanto levadura como hongos filamentosos es observada en biosurfactantes lipopeptidos y los bioemulsificantes. También sabemos que MN3-20, se comporta más como agente bioemulsificante por sus propiedades tensoactivas en aceite de oliva. Sin embargo, este bioemulsificante no presentó ningún tipo de actividad antibacteriana, situación que no concuerda con los reportes utilizados hasta ahora para su identificación (Mnif y Ghribi, 2015b).

Finalmente tenemos las cepas MR3-26 y MR1-25 muestran solo capacidad inhibitoria sobre *Cryptococcus* sp., mientras que las cepas BN1-1 y MR2-18, presentan solo inhibición sobre *Fusarium* sp. En el caso de *Cryptococcus* sp., esta reportado que es inhibido por biosurfactantes lipopeptidos, mientras que para *Fusarium* sp., existen reportes de ser inhibido por bioemulsificantes (Liang y col., 2014; Mnif y Ghribi, 2015b). Si comparamos esta información con los resultados obtenidos de la tensión superficial (Anexo III), podemos deducir lo siguiente: las cepas MR3-26 y BN1-1 son biosurfactantes, mientras que las cepas MR1-25 y MR2-18, son bioemulsificantes. El hecho que tengamos un grupo de agentes tensoactivos inhibiendo distintos organismos fúngicos es una señal que estamos ante compuestos diferentes. Sin embargo, ya que ninguno presentó actividad antibacteriana, la cual está ampliamente reportada que actúa de forma simultánea a la antifúngica, esto no nos permitió llegar a una identificación más concisa, además de lipopéptidos y

bioemulsificantes. Para ello tendremos que comparar estos resultados con los obtenidos de los géneros bacterianos.

Algo que podemos obtener de estos resultados es el descarte de ciertos biosurfactantes, como lo son: surfactina, iturina, liquenisinas, micosubtilina, ácidos grasos y fosfolípidos, los cuales son los agentes dentro de los lipopéptidos y bioemulsificantes con mayor actividad tanto antibacteriana como antifúngica (Rodríguez y col., 2006; Olteanu y col., 2011; Liang y col., 2014; Mnif y Ghribi, 2015b).

5. Identificación del género bacteriano y carga iónica del BS/BE

En la Tabla 8 que se presenta a continuación tenemos los posibles géneros bacterianos identificados a partir de las pruebas bioquímicas realizadas en este trabajo, junto con el posible biosurfactante que produce dicho género de acuerdo a la bibliografía consultada, y la carga iónica que presenta cada uno de estos, así como el biosurfactante determinado o identificado.

Por los resultados de las propiedades tensoactivas de estos compuestos, sabemos que de los 14 biosurfactantes encontrados, 10 son bioemulsificantes y 4 son biosurfactantes. Al juntar esta información con la identificación de las cepas bacterianas hasta nivel de género, se esperaba conocer el tipo de biosurfactante producido, ya que como se ha mencionado en varias ocasiones, el tipo de biosurfactante depende del microorganismo que lo produce.

Tabla 8. Géneros bacterianos de las cepas con potencial de producción, la medición de la carga iónica de los biosurfactantes producidos por las mismas y la identificación del mismo

Aislados bacterianos	Género seleccionado	Carga iónica (ADD)	Biosurfactante identificado
ER3-11	<i>Pimelobacter</i>	No iónico	Bioemulsificante
BR2-26	<i>Neisseria</i>	Aniónico	Sin identificar
MN3-5	<i>Enterobacter</i>	No iónico	Exopolisacárido
MR3-26	<i>Flavobacterium</i>	Aniónico	Flavolípido
MR1-25	<i>Staphylococcus</i>	Cationico	Lipopeptido
BN1-1	<i>Streptococcus</i>	Aniónico	Sin identificar
MR3-20	<i>Aeromona</i>	Cationico	Proteína
BR1-15	<i>Hydrogenophaga</i>	No iónico	Polihidroxialcanoatos
MN2-16	<i>Alcaligenes</i>	No iónico	Emulsan
MN3-4	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Aniónico	Ramnolípidos
MN3-1	<i>Serratia</i>	No iónico	Bioemulsificante
MR2-18; MR3-27; BR2-14	No se pudo identificar		

Para llegar hasta una identificación del tipo de biosurfactante y bioemulsificante producido, se comparó la bibliografía de los géneros bacterianos identificados, junto con la carga iónica del compuesto producido y la actividad antimicrobiana. Con esta información, pudimos llegar hasta la identificación del compuesto producido por las cepas MR3-26; MR1-25; MN3-5; BN1-1; MR3-20. Es importante encontramos actividad en aislados que normalmente no producen la mismas y aislados que se tienen reportes de dicha actividad más no la presentaron en los niveles esperados. Sin embargo, al saber que esta depende de las condiciones de cultivo, los microorganismos que la producen y su composición final, no se descarta la posibilidad de que esta información no haya sido reportada en la literatura. También se pudo confirmar el biosurfactante producido por algunos de los métodos cualitativos, como en el caso de la cepa MN3-4 que es capaz de producir ramnolípidos, y que se pudo corroborar en la prueba de placas de Agar Azul con CTAB (Siegmund I y Wagner F, 1991).

Uno de los problemas que se encontró a medida que se avanzó en la identificación mediante pruebas bioquímicas, es que, como se puede ver en la tabla 9, en algunas ocasiones varios géneros se ajustan a la descripción encontrada en las bacterias aisladas.

Tabla 9. Potenciales géneros bacterianos que coinciden con los resultados obtenidos de las cepas bacterianas de interés

Aislado Bacteriano	Potenciales Géneros bacterianos	Posibles Biosurfactantes	Referencia
ER3-11	<i>Arthrobacter</i>	Lipopeptido	Mnif y Ghribi, 2015b
	<i>Cellulomonas</i>	Ramnolipido	Wang y col., 2014
	<i>Pimelobacter</i> *	Bioemulsificante	Saisa-ard y col., 2014
MN3-5	<i>Salmonella</i>	No identificado	Rossi y col., 2016
	<i>Enterobacter</i>	Exopolisacáridos	Mnif y Ghribi, 2015b
BR1-15	<i>Axobacter</i>	Polihidroxialcanoatos	Pappachan, 2001
	<i>Hydrogenophaga</i> *	Polihidroxialcanoatos	Pappachan, 2001
MN2-16	<i>Ewingella</i>	-	-
	<i>Pantoea</i>	Glucolípidos	Smith y col., 2016
	<i>Serratia</i>	Bioemulsificante lipopeptido	Al-Mullan, 2010
	<i>Alcaligenes</i>	Emulsan	Mnif y Ghribi, 2015b
MN3-1	<i>Serratia</i>	Bioemulsificante lipopeptido	Al-Mullan, 2010
	<i>Methylobacterium</i>	Ramnolipidos	Vyas y Dave, 2016

*Género selección para la identificación del biosurfactante

Afortunadamente, a través del comportamiento específico de varios biosurfactantes y los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana, podemos deducir cual es el que presenta un

mayor potencial de ser producido a partir de estos aislados bacterianos. Tomemos el caso de la cepa ER3-11, la cual puede presentó tres posibles géneros debido a su comportamiento en las pruebas bioquímicas. Por los resultados obtenidos en los valores de la tensión superficial y en la carga iónica, sabemos que el posible género es *Pimelobacter*, el cual produce un bioemulsificante. Lo mismo aplicaría para las cepas BR2-26 y MN3-5. En el caso de la ausencia de la actividad antimicrobiana se tuvo dependió exclusivamente de los resultados de las propiedades tensoactivas para su identificación, como es el caso de las cepas MN3-1 y MN2-16.

Sin embargo, hubo algunas cepas como la MR2-18, BR2-14, MR3-27, que tras llegar al género y ver qué tipo de biosurfactante producían, no se pudieron identificar, debido a que tanto los resultados no coincidían con los biosurfactantes producidos por los potenciales géneros bacterianos, lo que sugiere que podría haber un error en la identificación del género bacteriano.

Si bien no se logró una identificación completa de los 14 potenciales biosurfactantes, se logró llegar a la identificación de al menos 11 compuestos. Sin embargo, existen una serie de desventajas al tratar de identificar una cepa bacteriana solo por su respuesta a las pruebas bioquímicas, como Uno en ocasiones no todos los laboratorios cuentan con todos los elementos necesarios para poder llevar a cabo el número de pruebas necesarias para diferenciar correctamente unos géneros bacterianos de otros, lo cual lleva a un segundo problema que es una sola cepa puede corresponder a más de un género bacteriano. Adicionalmente, se corre el riesgo que, algunas cepas bacterianas cambian su comportamiento ante las pruebas bioquímicas de acuerdo al tiempo de incubación y/o la edad del aislado bacteriano.

6. Estudio del efecto del tiempo en la producción de BS/BE

Para este ensayo se seleccionaron cuatro cepas que, por su comportamiento en las pruebas de selección y los registros de SFT, se clasifican de la siguiente manera: MR1-25 y MN3-4, son cepas productoras de biosurfactantes; mientras que BR2-26 y MN3-1 son cepas productoras de

bioemulsificantes. Una vez cumplido el tiempo de inoculación se procedió a realizar las pruebas cualitativas y cuantitativas, para determinar la influencia del tiempo de incubación sobre la producción de estos compuestos al comparar los resultados de los tres días con los de siete días.

En las figuras 16 y 17, se muestran los índices de emulsificación, las cuales representan las cepas productoras de biosurfactantes, mientras que en las figuras 18 y 19, representan los índices de emulsificación encontrados en las cepas productoras de bioemulsificantes.

En los resultados de las figuras 16 y 17, observamos que a los tres días los índices de emulsificación de ambas cepas en presencia de glucosa son más estables por períodos de tiempo más largos que a los siete días, mientras que en presencia de aceite de oliva, la estabilidad de la espuma se mantuvo a lo largo del experimento, para ambos períodos de incubación. Esto parece indicar que en presencia de aceite de oliva para períodos de tiempo cortos, la producción de agentes emulsificantes será mayor que la encontrada en glucosa, resultados similares a los encontrados por Gholamreza y col., (2007) y Sathe y col., (2012). También podemos ver que en ambas cepas las muestras con acetato de sodio solo mostraron emulsificación a los siete días, indicando tal vez que se requiere de períodos de tiempo más largos con fuentes de carbono pobres para la producción de biosurfactantes.

La principal diferencia entre ambos biosurfactantes es que mientras que en la cepa MR1-15 los valores de los índices de emulsificación más altos se registraron en las muestras de los siete días de glucosa y aceite de oliva, mientras que la cepa MN3-4 presentó los valores más altos bajo las mismas fuentes de carbono a los tres días. Esto es solo un indicador que estamos ante dos biosurfactantes distintos, por lo que sus requerimientos de producción son diferentes, y por ende, no presentarán el mismo comportamiento aun en condiciones de producción similares.

Indice de emulsificación de MR1-25

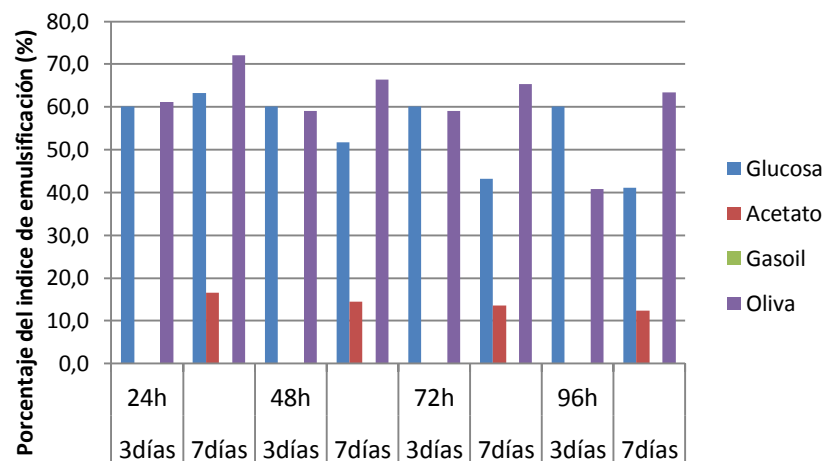


Figura 16. Actividad emulsificante de la cepa MR1-5 bajo las cuatro fuentes de carbono a los 3 y 7 días de inoculación.

Indice de emulsificación de MN3-4

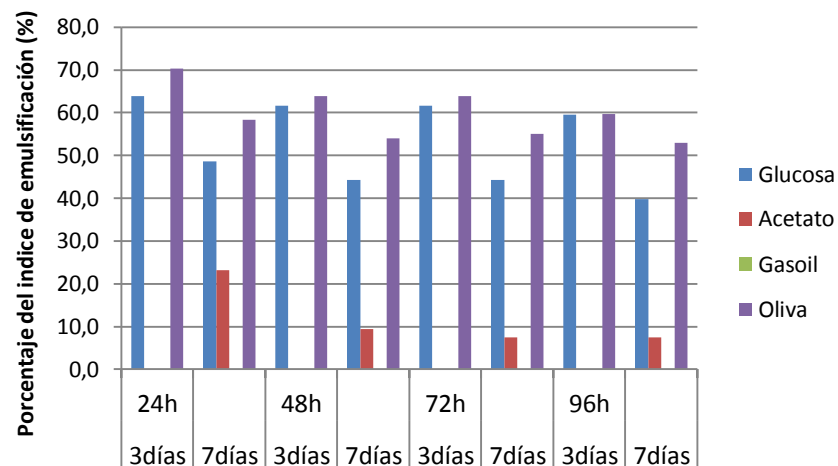


Figura 17. Actividad emulsificante de la cepa MN3-4 bajo las cuatro fuentes de carbono a los 3 y 7 días de inoculación.

Indice de emulsificación de BR2-26

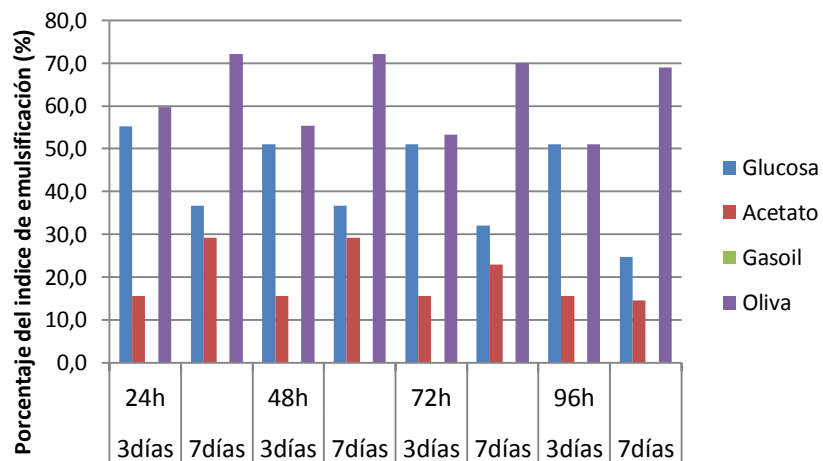


Figura 18. Actividad emulsificante de la cepa BR2-26 bajo las cuatro fuentes de carbono a los 3 y 7 días de inoculación.

Indice de emulsificación de MN3-1

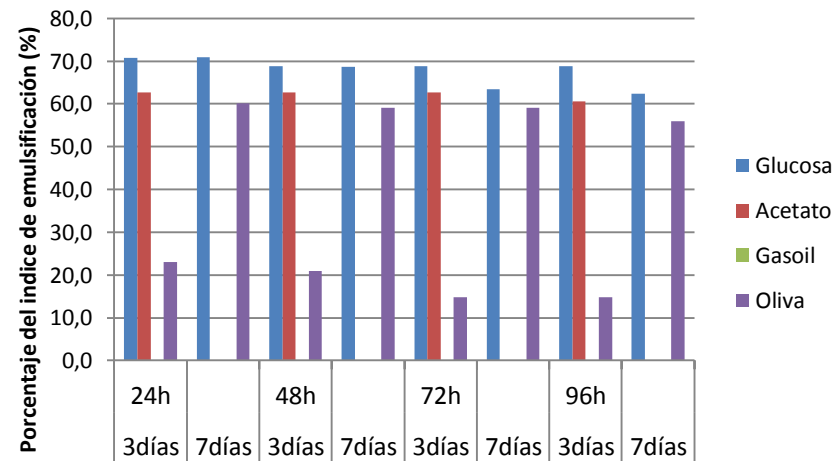


Figura 19. Actividad emulsificante de la cepa MN3-1 bajo las cuatro fuentes de carbono a los 3 y 7 días de inoculación.

Los resultados de la cepa MR1-25 en glucosa, presentan un comportamiento similar al reportado por indica Bonilla y col., (2004), ya que en el tiempo de incubación a los tres días, las cepas aún se encuentran entre la fase exponencial y la fase estacionaria, las cepas aún están produciendo agentes emulsificantes para mejorar el acceso a la fuente de carbono. Por otra parte, en presencia de aceite de oliva, por ser un compuesto hidrofóbico, las cepas buscaran producir más agentes emulsificantes que ayuden en la solubilización de esta fuente de carbono (Ron y Rosenberg, 1985), además existen trabajos donde la presencia de compuestos hidrofóbico, mejoran las condiciones de producción de biosurfactante (Prats y col., 2008; Zhou y col., 2015).

En el caso de la cepa productora MN3-4, ha sido identificada como *P. aeruginosa* y productora de ramnolípidos, se espera que en presencia de aceite oliva, presente una alta capacidad de producir agentes emulsificantes en comparación con la glucosa, como ya se ha confirmado en otros trabajos (Sim y col., 1992; Makkar, Cameotra y Banat, 2011).

En las figuras 18 y 19, tenemos los resultados de los índices de emulsificación encontrados en las cepas productoras de bioemulsificantes. Una característica que presentan ambas cepas es que a diferencia de las cepas productoras de biosurfactantes, los valores de los índices de emulsificación en las muestras del aceite de oliva a los tres días están por debajo de los valores encontrados a los siete días. Esto parece indicar que para generar agentes emulsificantes eficientes ante fuentes de carbono insolubles, se requieren períodos de tiempo más largos.

Una posible explicación a este comportamiento es que cuando las bacterias producen bioemulsificantes en presencia de compuestos hidrofóbicos, no los liberan directamente al medio extracelular, sino que están unidos a la membrana de la bacteria, aumentando la hidrofobicidad y permitiéndole así poder unirse a las gotas del sustrato hidrofóbico, mejorando de esta forma su acceso. Cuando se agotan los elementos nutricionales de la gota, la bacteria se separa de la misma mediante la liberación del bioemulsificante de la membrana y de esta manera queda libre en el medio de cultivo y aumenta su concentración en el tiempo.

Es muy posible que a los tres días de incubación, la concentración del bioemulsificante sea menor, puesto que aún queda fuente de carbono disponible y los bioemulsificantes no se han separado de la membrana bacteriana y por ello la concentración a nivel extracelular es menor. Este proceso también ocurre con los biosurfactantes, aunque es más característico de bioemulsificantes.

En las muestras con glucosa y acetato de sodio como fuentes de carbono, es donde encontramos los primeros indicios de que estamos ante dos bioemulsificantes distintos. Mientras que en la cepa BR2-26, los valores de glucosa de los siete días son mucho más altos que a los tres días, los valores registrados en la cepa MN3-1 en esta fuente de carbono son muy similares en ambos períodos de incubación, lo que hace suponer que este agente emulsificante trabaja muy bien con esta fuente de carbono, independientemente del tiempo de incubación (Bonilla y col., 2004; Morita y col., 2007; Vaslleva-Tonkova y Gesheva 2007; Nasrin y col., 2007; Chakraborty y col., 2014; Zhou y col., 2015). Por otro lado, en el caso del acetato de sodio, vemos que la cepa BR2-26 muestra actividad emulsificante en ambos períodos de incubación, mientras que MN3-1 solo la presenta a los tres días. Esto señala la importancia de como la producción del compuesto de interés es altamente dependiente de los requerimientos necesarios de las cepas productoras, ya que la producción varía de acuerdo al microorganismo y la fuente de carbono utilizado.

En referencia a la fuente de carbono Gasoil, como se pudo ver en las figuras 16, 17, 18 y 19 no se formaron emulsiones en ninguna de las muestras y en ninguno de los tiempos, por lo que se considera que esta fuente de carbono no es idónea para este experimento con las cepas seleccionadas.

La figura 20, se muestra la gráfica con los resultados de la prueba de BATH. En esta prueba todas las cepas fueron capaces de mostrar cierto grado de adherencia, al menos en una fuente de carbono en el tiempo de incubación de tres días, mientras que en las muestras de siete días, solo se observaron en dos cepas y sus valores están por debajo de los registrados en las muestras de tres días de incubación.

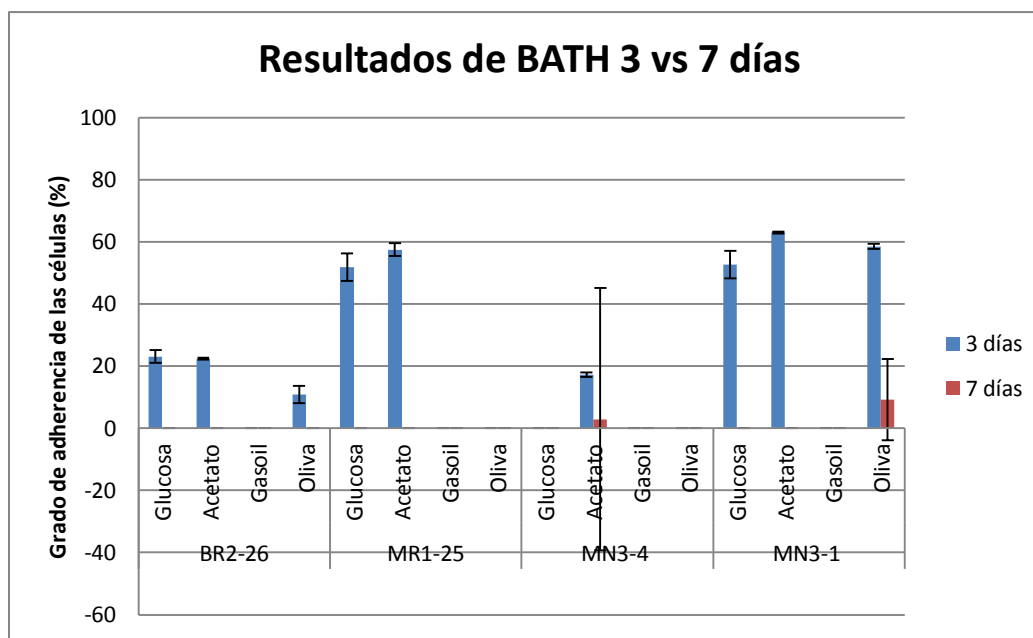


Figura 20. Grado de adherencia de las cepas en la prueba de BATH bajo las cuatro fuentes de carbono a los 3 y 7 días de inoculación.

Tomando en cuenta que la capacidad de adherencia de las bacterias depende en gran medida del ciclo celular, es posible que durante el crecimiento bacteriano, se presente una mayor capacidad de adherencia a las fuentes de carbono. Otro aspecto que podemos observar es que esta prueba no establece una clara distinción entre biosurfactantes y bioemulsificantes, debido a que las respuestas más altas se encontraron en una cepa de cada tipo de agente tensoactivo. No obstante, se observó que ambas cepas productoras de bioemulsificantes presentaron cierto grado de adherencia por tres fuentes de carbono: Glucosa, Acetato de Sodio y Aceite de Oliva, mientras que ambos biosurfactantes tuvieron la capacidad de adherencia al acetato y en el caso de MR1-25, a la glucosa.

Si comparamos los resultados de la cepa BR2-26 de la figura 20, con los encontrados en la figura 18, podemos ver una relación entre estos resultados. Los niveles del índice de emulsificación son altos en aceite de oliva, mientras que el índice de hidrofobicidad es bajo. Esto queda explicado por lo mencionado respecto a la liberación de los bioemulsificantes. Por otro lado, los registros más altos de esta cepa en el porcentaje de adherencia en glucosa, mientras que los niveles del índice de emulsificación son menores en esta fuente de carbono. Esto puede deberse a que la glucosa, al ser

una fuente soluble y de fácil acceso a los microorganismos, estos no liberan inmediatamente los biosurfactantes al medio extracelular, sino hasta que la bacteria alcanza cierto grado de saturación sobre su propia membrana (Rosenberg y Rosenberg 1985).

Para la cepa MR1-25, al encontrarse aún en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, en presencia de fuentes de carbono solubles, aún no han liberado suficiente biosurfactante en el medio que altera la hidrofobicidad de la membrana bacteriana y por lo tanto, le da cierto grado de adherencia por lo hidrocarburos.

Los resultados obtenidos por la cepa MN3-4, identificada como *P. aeruginosa*, muestra un comportamiento similar al reportado por Ron y Rosenberg, (1985) quienes indicaron que cuando esta cepa crece en medios ricos, no presenta altos niveles de adherencia en los resultados de la prueba BATH. Por otro lato, a cepa MN3-1, ya que el género bacteriano identificado es *Serratia*, estos resultados tienen mucho sentido, ya que esta cepa es muy reconocida por sus altos índices de hidrofobicidad en cultivos que se acercan a la fase estacionaria (Putri y Cameotra 1997; Rosenberg, 2006).

En las figura 21 y 22 se presentan las gráficas con los resultados de las pruebas de Parafil y DC a los tres y siete días. Se comparan los resultrados de ambas graficasya que ambas detectan la presencia de biosurfactantes de acuerdo a su alta “mojabilidad”

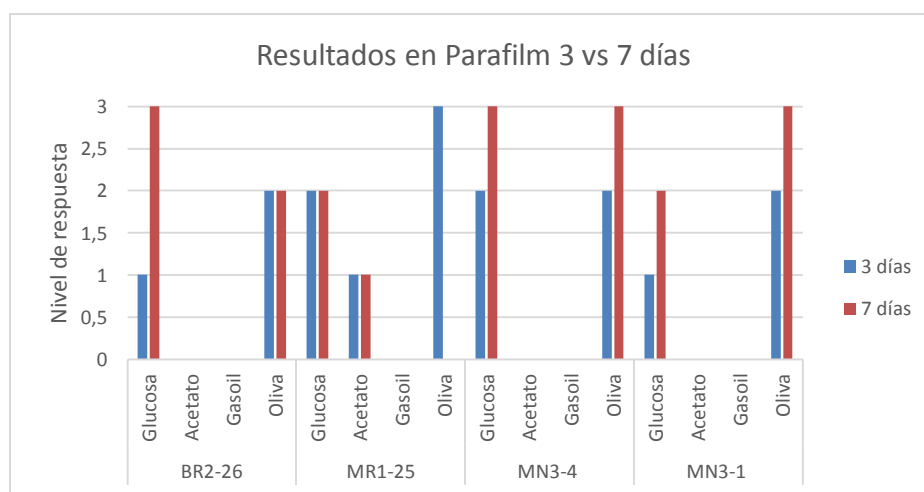


Figura 21. Grado de repuesta de las cepas en la prueba de Parafilm bajo las cuatro fuentes de carbono a los 3 y 7 días de inoculación.

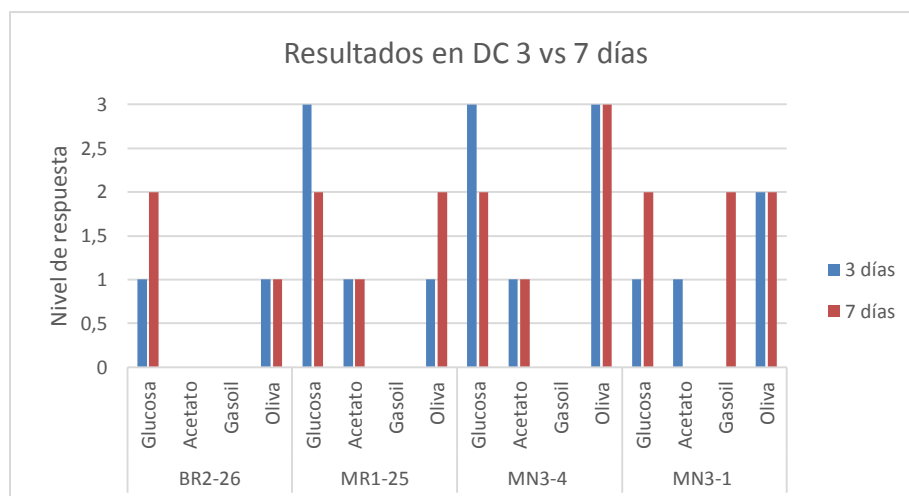


Figura 22. Grado de repuesta de las cepas en la prueba de DC bajo las cuatro fuentes de carbono a los 3 y 7 días de inoculación.

En los resultados reportados en ambas figuras tenemos el comportamiento de los biosurfactantes y bioemulsificantes a nivel interfacial. Lo que se encuentra en ambas graficas es como la cepa MR1-25 muestra mejores resultados en presencia de glucosa y aceite de oliva a los tres días que a los siete días, con excepción de aceite de oliva en DC donde el comportamiento se invirtió. Por otra parte la cepa MN3-4 mostro respuestas de niveles altos para ambas fuentes de carbono en ambos periodos de incubación, destacando que el aceite de oliva presento niveles de respuesta alto para ambas pruebas, mientras que en presencia de glucosa Parafilm mostro respuesta intermedia (2), resultados que se invierten en la prueba de DC. Adicionalmente encontramos que solo se pudo detectar un tipo de respuesta en presencia de acetato de sodio en MN3-1 en DC, mientras que MR1-25 mostro esta respuesta en ambas pruebas, sin diferencia en ambos periodos de incubacion

Estos resultados indican que dependiendo de la cepa productora de biosurfactantes, más que períodos largos de tiempo, se pueden trabajar con períodos de tiempos de inoculación más cortos y en estos se puede llegar a ver mejores resultados, ya que la producción del biosurfactante se inicia en la fase estacionaria. En presencia de fuentes de carbono insolubles esta fase estacionaria es más larga, pues no se puede acceder a esta fuente de carbono directamente, por lo que la producción de biosurfactante puede llegar a ser mucho más temprana y de alta concentración, como se aprecia en la cepa MR1-25.

En el caso de las cepas productoras de bioemulsificantes, encontramos que estas en presencia de fuentes de carbono solubles solo son capaces de mostrar respuestas de nivel alto (3) en los resultados de siete días de incubación para ambas pruebas, mientras que en presencia de aceite de oliva los niveles de respuesta más altos fueron encontrados en el periodo de incubación de siete días. Esto puede indicar que en fuentes de carbono solubles las cepas productoras de bioemulsificantes requieren un período de incubación mucho mayor para tener una mayor concentración del compuesto que les permite generar cambios a nivel interfacial. Sin embargo, en presencia de una fuente de carbono insoluble, como es el caso del aceite de oliva, no requieren de tanto tiempo para su producción, y en largos periodos de tiempo solo aumentan la concentración del compuesto.

Algo que llama la atención al comparar ambas pruebas es tanto los niveles de respuesta, como el hecho de que una prueba se observan resultados positivos que la otra prueba no detecta. Sabemos que ambas pruebas son capaces de detectar los agentes tensoactivos generados por los cambios en la tensión interfacial, de ser así ¿Por qué no presentan el mismo comportamiento? Esto puede deberse a que mientras una prueba presenta una menor concentración de biosurfactante para su detección, la otra puede presentar una mayor sensibilidad al compuesto producido.

En este sentido, Youssef y col., (2004) han explicado que el método de DC requiere de cierta concentración para generar resultados positivos, pero no se ha encontrado información de este tipo para la prueba de Parafilm, y en nuestro caso, viendo los resultados hasta ahora, parece indicar que la prueba de Parafilm no requiere de concentraciones tan altas como en DC para mostrar resultados positivos. Ahora bien, en el caso la capacidad de detectar compuestos tensoactivos, podemos ver que, incluso a bajas respuestas, el DC puede detectar la presencia de biosurfactantes que en algunos casos no se detectaron en la prueba de Parafilm situación mostrada en la figura 23 para las cepas MN3-1 y MN3-4. Un ejemplo similar podemos encontrarlo en el trabajo de Morita y col., (2007), quien al crecer la misma cepa bajo distintas fuentes de carbono y las mismas condiciones de crecimiento, obtuvo resultados distintos en la prueba de Parafilm. Esto se debe a que la composición química el

biosurfactante varía con la fuente de carbono utilizada. Con esta información se puede sugerir entonces que, si bien la detección de biosurfactantes es más dependiente de la concentración del mismo, la prueba de DC es más sensible a las distintas composiciones químicas que presente el biosurfactante con respecto a la prueba de Parafilm.

En la figura 23, están los resultados de la prueba de OSM. Como podemos ver, hay un comportamiento muy distintivo entre las cepas MR1-25 y MN3-4 productoras de biosurfactantes y las cepas BR2-26 y MN3-1, productoras de bioemulsificantes.

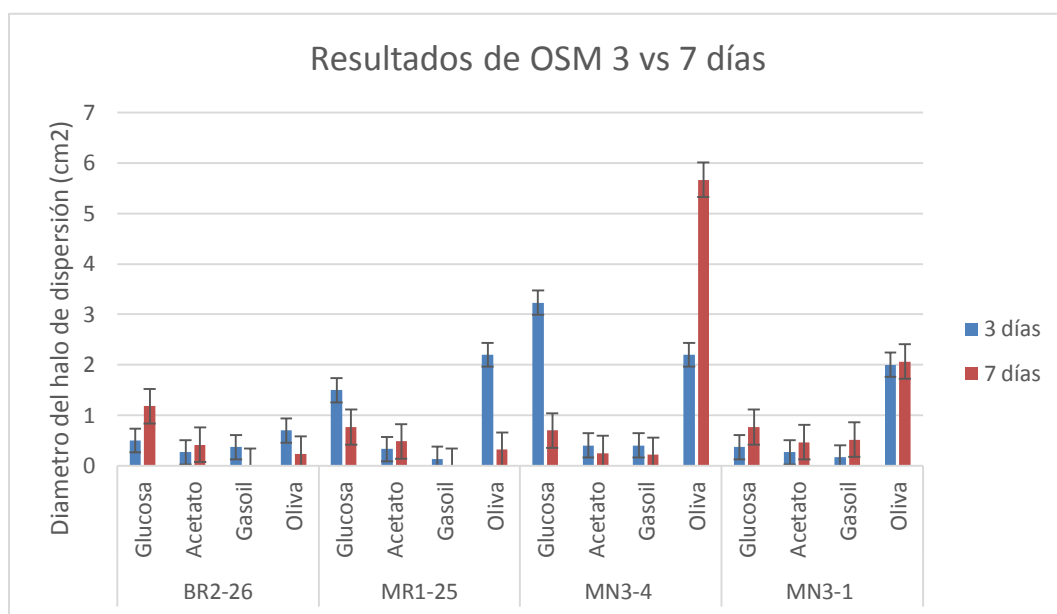


Figura 23. Capacidad de dispersión de todas las cepas en la prueba de OSM bajo las cuatro fuentes de carbono a los 3 y 7 días de inoculación.

Las cepas productoras de biosurfactantes presentaron un halo de dispersión más grande en las muestras de glucosa a los tres días, que a los siete días. Para el acetato de sodio, en ambas cepas se logró ver un halo de dispersión, con la diferencia que a los tres días la cepa MN3-4 mostró una respuesta mayor, mientras que la cepa MR1-25 mostró una mayor capacidad de dispersión, pero esta fue menor que la registrada a los siete días. El resultado más importante es el encontrado en las muestras de aceite de oliva, en donde la cepa MR1-25 mostró una capacidad de dispersión de $2,2 \pm 0,3 \text{ cm}^2$, entrando a un nivel de respuesta muy alto (++++), mientras que a los siete días, se observó muy poca dispersión de aceite ($0,3 \text{ cm}^2$, Anexo I), resultados que concuerdan con lo reportado por

Velioglu y Urek, (2014). La cepa MN3-4, si bien presenta una dispersión de repuesta de nivel muy alto (+++++) (Anexo IV) con un halo de diámetro también de $2,2 \pm 0,1 \text{ cm}^2$ y su mejor respuesta fue a los siete días, con un halo cuyo diámetro fue de $5,7 \pm 0,45 \text{ cm}^2$, superando así los niveles establecidos para esta prueba (>+++++) (Anexo IV).

Este descenso en los resultados de OSM a los siete días en presencia de glucosa y en el caso de la cepa MR1-25, en aceite de oliva se debe a la degradación del biosurfactante en el medio. Recordemos que la prueba de OSM esta correlacionada con la concentración del biosurfactante (Morikawa y col., 2000; Youssef y col., 2004; Madhu y Prapulla 2013), por lo que podemos suponer que la concentración del biosurfactante es menor a los siete días que a los tres días. Varios investigadores (Sathe y col., 2012; Bonila y col., 2005; Colla y col., 2010) han reportado como en periodos largos de tiempo en presencia de fuentes de carbono solubles, cuando la misma empieza a escasear, las bacterias optan por consumir los biosurfactantes, ya que estos también cumplen con el papel biológico de suministrar energía en condiciones estresantes. Adicionalmente tenemos la información de los otros métodos utilizados. La cepa MR1-25 mostró un descenso significativo en el índice de emulsificación, en la prueba de Parafilm y en DC en los resultados de siete días respecto a los de tres días. Por otro lado, si bien la cepa MN3-4 mostró un descenso en la concentración de biosurfactante en glucosa, presencia de aceite de oliva aumentó la concentración. Esto nuevamente puede atribuirse a los tipos de biosurfactantes que se están produciendo, ya que existen reportes de que si bien *P. aeruginosa* es capaz de producir biosurfactante en presencia de aceite de oliva en etapas tempranas de la curva de crecimiento, también es capaz de mantenerse estable por largos períodos de tiempo (Makkar, Cameotra y Banat, 2011; Mercade y col., 1993; Thaniyavarn y col., 2006, Xia y col., 2012; Gunther y col., 2005).

Ahora bien, en los resultados obtenidos de las cepas productoras de bioemulsificantes, encontramos un comportamiento totalmente distinto. Estas cepas muestran un halo de dispersión mayor en los ensayos de siete días que en los de tres días de incubación, en presencia de ambas fuentes

de carbono solubles. Sin embargo, en presencia de aceite de oliva, la cepa BR2-26 mostró un diámetro de dispersión menor a los siete días ($0,23 \pm 0,14$) que a los tres días ($0,70 \pm 0,17$), mientras que la cepa MN3-1 presentó comportamiento muy similar en ambos periodos de incubación, confirmando que estamos ante dos compuestos de distinta naturaleza

Debemos recordar que los bioemulsificantes son deficientes como agentes tensioactivos, por lo que su capacidad para reducir la tensión superficial es baja. En estos resultados vemos que la concentración de los bioemulsificantes en presencia de fuentes de carbono solubles a los tres días, no es lo suficientemente alta como para generar cambios significativos en los valores de tensión superficial y este fenómeno se aprecia más en esta prueba, y en los resultados de las figuras 22 y 23. Por otro lado, en presencia de aceite de oliva, al ser una fuente insoluble, permite una producción temprana de agentes emulsificantes en fases tempranas de crecimiento bacteriano, y por ello se registran valores altos a los tres días. La diferencia en los resultados según la fuente de carbono utilizada puede atribuirse a que son bioemulsificantes distintos producidos por dos diferentes microorganismos, uno perteneciente al género de *Serratia*, conocido no solo por producir bioemulsificante en presencia de aceite de oliva en etapas tempranas de crecimiento sino también mantener su concentración posterior a la fase de crecimiento estacionaria (Rosenberg y Rosenberg 1985; Putri y Cameotra 1997; Rosenber y col., 2006; Al-Mulla 2010;)

Finalmente, tenemos los resultados relacionados a la medición de la tensión superficial respecto de los tres días a los siete días que se observan en la gráfica de la figura 24.

Lo primero que podemos observar es que como lo discutido en las figuras 21, 22 y 23 en relación a las cepas BR2-26 y MN3-1 productoras de bioemulsificantes es confirmado por la medición de la tensión superficial. A los tres días las cepas no fueron capaces de producir suficiente compuesto como para generar variaciones en la tensión superficial, mientras que por el tipo de bioemulsificante

producido por la cepa MN3-1, esta es solo capaz de mostrar cambios significativos en períodos cortos de tiempo en presencia de aceite de oliva.

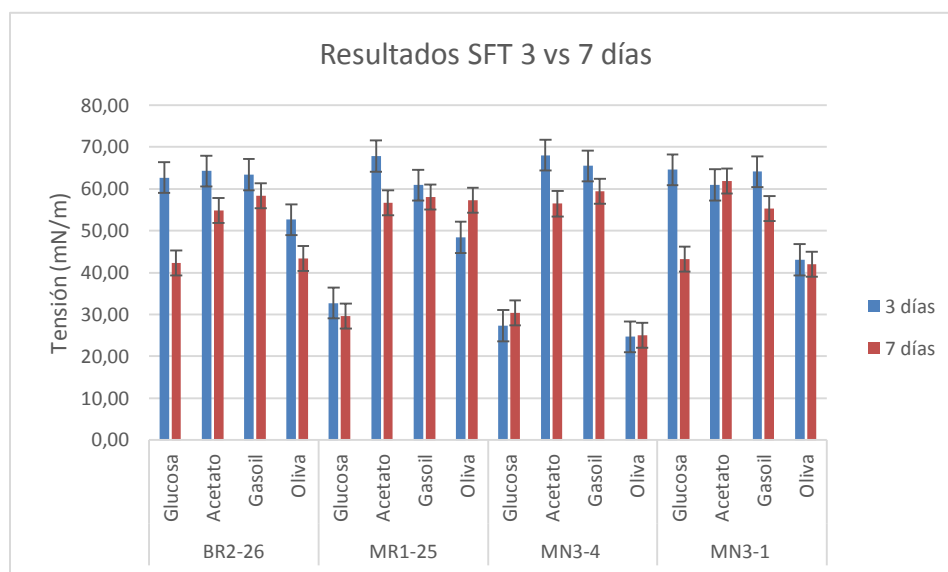


Figura 24. Medición de tensión superficial (SFT) bajo las cuatro fuentes de carbono a los 3 y 7 días de inoculación.

En cambio, en relación a las cepas MR1-25 y MN3-4 productoras de biosurfactante, estas requieren de períodos cortos de tiempo en presencia de fuentes de carbono solubles, mientras que el incremento en la tensión superficial a los siete días puede deberse a la degradación de las moléculas del biosurfactante (Colla y col., 2010; Suresh y col., 2007).

La principal diferencia de esta gráfica con las anteriores es que aparentemente en presencia de aceite de oliva la cepa MR1-25 no es capaz de comportarse como agente tensoactivo, sino más bien como agente bioemulsificante, que solo fue capaz de generar una ligera disminución de la tensión superficial en períodos largos de tiempo. Situación similar fue también reportado por Desai y Banat (1997); Saimmai y col., (2012b); y Zhou y col., (2015) quienes indicaron que en presencia de fuentes de carbono solubles algunos biosurfactantes presentan una mayor actividad como agentes tensoactivo, que en presencia de fuentes de carbono hidrofóbicas. Además, por las propiedades de los ramnolípidos presentes en la cepa MN3-4, le permite comportarse como un buen agente tensoactivo en presencia de ambos tipos de fuentes de carbono, aunque puede verse que, al igual que la cepa

MR1-25 prefiere las fuentes de carbono solubles como agente tensoactivo en períodos cortos de tiempo.

Para comprobar que efectivamente el tiempo ejerce un efecto sobre la producción de biosurfactantes, se realizó un análisis de ANOVA factorial utilizando los valores de la tensión superficial a los tres y siete días. Debido a que el número de replicas fue muy bajo en comparación al utilizado en el ANOVA de una vía, se decidió analizar el efecto del tiempo bajo 3 supuestos: efecto del tiempo sobre la fuente de carbono; efecto del tiempo sobre las cepas seleccionadas; y efecto de la fuente de carbono sobre las cepas seleccionadas.

Según los resultados del análisis de varianza del tiempo sobre la fuente de carbono (ANOVA factorial; $F=0,5278$, $df=24$; $p>0,005$, $p=0,667430$) y sobre las cepas seleccionadas (ANOVA factorial; $F=0,1290$, $df=24$; $p>0,05$, $p=0,941964$), indicó que las diferencias obtenidas entre las medias de la tensión superficial no son significativas. En las pruebas a posteriori (figura 25 y 26) comprobamos que no existe una diferencia significativa entre ninguna de las medias ($n= 32$; $p>0,05$).

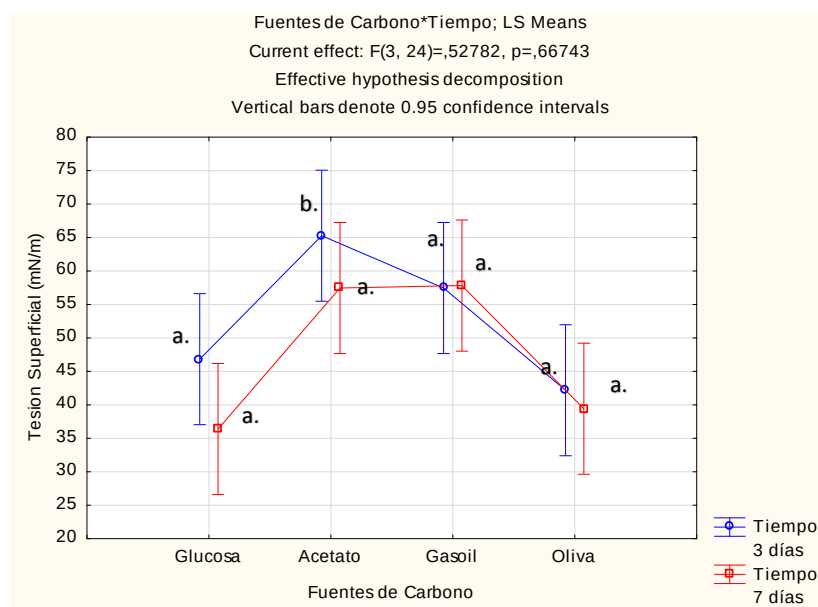


Figura 25. Comparación de las medias de la tensión superficial en los dos periodos de tiempo bajo las distintas fuentes de carbono.

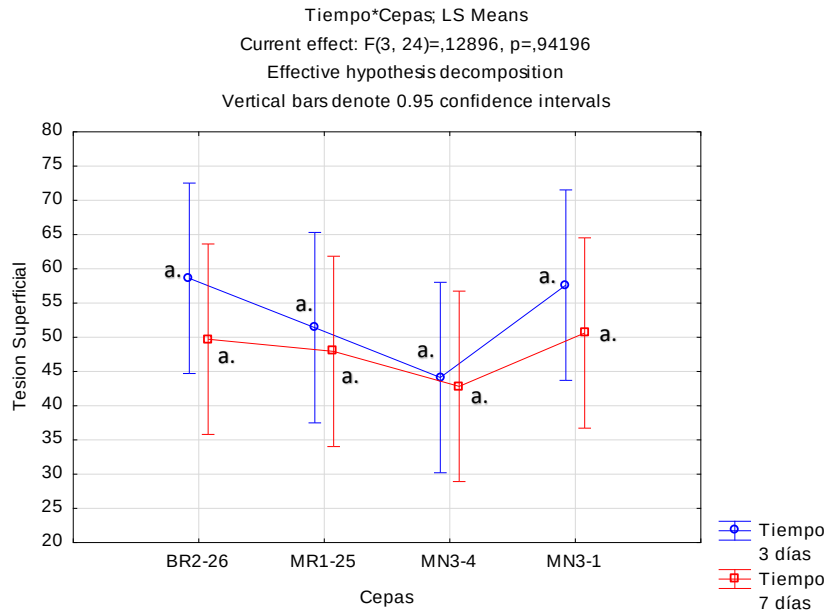


Figura 26. Comparación de las medias de las medias de la tensión superficial en los dos periodos de tiempo de las cepas seleccionadas.

Sin embargo al estudiar del efecto del tiempo bajo el supuesto de la relación entre la fuente de carbono y las cepas seleccionadas, el análisis de varianza (ANOVA factorial; $F=3,083$, $df=16$; $p<0,0$, $p=0,023906$).

En el análisis a posteriori (figura 27), encontramos que podemos separar las cepas de acuerdo a si son productoras de bioemulsificantes (BR2-26 y MN3-1) y productoras de biosurfactantes (MR1-25 y MN3-4). Adicionalmente vemos que el comportamiento de las cepas varía de acuerdo a la fuente de carbono utilizada, donde las cepas BR2-26 y MN3-1 solo pueden diferenciarse por los resultados encontrados bajo el aceite de oliva ($n=32$; $a>0,05$; $c>0,05$; $f<0,05$). Adicionalmente, la cepa BR2-26 solo puede diferenciarse de la cepa MR1-25 en los resultados de glucosa ($n=32$; $b<0,05$) y de la cepa MN3-4 en los resultados de glucosa y aceite de oliva ($n=32$; $e<0,05$; $f<0,05$).

En el caso de las cepas BR2-26 y MN3-1, ninguna de estas cepas fue capaz de reducir eficientemente la tensión superficial para glucosa en tres días, pero sí en siete días. Finalmente solo la cepa MN3-1 fue capaz de mostrar un comportamiento reductor de la tensión superficial en aceite de oliva, que la diferencia de la cepa BR2-26. Esta particularidad de ser malos o poco reductores de

la tensión superficial es característica de los bioemulsificantes, y en algunos casos, dependiendo del sustrato pueden producir medianamente surfactantes en periodos cortos de tiempo. Esto confirma la diferencia en la clase de biosurfactante de ambas cepas.

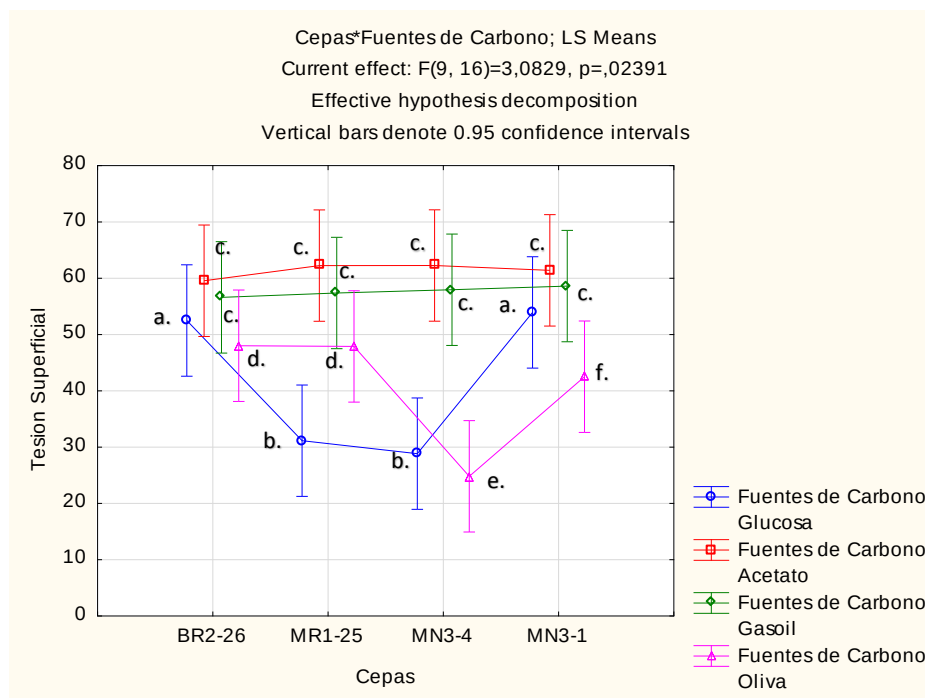


Figura 27. Comparación de las medias de la tensión superficial de las cepas seleccionadas en los dos periodos de tiempo bajo las distintas fuentes de fuentes de carbono.

Por otro lado, al estudiar el comportamiento de las cepas restantes, vemos que MR1-25, puede diferenciarse sin problemas de las otras cepas bajo glucosa, excepto en el caso de la cepa MN3-4 donde solo puede diferenciarse en los resultados de aceite de oliva. Este comportamiento también puede observarse en la cepa MN3-4, es decir, solo los resultados en glucosa y oliva permiten diferenciarla de las otras cepas. Así al enfocarnos en la curva de glucosa podemos ver que las dos cepas productoras de biosurfactantes MR1-25 y MN3-4 tienen una cierta similitud en su comportamiento, pues los biosurfactantes son los únicos que fueron capaces de disminuir la tensión superficial en presencia de esta fuente de carbono, mientras que los resultados en aceite de oliva, indican que estamos ante dos compuestos tensoactivos distintos.

Adicionalmente, se destaca que las fuentes de carbono acetato de sodio y gasoil no son idóneas para la producción de estos compuestos, por eso, independientemente del tiempo de inoculación seleccionado, el resultado siempre será el mismo y las medias para las cuatro cepas presentan una alta similitud.

En resumen, con este análisis de varianza se explica lo observado en los métodos cualitativos, los biosurfactantes prefieren las fuentes de carbono solubles para períodos de tiempo cortos (1-4 días), mientras que el uso de fuentes insolubles es preferida para periodos de tiempo más largos (5-7 días) que equivalen a un aumento en la concentración de biosurfactante (Batista y col., 2006). Mientras que, cuando las sepas se inoculan en presencia de fuentes de carbono solubles, los bioemulsificantes requieren de periodos de tiempo más largos, mientras que en presencia de fuentes de carbono hidrofóbicas no dichos tiempos de incubación pueden ser más cortos. Por supuesto todos estos parámetros están sujetos a las cepas seleccionadas para el estudio de la producción de los compuestos tensoactivos.

Ahora, si comparamos los resultados obtenidos de los métodos cualitativos con los resultados estadísticos, surge la pregunta ¿por qué a pesar de encontrar tanta diferencia en los experimentos de detección cualitativa, no se encontró un efecto del tiempo sobre la producción de biosurfactantes/bioemulsificantes en los resultados estadísticos, y más aún cuando existen varios reportes que señalan los efectos del tiempo sobre la producción? La respuesta la podríamos encontrarla al considerar la concentración micelar crítica (CMC).

Si recordamos las propiedades funcionales de la actividad superficial de los biosurfactantes, sabemos que estos tienen la capacidad de reducir los valores de la tensión superficial y alcanzar la CMC a concentraciones más bajas que las requeridas por los surfactantes. Ahora, si recordamos la figura 2 del marco teórico vemos que una vez que las moléculas surfactantes alcanzan la concentración mínima necesaria para la formación de las micelas, se obtiene el máximo valor en la disminución de la tensión superficial y este se mantiene constante a lo largo del tiempo. Por lo tanto,

podemos decir en base a esta información que, utilizando solo los datos de la medición de la tensión superficial, y suponiendo que nuestras cepas alcanzaron la CMC en etapas tempranas del crecimiento bacteriano, entonces no veremos diferencias significativas en los efectos del tiempo sobre la producción de biosurfactantes.

Reportes similares podemos verlos en los trabajos de Pathak y Keharia (2014), quienes utilizando un medio mínimo suplementado con glucosa, en un periodo de incubación de veinticuatro horas registraron los valores más bajos de la tensión superficial, y estos se mantuvieron constantes por un periodo de incubación de ciento veinte horas, que equivalen a cinco días. Solo pudieron hacer seguimiento al realizar diluciones durante la inoculación y luego la medición de la tensión superficial. Destacando que tras haber cumplido las cuarenta y ocho horas de inoculación se detectó una disminución en la concentración del biosurfactante, pero los registros de la tensión superficial se mantuvieron constantes. Lo cual corrobora que efectivamente no se requieren de altas concentraciones de biosurfactante para alcanzar la CMC. También se apreció un comportamiento similar en la actividad emulsificante, es decir, hasta las cuarenta y ocho horas fue incrementando junto con la concentración de biosurfactante y posteriormente comenzó a descender. Otros trabajos presentan resultados similares reportan bajos registros de la tensión superficial poco tiempo de iniciada la inoculación y se mantuvieron constantes en el tiempo. (Gunther y col., 2005; Oliveira y col., 2006; Suresh y col., 2007; Gholamreza y col., 2007; Sathe y col., 2012; Amani y col., 2013; Liang y col., 2014).

Para la producción de biosurfactantes, el uso de tiempos de producción prolongados es altamente dependiente de la fuente de carbono escogida, ya que de exceder el tiempo requerido para alcanzar una producción óptima de este compuesto, se corre el riesgo de que se agote tanto la fuente de carbono, como el nitrógeno y los lípidos, y esto a su vez puede llevar a que el biosurfactante cumpla con uno de sus roles dentro de la fisiología bacteriana, que es actuar como sustituto del

sustrato, siendo consumido por la bacteria y disminuyendo su concentración, como pudo haber ocurrido en este trabajo, en presencia de glucosa.

Sin embargo, no se puede decir lo mismo de los bioemulsificantes, ya que según los resultados en presencia de fuentes de carbono solubles estos requieren de un mayor tiempo de incubación para que su producción alcance una concentración suficientemente alta que permita observar cambios en la tensión superficial/interfacial. Si bien los bioemulsificantes no son conocidos por sus propiedades tensoactivas, podemos esperar ver cambios importantes en los valores de la tensión superficial/interfacial, ya que al igual que los biosurfactantes, estos bajo ciertas concentraciones son capaces de la formación de micelas, principales agentes responsables de estos cambios (All-Mulla, 2010; Liu y col., 2010). Además, sabemos que largos periodos de tiempo de incubación no afectaran la concentración de bioemulsificantes como ocurre en el caso de los biosurfactantes, ya que no se encontraron reportes de que los bioemulsificantes actúen como sustitutos energéticos, así que su concentración se mantendrá mas prolongada que la de los biosurfactantes.

7. Relación entre las pruebas

Para estudiar la posible relación que presentan las pruebas entre sí, de manera tal que se pueda armar un procedimiento eficiente en la detección de biosurfactantes/bioemulsificantes, se utilizaron dos índices de correlación: Índice de Pearson e Índice de Spearman. El índice de Pearson se modificó según Youssef y col., (2004), trabajando con los niveles de respuesta obtenidos de las pruebas, mientras que con el índice de Spearman se trabajó con la data cruda, como lo indica este tipo de análisis. Los resultados se presentan en forma de dendogramas en las figuras 27 y 28 respectivamente (Silva y col., 2015).

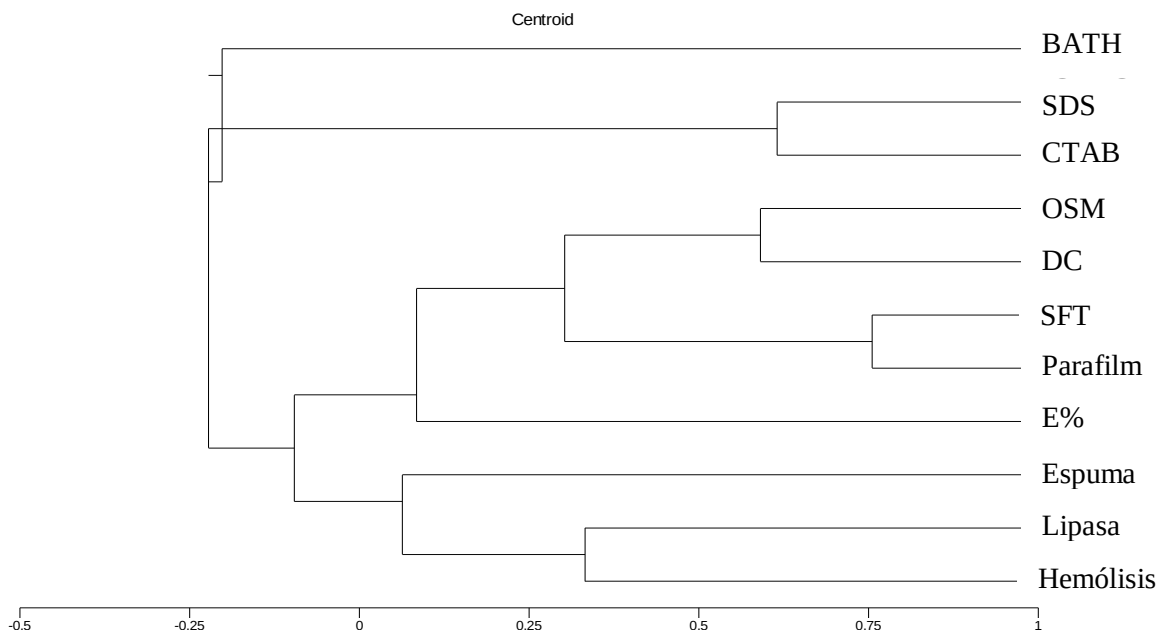


Figura 28. Dendrograma del índice de Pearson

En el índice de Pearson (Figura 28), se busca correlacionar los niveles de respuesta encontrados con el mayor nivel de respuesta en la tensión superficial (SFT), así mientras más cercano sea el valor 1, mayor será la correlación de las pruebas entre sí. Para desarrollar una metodología que pueda detectar cepas productoras de biosurfactantes con el menor error posible siempre se busca que su correlación con la SFT sea alta. Dicho esto, podemos ver que las pruebas con la mayor correlación con SFT son Parafilm ($r_s=0,755$), DC ($r_s=0,723$) y OSM ($0,598$). Las que presentaron una correlación intermedia son las pruebas de BATH ($r_s=0,465$), Actividad Hemolítica ($r_s= 0,305$) y producción de lipasa ($r_s=0,278$), las pruebas con una baja correlación son agar azul con CTAB ($r_s=0,131$) y la formación de Espuma ($0,165$). Finalmente, las pruebas que no presentan una correlación con la SFT son agar azul con SDS ($r_s=-0,077$) y la actividad emulsificante ($r_s=-0,150$).

Al analizar la correlación entre las pruebas vemos que estas no presentan altos niveles de correlación entre sí. Si partimos de la similitud encontrada por tensión superficial observamos que este grupo de pruebas, OSM y DC ($r_s=0,590$), son similares entre sí, lo que concuerda con otros investigadores (Youssef y col., 2004; Plaza y col., 2006), mientras que la prueba de Parafilm presenta

una mayor similitud con el método de DC ($r_s=0,688$), resultado esperado, pues ambas pruebas miden la misma propiedad de los biosurfactantes. La actividad emulsificante, a pesar de su relación intermedia con la tensión superficial, presentó una correlación negativa con todas las pruebas utilizadas. Esto puede deberse a que varios de los resultados dentro de este índice mostraron altos niveles de respuesta gracias a la estabilidad de las emulsiones en el tiempo.

Por otro lado, aquellas pruebas basadas en el comportamiento específico, tales como la producción de lipasas y sangre presentan una correlación similar con todas las otras pruebas, siendo la mayor relación registrada entre ellas mismas ($r_s=0,332$), mientras que las pruebas de agar azul son similares entre sí ($r_s=0,615$). Por último, la prueba de BATH y la de producción de espuma están fuera de todos los grupos, por lo tanto no presentan ninguna similitud con alguna de las pruebas, ya que en base a su grado de respuesta tienen una gran cantidad de resultados iguales a “cero” (Anexo I).

Ahora, si estudiamos la correlación de las pruebas con el SFT en el índice de Spearman (figura 29), el comportamiento es ligeramente distinto. A diferencia del índice de Pearson, en el índice de Spearman se busca una alta correlación negativa, ya que esto indica que a mayor respuesta en la prueba, menor será el valor de la tensión superficial. Es decir, hay un mayor efecto del biosurfactante sobre la tensión superficial y vemos que se mantiene una alta correlación negativa de la SFT. En los resultados se corrobora que las pruebas con la mayor correlación con la SFT son pruebas de DC ($q = -0,65$), Parafilm ($q = -0,551$) y OSM ($q = -0,512$), y se mantiene la correlación entre las mismas. También se corrobora el comportamiento de las pruebas de actividad hemolítica ($q = -0,302$), producción de lipasa ($q = -0,341$), prueba de agar azul CTAB/SDS ($q=0,11$ y $q=0,167$, respectivamente), y producción de espuma ($q=0,091$), tanto en su relación con la SFT, como en relación a las otras pruebas.

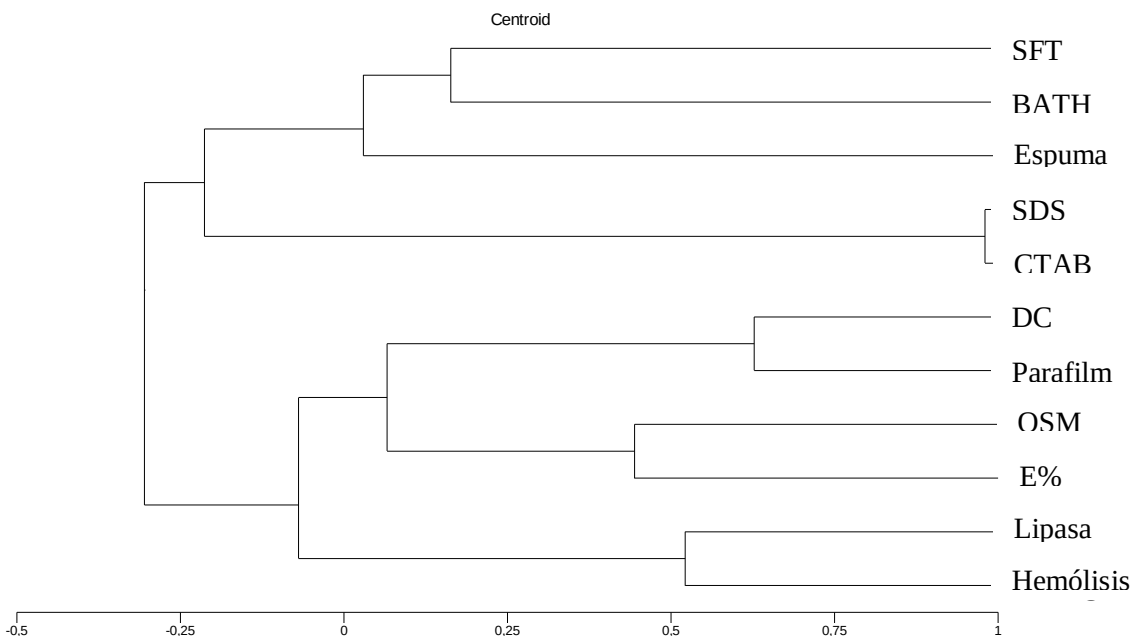


Figura 29. Dendrograma del índice de Spearman

La diferencia entre ambos índices empieza cuando vemos que entre las pruebas medianamente relacionadas con SFT tenemos la actividad emulsificante ($q = -0,361$), la cual previamente no presentaba ningún tipo de relación. Luego, entre las pruebas menos correlacionadas esta BATH, la cual según el índice de Pearson estaba considerada como medianamente relacionada, mientras que aquí presenta una baja correlación ($q = 0,163$).

La diferencia de estos resultados, podría deberse a que al trabajar con la data transformada, como se hizo en el análisis de Pearson, se pierde mucha información relevante que puede afectar los resultados. Por ejemplo, si vamos a la tabla de resultados de BATH (Anexo I), veremos que hay cepas que presentan resultados negativos en el índice de hidrofobicidad. Esto más que un error es un comportamiento típico que se observa en la prueba como señalan Sweet y col., (1987), quienes sugieren que si pequeñas cantidades de hidrocarburo se adhieren a las bacterias, estas no se removerán de la solución acuosa y como resultado quedarán gotas del hidrocarburo suspendidas en las mismas. Como consecuencia de ello, la absorbancia será mayor a la registrada inicialmente, debido a un aumento en el índice de refracción por las células recubiertas por el hidrocarburo (Sweet y col., 1987).

Sin embargo, ya que nunca se estableció un nivel de respuesta para valores negativos, simplemente se asignó una respuesta negativa. En cambio con el índice de Spearman fue posible trabajar con la data tanto cualitativa como cuantitativa y por ello se pudo correlacionar mejor los resultados con los valores de SFT, indicando así que la prueba de BATH no es idónea para la detección de cepas productoras de biosurfactantes, como lo señalan otros autores (Van der Vegt y col., 1991).

Otra resultado distintivo en el índice de Spearman es la correlación entre OSM y E% ($r=0,444$), quienes a su vez están dentro del nódulo de DC y Parafilm, pero tienen una menor correlación con la SFT, lo cual concuerda con lo reportado por Velioglu y Urek (2014). Todas estas pruebas presentaron una correlación negativa con la SFT, lo cual es lo deseado. Adicionalmente, las pruebas de producción de espuma y BATH presentan una ligera correlación entre ellas, posiblemente porque la producción de espuma tiene relación con la hidrofobicidad bacteriana (Mnif y Ghribi, 2015b), mientras que SDS y CTAB siempre presentarán una alta correlación entre sí, ya que ambas se basan en el mismo fundamento.

Dicho esto, podemos encontrar cierta similitud entre ambos índices, indicando que el comportamiento de las pruebas es muy similar, con alguna excepción. Básicamente tenemos que las pruebas con mayor similitud con la SFT son la prueba de Parafilm y DC, seguidas de OSM. Esto contradice lo reportado por Youssef y col., (2004), Velioglu y Urek (2014), quienes indican que la prueba de mayor similitud con la disminución de la tensión superficial es OSM y la segunda es DC, pero solo refiriéndose a biosurfactantes. En el trabajo de Batista y col., (2006), indican que el método de DC es mucho más efectivo en la detección de bioemulsificantes que de biosurfactantes, lo cual coincide con los resultados de este trabajo y por ello esta correlación tiene sentido. Sin embargo, la prueba de OSM brinda mucha información que ayudó en la discusión de varios resultados, así que a pesar de que en esta ocasión no mostró una alta correlación con la SFT, su aporte al trabajo fue importante.

Otro grupo de pruebas que tienen similitud entre ambos índices en la correlación con la SFT, son la actividad hemolítica y la producción de lipasa, que si bien presentan una serie de desventajas por la complejidad del medio y por lo impreciso de sus resultados en relación a los cambios en la tensión superficial, de acuerdo a este trabajo, serían idóneas para la identificación de bioemulsificantes, por los cambios generados a nivel interfacial.

Seguidamente tenemos las bajas correlaciones encontradas entre el agar azul (tanto CTAB como SDS), y la formación de espuma. Tomando en cuenta que la prueba de agar azul está diseñada para la detección de grupos específicos de biosurfactantes con carga, más no para aquellos de carga neutra, como es el caso de varios bioemulsificantes, como el emulsán, y además, por los componentes presentes en el agar, el desarrollo de varios microorganismos es inhibido y limita la capacidad de detección (Siegmund y Wagner, 1991), y por ello no presenta una buena correlación. Además, la producción de espuma no presentó una alta correlación con la SFT, ya que la formación de emulsiones puede interferir con la medición de la tensión superficial, aunque también puede deberse a una serie de factores a considerar para la formación de emulsiones estables durante la inoculación, (Rashedi y col., 2005).

En relación a la actividad emulsificante, vemos que el índice de Pearson concuerda con la información proporcionada por la bibliografía, ya que como se ha comentado antes la capacidad de producir emulsificantes no necesariamente está relacionada con la capacidad de disminuir la tensión superficial (Plaza y col., 2006; Suresh y col., 2007; Varjani y col., 2014; Velioglu y Urek 2014). Sin embargo, cuando vemos el nivel de correlación de la actividad emulsificante con SFT en el índice de Spearman, notamos que este muestra una correlación negativa intermedia ($r_s = -0,361$), y contradice lo reportado por el índice de Pearson, y sabiendo que se pierde mucha información al trabajar con niveles de respuesta esta correlación negativa es mucho más confiable que la presentada por Pearson. Eso aunado al hecho de que estamos en presencia de un gran número de cepas productoras de bioemulsificantes puede ser la razón por la cual se presenta esta correlación, más aún, se sabe que

para la formación de emulsiones estables en el tiempo no se requiere de una concentración alta de surfactantes, solo la necesaria para tener la energía suficiente para la formación de la espuma, y esta es una característica particular de los bioemulsificantes.

La correlación encontrada bajo ambos índices utilizados en todas las pruebas es el indicador de una población productora de bioemulsificantes, la cual se destaca por sus altas propiedades de cambios a nivel interfacial (detección por pruebas de DC, Parafilm y OSM), y producción de compuestos emulsificantes a bajas concentraciones (E%). Adicionalmente, la mayoría de estos compuestos no presentan carga iónica (Agar Azul), y sus bacterias productoras son capaces de producir compuestos cuyas propiedades surfactantes y composición química generan respuestas en medios de cultivos sensibles a los cambios a nivel interfacial (Actividad Hemolítica y Producción de Lipasa). Finalmente, la capacidad de adherirse a hidrocarburos y la producción de agentes espumosos (prueba de BATH y producción de Espuma) solo se presenta en etapas tempranas de la producción de estos compuestos, ya que estas propiedades son indicios del inicio de la aparición de los compuestos en la membrana bacteriana y su posterior unión a la fuente de carbono. Sin embargo, una vez en el medio extracelular estas propiedades perderán su relación con la producción de biosurfactantes. Por otro lado, ambos métodos pueden utilizarse para la diferenciación de biosurfactantes y bioemulsificantes (Maneerat y Dikit 2007; Satpute y col., 2008; Uzoigwe y col., 2015).

Con base en los resultados obtenidos en las pruebas anteriores, se plantea el siguiente flujograma para la determinación de cepas con el potencial de producción y la diferenciación entre biosurfactantes y bioemulsificantes.

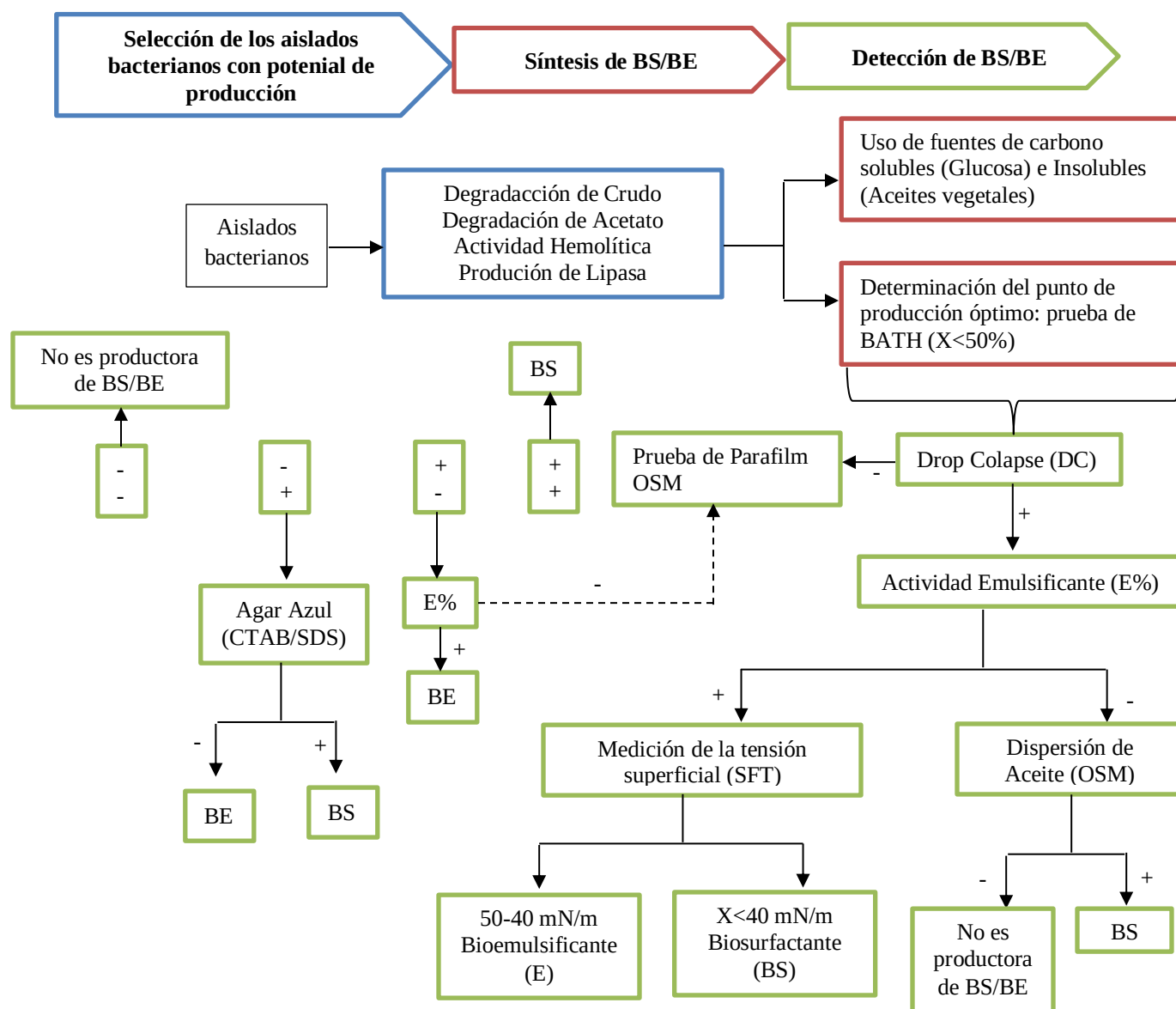


Figura 30. Flujograma de los pasos a seguir en la detección y diferenciación de las cepas productoras de biosurfactantes y bioemulsificantes

La selección preliminar se basa en que todas las cepas productoras de biosurfactantes son hidrocarburoclásticas, mientras que la degradación de aceto es el indicador de producción de bioemulsificantes. Las pruebas de actividad hemolítica y producción de lipasa, detectan cambios a nivel interfacial, y pueden utilizarse como selección preliminar, en base a los análisis de correlación y también por la ventaja que presentan al no requerir de inoculación previa y porque pueden medir de

manera simultanea una gran variedad de microorganismos, ayudan en la selección de las cepas productoras de biosurfactante.

En las condiciones de producción se deben tener dos fuentes de carbono, ya que la producción de biosurfactantes es mayor en presencia de fuentes de carbono solubles, mientras que los bioemulsificantes prefieren fuentes de carbono insolubles para su producción. Adicionalmente, se debe utilizar una prueba sensible a la concentración del biosurfactante en el medio extracelular para determinar el punto de producción óptimo en el tiempo. Seleccionamos la prueba de BATH, ya que está altamente relacionada con la etapa de crecimiento de los microorganismos (Rosenberg, 1984; Ron y Rosenberg 1985; Rosenberg, 2006), y puede explicarse de la siguiente manera:

Es sabido que la capacidad de adherencia de la bacterias a las moléculas de la fuente de carbono se enfoca en como las cepas producen biosurfactantes y éstos se unen a la membrana bacteriana aumentando así la hidrofobicidad de la misma. Sin embargo, tras cierto tiempo ocurren dos fenómenos dentro de los microorganismos: el primero es que la fuente de carbono queda “agotada” y el microorganismo se libera de la molécula para buscar otra, y para ello libera la molécula de biosurfactante, lo cual lleva al segundo fenómeno que es el aumento de la concentración a nivel extracelular del biosurfactante, generando emulsiones que ayudan a mejorar la biodisponibilidad del sustrato (Ron y Rosenberg, 1985; Perfumo y col., 2010; Uzoigwe y col., 2015). Este efecto produce un cambio en la concentración de biosurfactante en el medio, lo cual a su vez disminuye la capacidad de adherencia de los microorganismos en el tiempo.

Finalmente, al llegar a los métodos de detección, diferenciaremos los biosurfactantes de los bioemulsificantes utilizando los métodos de cambios a nivel interfacial. Comenzaremos con DC, que detecta tanto cepas productoras de biosurfactantes como de bioemulsificantes. De ser positiva esta prueba, se debe hacer la distinción entre biosurfactantes y bioemulsificantes. De ser negativa, usaremos pruebas más sensibles a los cambios a las concentraciones de los biosurfactantes para asegurar que los mismos están o no presentes en la solución. Se diferencian los biosurfactantes de los

bioemulsificantes de dos formas: por su actividad emulsificante (E%) y por capacidad dispersante (OSM). Adicionalmente caracterizaremos el biosurfactante mediante el método de Agar azul, que es capaz de detectar los biosurfactantes por su carga iónica, y permite también diferenciarlos de los bioemulsificantes. Otra ventaja del agar azul es que permite poder determinar el posible uso en la biorremediación del biosurfactante, ya que algunos de los mejores compuestos tensoactivos utilizados en esta área presentan una carga positiva correspondiente al grupo hidrofílico, la cual, al disociarse, ayuda en la unión con los hidrocarburos y aumenta su solubilidad, al igual que los agentes surfactantes sintéticos.

En base a este comportamiento podemos concluir que estas muestras de suelo de la fosa petrolera Fosa Meteorizada del bloque Junín FPO, son ricas en microorganismos productores de bioemulsificantes, y algunos biosurfactantes. Esto es respaldado por numerosos reportes que indican la presencia constante de bioemulsificantes en muestras de suelo impactado por hidrocarburos, ya que estos compuestos son mucho más ventajosos para bacterias hidrocarburoclásticas (Ron y Ronsenberg, 2002).

VII. Conclusiones

- La fuente de carbono afecta tanto la producción de biosurfactantes como la estructura de los mismos, así como el tiempo de incubación requerido para generar dichos agentes tensoactivos.
- El tiempo de producción requerido de estos agentes tensoactivos varia entre los biosurfactantes y bioemulsificantes.
- La combinación de los métodos cualitativos con el método cuantitativo permitió la detección y diferenciación entre los bioemulsificantes y los biosurfactantes.
- Se comprobó que la actividad antimicrobiana puede utilizarse como mecanismo de identificación de los biosurfactantes. Algunas de las pruebas cualitativas también pueden utilizarse para la identificación de los biosurfactantes.

VIII. Recomendaciones

- Ampliar el estudio de distintas fuentes de carbono con un seguimiento constante en el tiempo.
- Incluir en el estudio de los biosurfactantes, la relación de otros factores que afectan la producción de biosurfactantes, como lo son la temperatura, el pH, las concentraciones de otros elementos como el nitrógeno.
- Hacer un seguimiento en el tiempo de la producción de los biosurfactantes, mediante metodologías sensibles a los cambios de la concentración de estos compuestos en el medio extracelular, ya que cuando se excede el tiempo de producción, se corre el riesgo de que los mismos sean degradados por los microorganismos.
- Incluir otros mecanismos de detección e identificación de biosurfactantes. Se debe ampliar el estudio de distintas fuentes de carbono con un seguimiento constante en el tiempo.

IX. Bibliografía

- A1-Mallah M., Goutx M., Mille G. y Bertrand J. (1990). Production of Emulsifying Agents during Growth of a Marine *Alteromonas* in Sea Water with Eicosane as Carbon Source, a Solid Hydrocarbon. *Oil Chem Pollut.* 6: 289-305.
- Abdel-Mawgoud A., Aboulwafa M. y Hassouna N. (2008). Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. *Appl Biochem Biotechnol.* 150:305–325.
- Afshar S, Lotfabad TB, Roostaazad R, Najafabadi AR, Noghabi AK (2008). Comparative approach for detection of biosurfactant-producing bacteria isolated from Ahvaz petroleum excavation areas in south of Iran. *Ann Microbiol.* 58: 555-560.
- Aguilar, Maricell y Martínez (2014). Obtención de un biosurfactante para el recobro mejorado de petróleo. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.
- Alcantara V. A., Pajares I.G., Simbahan J.F. y Maranan M. C. (2012). Functional properties and potential industrial applications of a bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* 2031. *JEE*. The 2012 International Conference on Green Technology and Sustainable Development. (GTSD2012). <http://www.engh.kuas.edu.tw/files/ne/wzy3w7erwf.pdf> (Visitado el 27 de mayo de 2015).
- Ali S.R., Chowdhury B.R., Mondal P., and Rajak S. (2013). Screening and Characterization of Biosurfactants Producing Microorganism from Natural Environment (Whey Spilled Soil). *J. of Natural Sci.* (13): 53-59
- Al-Mulla, Entissar Faroun (2010). Production and Characterization of Bioemulsifier from Locally Isolated *Serratia marcescens* S10. Tesis de Maestria. Universidad de Baghdad. Baghdad, Iraq.
- Al-Sayegh A., Al-Wahaibi Y., Al-Bahry S., Elshafie A., Al-Bemani A. y Joshi S. (2015). Microbial enhanced heavy crude oil recovery through biodegradation using bacterial isolates from an Omani oil field. *Microb Cell Fact.* 14(141): 1-11.
- Amani H., Mehrnia M., Sarrafzadeh M., Haghighi M., y Soudi M. (2010). Scale up and Application of Biosurfactant from *Bacillus subtilis* in Enhanced Oil Recovery. *Appl Biochem Biotechnol.* 162:510–523.
- Amani H., Müller M., Syldatk C. y Hausmann R. (2013). Production of Microbial Rhamnolipid by *Pseudomonas Aeruginosa* MM1011 for Ex Situ Enhanced Oil Recovery. *Appl Biochem Biotechnol.* 170:1080–1093.
- Anandaraj B., Thivakaran P. (2010) Isolation and production of biosurfactant producing organism from oil spilled soil. *jBiosci Tech*, Vol 1 (3), 120-126
- Angulo N., Araujo I., Cárdenas C., Gómez A., Barrera M., Morillo G. y Saules L. Aislamiento de cepas bacterianas productoras de biosurfactantes recuperando aguas contaminadas con hidrocarburos [En línea]. (Visitado el 30 de junio de 2016). Disponible en: www.bvsde.paho.org/bvsaidis/uruguay30/VE10169_Angulo.pdf

- Arashiro E. Y. y Demarquette N. R. (1999). Use of the Pendant Drop Method to Measure Interfacial Tension between Molten Polymers. *JMR*. 2(1):23-32.
- Araujo I., Gómez A., Barrera M., Angulo N., Morillo G., Cárdenas C. y herrera L. (2008). Surfactantes biológicos en la biorremediación de aguas contaminadas con crudo liviano. *Interciencia*. 33(4):245-250.
- Arellano, Taymara (2008). Manejo integral de fosas de hidrocarburos generadas por la actividad petrolera venezolana. Tesis de Magister. Universidad Nacional Experimental Politécnica de la Fuerza Armada Nacional. Caracas, Venezuela.
- Arenahalli A. N. y Prapulla S. G. (2013). Evaluation and Functional Characterization of a Biosurfactant Produced by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194. *Appl Biochem Biotechnol*. 172(4):1777-1789.
- Bagheri T., Shourian M., Roostaazad R., Rouholamini A., Reza M y Akbari K. (2009). An Efficient Biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, Isolated from Oil Excavation Area in South of Iran. *Colloids and surfaces B: Biointerfices*. 1-11.
- Bahrya S., Elshafiea A., Al-Wahaibib Y., Al-Bemanib A., Joshia S. y Al-Lawatia A. (2013). Isolation and characterization of biosurfactant/biopolymer producing spore forming bacteria from oil contaminated sites and oil field of Oman. *APCBEEES*. 242-246.
- Barkay T., Navon-Venezia S., Ron E.Z., Rosenberg E. (1999) Enhacement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. *Appl. Environ. Microbiol*. 65, 2697–2702.
- Ballot F. (2009). Bacterial Production of Antimicrobial Biosurfactants. Tesis de Maestria. Universidad de Stellenbosch. Stellenbosch, Sudáfrica.
- Banat I.M. (1993). The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. *Biotechnol Lett*. 15: 591-594.
- Banat I.M., Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, et al. (2010) Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 87: 427-444.
- Barin R., Talebi M., Biria D. y M. Beheshti (2014). Fast bioremediation of petroleum-contaminated soils by a consortium of biosurfactant/bioemulsifier producing bacteria. *Int. J. Environ. Sci. Technol*. 11: 1701.
- Barrios, A. (2011). Caracterización funcional de la comunidad bacteriana cultivable aislada del suelo de la zona de descargar de la fosa petrolera Bare. 9. San Tomé. Edo. Anzoategui. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Bastardo, H. (1996). Cinética de crecimiento bacteriano, Producción de surfactantes y biodegradación de crudos pesados. Proyecto 03-31-2947-94 de CDCH de la Universidad Central de Venezuela y la Gerencia de Protección Ambiental de CORPOVEN. San Tomé Venezuela.

- Batista S.B., Mounteer A.H., Amorim F.R. y Tótolá M.R. (2006). Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresour. Technol.* 97, 868-875.
- Bernheimer A.W. y Avigad L.S. (1970). Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 61: 361–369.
- Bharali P. y Konwar B. K. (2011). Production and Physico-chemical Characterization of a Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* OBP1 Isolated from Petroleum Sludge. *Appl Biochem Biotechnol.* 164:1444–1460.
- Bodour, A. y Miller-Maier, R. (1998). Application of a modified drop collapse technique for surfactant quantification and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Meth.* 32: 273-280.
- Bodour A., Drees K.P. y Miller-Maier R. (2003) Distribution of biosurfactant- producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Appl Environ Microbiol.* 69: 3280-3287.
- Bodour A., Guerrero-Barajas C., Jiorle B. V., Malcomson M. E., Paull A. K., Somogyi A., Trinh L. N., Bates R. B. y Maier R. M. (2004). Structure and Characterization of Flavolipids, a Novel Class of Biosurfactants Produced by *Flavobacterium* sp. Strain MTN11. *Appl Environ Microb.* 70(1):114–120.
- Bognolo, G. (1999). Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 152, 41-52.
- Bonilla M., Olivaro C., Corona M., Vazquez A. y Soubes M. (2005). Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. *J Appl Microbiol.* 98:456–463.
- Bordoloi N.K. y Konwar B.K. (2008). Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. *Colloid Surf. B* 63:73–82.
- Bouchez-Naitali M., Rakatozafy H., Marchal R., Leveau J. Y. y Vandecasteele J. P. (1999). Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *J Appl Microbiol.* 86:421–42.
- Bozo-Hurtado L., Rocha C. A., Malave R. y Suarez P. (2012). Biosurfactant Production by Marine Bacterial Isolates from the Venezuelan Atlantic Front. *Bull Environ Contam Toxicol.* 89:1068–1072.
- Cameotra S. S. and Makkar R. S. (1998), Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 520 – 529.
- Cameotra, S.S., Makkar, R.S., Kaur J. y Mehta, S.K. (2010). Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. *Adv Exp Med Biol.* 672, 261-280.
- Carrillo, P.G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S.J., Giulietti, A.M. (1996). Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 82– 84.
- Cha, D.K., (2000). The effect of biosurfactants on the fate and transport of nonpolar organic contaminants in porous media. *Environ. Eng.* 1–17, 20.

- Chakraborty J., Chakrabarti S. y Das S. (2014). Characterization and Antimicrobial Properties of Lipopeptide Biosurfactants Produced by *Bacillus subtilis* SJ301 and *Bacillus vallismortis* JB201. *Appl Biochem Micro+*. 50(6): 609–618.
- Chen C.-Y., Baker S.C. y Darton R.C. (2007). The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *J Microbiol Methods*. 70:503–510.
- Chikere C.B., Okpokwasili G. C. y Chikere B. O. (2011). Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *3 Biotech*. 1(3):117–138.
- Chirinos I., Larreal M. y Díaz J. (2010). Biorremediación de lodos petroquímicos mediante el uso de la biota microbiana autóctona en un oxisol del municipio Lagunillas del estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*. 10(1):133-140.
- Christofi, N. y Ivshina, I. (2002). Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J. Appl. Microbiol*. 93, 915-929.
- Christovaa N., Tuleva B., Lalchev Z., Jordanova A. y Jordanovd B. (2004). Rhamnolipid Biosurfactants Produced by *Renibacterium salmoninarum* 27BN During Growth on n-Hexadecane. *Z Naturforsch C*. 59(1-2):70-4.
- Claudia Isabel Sáenz-Marta C., María de Lourdes Ballinas-Casarrubias M., Blanca E. Rivera-Chavira B. y Nevárez-Moorillón G. (2015). Biosurfactants as Useful Tools in Bioremediation. *InTech*. Doi: 10.5772/60751. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/advances-in-bioremediation-of-wastewater-and-polluted-soil/biosurfactants-as-useful-tools-in-bioremediation>
- Colla L. M., Rizzardi J., Pinto M.H., Reinehr C.O., Bertolin T. E. y Costa J. A. (2010). Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresource Technol*. 101:8308–8314.
- Cooper D. y Goldenberg B. (1987). Surface-active agents from 2 *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol*. 53(2):224–229.
- Daniele A., Tapizquent M., Valbuena O., Contreras L. y Wilkesman J. (2010). Caracterización de una actividad lipasa termoestable alcalina excretada por *Anoxybacillus* sp. *Ciencia*. 18 (2): 100-107.
- Das K. y Mukherjee A.K. (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technol*. 98:1339–1345.
- Deepa R., Vidhya A. y Arunadevi S. (2015). Screening of Bioemulsifier and Biosurfactant Producing *Streptomyces* from Different Soil Samples and testing its Heavy metal Resistance Activity. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. 4(5): 687-694
- Deepansh S. y Baljeet S. (2014). Simultaneous Production of Biosurfactants and Bacteriocins by Probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. *Int J Microbiol*. 1-7.
- Desai, J.D. y Banat, I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 61, 47-64.

- Eddouaouda K., Mnif S., Badis A., Younes S. B., Cherif S., Ferhat S., Mhiri N., Chamkha M. y Sayadi S. (2011). Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation. *J Basic Microb.* 52:408–418.
- Entissar F. y Ahmed A. (2010). Production and Characterization of Bioemulsifier from Locally Isolated *Serratia marcescens* S10. Tesis de Maestria. Universidad de Baghdad. Baghdad, Iraq.
- Farfán, Maria Lourdes. (2008). Evaluación del Efecto de la Relación Carbono Nitrógeno y el Nivel de Oxígeno Disuelto sobre la Producción de Biosurfactantes a partir de *Bacillus subtilis*. Tesis de Maestria. Instituto Politécnico Nacional de Tlaxcala. Tlaxcala, Mexico.
- Fiechter, A. (1992). Biosurfactants: moving towards industrial application. *Tibtech* 10, 208-217.
- Fracchia L., Cavallo M., Martinotti M.G. y Banat I.M. (2012). Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications – Present Status and Future Potentials. *SCIRP*. (Visitado el 17 de junio de 2015) Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/biomedical-science-engineering-and-technology/biosurfactants-and-bioemulsifiers-biomedical-and-related-applications-present-status-and-future-pote>
- Franzetti A., Bestetti G., Caredda P., Colla La P. y Tamburini E. (2008). Surface-active compounds and their role in the access to hydrocarbons in *Gordonia* strains. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63:238–248.
- Franzetti A., Caredda P., Ruggeri C., Colla La P., Tamburini E., Papacchini M. y Bestetti G. (2009). Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. *Chemosphere*. 75:801–807.
- Gandhimathi R., Seghal Kiran G., Hema T.A., Selvin J., Rajeetha Raviji T. y Shanmughapriya S. (2009). Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardiopsis alba* MSA10. *Bioproc Biosyst Eng.* 32: 825-835.
- Gaspar B., R. J. (2009) Estudio de las comunidades bacterianas asociadas a suelos contaminados con crudo y su aplicación en biorremediación. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Gautam, K.K. y Tyagi, V.K. (2006). A Review of Microbial Surfactan. *J Oleo Sci.* 55(4), 155-166.
- Georgiou G, Lin S.C. y Sharma M.M. (1992) Surface-active compounds from microorganisms. *Biotechnology*. 10(1):60-65.
- Gholamreza D. N., Mohammad H. M., Payam K. y Farideh A. (2007). Studies on Bioemulsifier Production by *Bacillus licheniformis* PTCC 1595. *Am. J. Pharm. & Toxicol.* 2 (4): 164-169.
- Gudiña E. J., Pereira J. F., Costa R., Evtuguin D.V., Coutinho J. A., Teixeira J. A. y Rodrigues L. R. (2015). Novel bioemulsifier produced by a *Paenibacillus* strain isolated from crude oil. *Microb Cell Fact.* 14(14):1-11.
- Gunther IV N. W., Núñez A., Fett W. y Solaiman D. K. (2005). Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a Nonpathogenic Bacterium. *Appl Environ Microbiol.* 71(5):2288-2293.
- Haddadin M.S., Arqoub A.A., Reesh I.A. y Haddadin J. (2009). Kinetics of hydrocarbon extraction from oil shale using biosurfactant producing bacteria. *Energ. Convers. Manage.* 50:983–990.

- Hajfarajollah H., Mokhtarani B. y Noghabi K. (2014). Newly Antibacterial and Antiadhesive Lipopeptide Biosurfactant Secreted by a Probiotic Strain, *Propionibacterium Freudenreichii*. *Appl Biochem Biotechnol*. 174:2725–2740.
- Hamzah A., Sabturani N., y Dariman S. (2013). Screening and Optimization of Biosurfactant Production by the Hydrocarbon-degrading Bacteria. *S. Malaysiana*. 42(5): 615–623.
- Hassan M., Essam T., Yassin A.S. y Salama A. (2014). Screening of Bio-Surfactant Production Ability among Organic Pollutants Degrading Isolates Collected From Egyptian Environment. *J. Microb Biochem Technol*. 6(4): 195-201.
- Hernandez, A. (1999). Producción de Biosurfactantes a partir de Sustratos, Utilizando un Grupo Funcional Bacteriano. Tesis de licenciatura. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela
- Hewald S., Josephs K. y Boßker M. (2005). Genetic Analysis of Biosurfactant Production in *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microbiol*. 71(6): 3033–3040.
- Holt, J. (2000). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams y Wilkins, Novena Edición, Baltimore, Maryland, USA.
- Hou N., Li D., Ma F., Zhang J., Xu Y., Wang J. y Li C. (2013). Effective biodemulsifier components secreted by *Bacillus mojavensis* XH-1 and analysis of the demulsification process. *Biodegradation*. 25(4):529-41
- House J. A. (2008). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in Kansas oil fields for use in tertiary oil recovery. *Cantaurus*. 6:4-6.
- Iqbal S., Khalid Z.M. y Malik K.A. (1995). Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett. Appl. Microbiol*. 21, 176–179.
- Jagtap S., Yavankar S., Pardesi K. y Chopade B. (2010). Production of bioemulsifier by *Acinetobacter* species isolated from healthy human skin. *Indian J. of Exp Biol*. 48: 70-76.
- Jain D, Collins-Thompson D y Lee H. (1991). A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Methods*. 13(4): 271–279.
- Jinfeng L., Lijun M., Bozhong M., Rulin L., Fangtian N. y Jiayi Z. (2005). The field pilot of microbial enhanced oil recovery in a high temperature petroleum reservoir. *J. Petrol. Sci. Eng*. 48:265–271.
- Jing-Liang L. y Bing-Hung C. (2009). Surfactant-mediated Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Materials*. 2: 76-94 (Visitado el 22 de abril de 2015). Disponible en la web: www.mdpi.com/journal/materials
- Johny J. (2013) Screening, Gene Sequencing and Biosurfactant Production from *Pichia* Fermentans Isolated From Dairy Effluents. *IOSR-JESTFT*. 6(5): 4-13
- Joseph P.J. y Joseph A. (2009). Microbial enhanced separation of oil from a petroleum refinery sludge. *J. Hazard. Mater*. 161:522–525.
- Kalpana B., Gautham S. N. y Narayana H. (2012). Lipase Production from Waste Engine Oil Using Microbial Strains. *IJB*. 1(1):1-6.

- Kalyani A.L., Naga Sireesha G, Aditya A.K. y Girija S.G. (2014a). Isolation and Antimicrobial activity of rhamnolipid (biosurfactant) from oil-contaminated soil sample using humic-acid salts-vitamin agar. *IJRET*. 3(5) 357-360.
- Kalyani A.L., Naga S. G., Girija S. G. y Prabhakar T. (2014b). Isolation, Identification and Antimicrobial activity of Bio-surfactant from *Streptomyces matensis* (PLS-1). *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 25(1): 165-170
- Kalyani A.L., Naga S. G, Aditya A.K., Girija S. G. y Prabhakar T. (2014c) Production Optimization of Rhamnolipid Biosurfactant by *Streptomyces coelicoflavus* (NBRC 15399^T) using Plackett-Burman design. *European J. of Biotec. and Biosci.* 1(5): 07-13. (Visitado el 07 de junio de 2015). Disponible en la web: www.biotechjournal.info
- Kang S.W., Kim Y.B., Shin J.D. y Kim E.K. (2010). Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial biosurfactant, sophorolipid. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160:780–790.
- Karanth, N.G., Deo, P.G. and Veenanadig, N.K., (1999). Microbial production of biosurfactant and their importance. *Ferment. Sci. Technol.* 77, 116–126.
- Kermanshahi R., y Peymanfar S. (2012). Isolation and Identification of *Lactobacilli* from Cheese, Yoghurt and Silage by 16S rDNA Gene and Study of Bacteriocin and Biosurfactant Production. *Jundishapur J Microbiol.* 5(4):528-532.
- Kiyohara, H. Nagao, K. Yano, K. (1982). Rapid screen for bacteria degrading water–insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Appl. Environm. Microbiol.* 43, 454–457.
- Kokare C. R., Kadam S. S., Mahadik K. R. y Chopade B. A. (2007). Studies on bioemulsifier production from marine *Streptomyces* sp. S1. *Indian J Biotechnol.* 6:78-84.
- Koneman, Winn, Allen, Janda, Procop, Schreckenberger y Woods. 2008 Diagnostico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. Sexta Edición. Buenos Aires, Argentina.
- Kosaric N, Cairns WL, Gray NCC (1983). Microbial emulsifiers and de emulsifiers. *Rehm HJ, Reed G. Biotechnology.* 3: 575-592
- Kosaric, N. (2001). Biosurfactants for soil Bioremediation. *Food Technol. Biotechnol.* 39:295-304.
- Krepsky N., Da Silva F.S., Fontana L.F. y Crapez, M.A. (2007). Alternative methodology for isolation of biosurfactant producing bacteria. *Braz. J. Biol.* 67, 117-124.
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Pickford, R., Derrick, J.P., Lamers, G.E., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J. y col. (2004). Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol Microbiol* 51, 97–113.
- Kumar M., Leon V., Materano A de S., Ilzins O. A., Galindo-Castro I. y Fuenmayor S. L. (2006a). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by Biosurfactant-Producing *Pseudomonas* sp. IR1. *Z. Naturforsch.* 61:203:212.
- Kumar M., Leon V., Materano A. de S. y Ilzins O.A. (2006b). Enhancement of oil degradation by co-culture of hydrocarbon degrading and biosurfactant producing bacteria. *Pol J Microbiol.* 55(2):139-46.

- Kumar A. S., Mody K. y Jha B. (2007). Evaluation of Biosurfactant/Bioemulsifier Production by a Marine Bacterium. *Bull Environ Contam Toxicol*. 79:617–621.
- Kumar M., Leon V., Materano A de S. y Ilzins O. A. (2007). A halotolerant and thermotolerant *Bacillus* sp. degrades hydrocarbons and produces tensio-active emulsifying agent. *World J Microbiol Biotechnol*. 23:211–220.
- Kumar M., Leon V., Materano A.S., Ilzins O. A. y Luis L. (2008). Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp. *World J Microbiol Biotechnol*. 24:1047–1057.
- Lai C.C., Huang, Y.C., Wei Y.H. y Chang J.S. (2009). Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 167:609–614.
- Lakshmi P. J. (2013). Biodegradation of Diesel by *Aeromonashydrophila*. *IJPSI*. 2(4):24-36.
- Lakshmipathy D., Prasad A.S. y Kannabiran K. (2010). Production of Biosurfactant and Heavy Metal Resistance Activity of *Streptomyces* Sp. VITDDK3-a Novel Halo Tolerant Actinomycetes Isolated from Saltpan Soil. *Advan. Biol. Res.* 4(2):108-115.
- Ławniczak Ł., Marecik R, y Chrzanowski Ł. (2013). Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 97:2327–2339.
- León, Y. (2008). Caracterización Funcional y Molecular De Una Comunidad Bacteriana Asociada A Rípios Base Agua Impregnado En Crudo Pesado Con Énfasis En El Potencial De Producción De 71 Biosurfactantes. Tesis de Licenciatura. Universidad Central De Venezuela Caracas, Venezuela.
- León Y., De Sisto A., Inojosa Y., Malaver N., y Naranjo-Briceño, L. (2009). Identificación de biocatalizadores potenciales para la remediación de desechos petrolizados de la Faja Petrolífera del Orinoco. (*RET*). 1(2): 12-25.
- Li J. y Chen B. (2009). Surfactant-mediated Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Materials*. 2:76-94.
- Liang T., Wu C., Cheng W., Chen Y., Wang C., Wang I. y Wang S. (2014). Exopolysaccharides and Antimicrobial Biosurfactants Produced by *Paenibacillus macerans* TKU029. *Appl Biochem Biotechnol*. 172:933–950.
- Liu J., Chen Y., y Jia Y. (2013). Screening and Evaluation of Biosurfactant-Producing Strains Isolated from Oilfield Wastewater. *Indian J Microbiol*. 53(2):168–174.
- Liu W., Luo Yo., Teng Y., Li Z. y Ma L. (2010). Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes. *Environ Geochem Health*. 32:23–29.
- Lopes E. M., Castellane T. C., Moretto C., Lemos E. G. y Souza J. A (2014). Emulsification Properties of Bioemulsifiers Produced by Wild-Type and Mutant *Bradyrhizobium elkanii* Strains. *J Bioremed Biodeg*. 5(6):1-6.
- Lotfabad T. B., Shahcheraghi F. y Shooraj F. (2013). Assessment of Antibacterial Capability of Rhamnolipids Produced by Two Indigenous *Pseudomonas aeruginosa* Strains. *Jundishapur J Microbiol*. 6(1): 29-35.

- Makkar R. S., Cameotra S. S. y Banat I. M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*. 1(5):1-19.
- Maneerat S. y Dikit P. (2007). Characterization of cell-associated bioemulsifier from *Myroides* sp. SM1, a marine bacterium. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 29(3): 769-779.
- Marchant R. y Banat I. M. (2012). Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnol Lett.* 34:1597–1605.
- Mariashobana A., Nalini K., y Thangapandian V. (2014). Studies on Biosurfactants Produced by Hydrocarbon Degrading Bacteria. *J. of Advanced Botany and Zoology*. 2(2): 1-6
- Martinez-Checa F., Toledo F.L., Mabrouki K. E., Quesada E. y Calvo C. (2007). Characteristics of bioemulsiWer V2-7 synthesized in culture media added of hydrocarbons: Chemical composition, emulsifying activity and rheological properties. *Bioresour. Technol.* 98 3130-3135.
- Mei H.C., Belt-Gritter B. y Busscher H.J. (1995). Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity 2. Adhesion mechanisms. *Colloids Sur/aces B: BiointerJaces*. 5:117-126.
- Mejía, María. (2008). Evaluación del efecto de la relación carbono nitrógeno y el nivel de oxígeno disuelto sobre la producción de biosurfactantes a partir de *Bacillus subtilis*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
- Mnif I. y Ghribi D. (2015a). Microbial derived surface active compounds: properties and screening concept. *World J Microbiol Biotechnol.* 31(7):1001-1020.
- Mnif I. y Ghribi D. (2015b). High molecular weight bioemulsifiers, main properties and potential environmental and biomedical applications. *World J Microbiol Biotechnol.* 31:691–706.
- Mondragón Mora, Laura (2011). Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas aerobias autóctonas de yacimientos petroleros productoras de biosurfactantes para su aplicación en técnicas de meor. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
- Morikawa M., Hirata, Y., Imanaka, T. (2000). A study on the structure–function relationship of the lipopeptide biosurfactants. *Biochim.Biophys. Acta*. 1488, 211 – 218.
- Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T. y Kitamoto D. (2007). Physiological differences in the formation of the glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, between *Pseudozyma antarctica* and *Pseudozyma aphidis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74:307–315.
- Mukherjee S., Das P. y Sen R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol.* 24: 509-515.
- Mulligan C., Cooper D. y Neufeld R. (1984) Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *J Fermentation Technol.* 62(4):311–314.
- Nasrin S., Mohammad R. F., Neda A., Abbas A., Abbas T. y Hossein J. (2007). Biosurfactant Production by the Strain Isolated from Contaminated Soil. *Int J Biol Sci.* 7(7):1266-1269.
- Neu T. R. y Poralla K. (1990). Emulsifying agents from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. *Appl Microbiol Biotechnol.* 32:521-525.

- Nievas M.L., Commendatore M.G., Estevas J.L., Bucalá V. (2008). Biodegradation pattern of hydrocarbons from a fuel oil-type complex residue by an emulsifier-producing microbial consortium. *J. Hazard. Mater.* 154, 96–104.
- Noparat P., Maneerat S. y Saimmai A. (2014a) Application of Biosurfactant from *Sphingobacterium spiritivorum* AS43 in the Biodegradation of Used Lubricating Oil. *Appl Biochem Biotechnol.* 172(8):3949-63.
- Noparat P., Maneerat S. y Saimmai A. (2014b). Utilization of palm oil decanter cake as a novel substrate for biosurfactant production from a new and promising strain of *Ochrobactrum anthropi* 2/3. *World J Microbiol Biotechnol.* 30:865–877.
- Obayori O.S., Ilori M.O., Adebusey S.A., Oyetibo G.O., Omotayo A.E. y Amund O.O. (2009). Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. strain LP1. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1615–1623.
- Oliveira F. J. S., Campos L. V. N. y França F. P. (2006). Biosurfactants Production by *Pseudomonas aeruginosa* FR Using Palm Oil. *Appl Biochem Biotech.* 131 (1-3): 727-737.
- Olteanu V., Sicuia O., Ciuca M., Carstea D. M., Voaides C., Campeanu G., Cornea C. P. (2011). Production of biosurfactants and antifungal compounds by new strains of *Bacillus* Spp. isolated from different sources. *Rom Biotech Lett.* 16(1):84-91.
- Pacheco G., Ciapina E., Gomes E., y Junior N. (2010). Biosurfactant Production by *Rhodococcus erythropolis* and its Application to Oil Removal. *Braz J Microbiol.* 41: 685-693.
- Pacwa-Płociniczak M., Plaza G. A., Piotrowska-Seget Z. y Cameotra S. S. (2011) Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 633-654. (Visitado el 22 de abril de 2015). Disponible en la web: www.mdpi.com/journal/ijms
- Pandey A., Nandi D., Prasad N. y Arora S. (2013). Biosurfactant Producing Microbes from Oil Contaminated Soil - Isolation, Screening and Characterization. *JIEAS.* 8(4):551-562.
- Pandey A., Mishra M. y Rai V. (2014). Optimization and Characterization of Biosurfactant Producing Microbes and Expression of Biosurfact Producing Genes in Non Biosurfactant Producing Microbes. *IJPRAS.* 3(1): 47-56.
- Panjiar N., Sachan S. G. y Sachan A. (2014). Screening of bioemulsifier-producing micro-organisms isolated from oil-contaminated sites. *Ann Microbiol.* 65(2):753-764.
- Pantazaki A. A., Dimopoulou M. I., Simou O. M. y Pritsa A. A. (2010). Sunflower seed oil and oleic acid utilization for the production of rhamnolipids by *Thermus thermophilus* HB8. *Appl Microbiol Biotechnol.* 88:939–951.
- Parkinson M. (1985). Biosurfactants. *Biotechnol Adv.* 3: 65-93
- Pathak K. y Keharia H. (2014). Application of extracellular lipopeptide biosurfactant produced by endophytic *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) in microbially enhanced oil recovery (MEOR). *3 Biotech.* 4:41–48.

- Pathaka A. y Nakhate P. (2015). Optimisation of Rhamnolipid: A New Age Biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 1688 and its Application in Oil Recovery, Heavy and Toxic Metals Recovery. *J Bioprocess Biotech.* 5(5): 1-14 (229)
- Patil J.R. y Chopade B.A. (2001). Studies on bioemulsifier production by *Acinetobacter* strains isolated from healthy human skin. *J Appl Microbiol.* 91:290-298.
- Pemmaraju S. C., Sharma D., Singh N., Panwar R., Cameotra S.S. y Pruthi V. (2012). Production of Microbial Surfactants from Oily Sludge-Contaminated Soil by *Bacillus subtilis* DSVP23. *Appl Biochem Biotechnol.* 167:1119–1131.
- Perfumo A., Smyth T. J., Marchant R. y Banat I. M. (2010). *Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates*. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. School of Biomedical Sciences, University of Ulster, Coleraine, County Londonderry, Northern Ireland, UK.
- Pinzon N. M. y Ju L.K. (2009). Improved detection of rhamnolipid production using agar plates containing methylene blue and cetyl trimethylammonium bromide. *Biotechnol Lett.* 31:1583–1588
- Plaza G., Zjawiony I. y Banat I. (2006). Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated bioremediated soils. *J Petro Science Eng.* 50(1):71–77.
- Pornsunthorntawe O., Wongpanit P., Chavadej S., Abe M. y Rujiravanit R. (2008). Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. *Bioresource Technol* 99:1589–1595.
- Prabhu Y. y Phale P. (2003). Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas sp.* Strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 342-351
- Pradhan A. K., Pradhan N., Sukla L. B., Panda P. K. y Mishra B. K. (2013). Inhibition of pathogenic bacterial biofilm by biosurfactant produced by *Lysinibacillus fusiformis* S9. *Bioprocess Biosyst Eng.* 37(2):139-49.
- Pradnya A.J., Dhiraj B. y Shekhawat. (2014). Effect of carbon and nitrogen source on biosurfactant production by biosurfactant producing bacteria isolated from petroleum contaminated site. *Adv. Appl. Sci. Res.* 5(6):159-164.
- Prats C., Giró A., Ferrer J., López D. y Vives-Rego J. (2008) Analysis and lbM simulation of the stages in bacterial lag phase: Basis for an updated definition. *J Theor Biol.* 252:56-68.
- Pruthi V. y Cameotra S.S. (1997). Rapid identification of biosurfactant- producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. *Biotechnol Tech.* 11(9):671–674.
- Qiao G., Li H., Xu D. y Park S. I. (2012). Modified a Colony Forming Unit Microbial Adherence to Hydrocarbons Assay and Evaluated Cell Surface Hydrophobicity and Biofilm Production of *Vibrio scophthalmi*. *J Bacteriol Parasitol.* 3(1):1-6.

- Qiao N. y Shao Z. (2010). Isolation and characterization of a novel biosurfactant produced by hydrocarbon-degrading bacterium *Alcanivorax dieselolei* B-5. *J. of J Appl Microbiol.* 108:1207–1216.
- Rahman K., Rahman T., Korkoutas Y., Petsas I., Marchant R. y Banat I. (2003). Enhanced bioremediation of n – alcane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresour. Technol.* 90, 159-168.
- Rahman P. K., Pasirayi G., Auger V. y Ali Z. (2010). Production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 in a microfluidic bioreactor. *Biotechnol Appl Bioc.* 55(1):45-52.
- Ramachandran R., Chalasani A. G., Lal R. y Roy U. (2014). A Broad-Spectrum Antimicrobial Activity of *Bacillus subtilis* RLID 12.1. *ScientificWorldJournal.* doi: 10.1155/2014/968487
- Rashedi H., Jamshidi E., Mazaheri M., y Bonakdarpour B. (2005). Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 2(2): 121-127. www.sciencejournal.in (Consulta el 26 de marzo de 2016)
- Reddy M.S., Naresh B., Leela T., Prashanthi M., Madhusudhan N.C., Dhanasri G. y Devi P. (2010). Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp. *Bioresource Technol.* 101:7980–7983.
- Rehman N. M. A., Shete M. B., Dixit P.P. y Deshmunkh A.M. (2014). Screening of Biosurfactant Producing Microorganisms from Oil Contaminated Soils of Osmanabad Region, Maharashtra, India. *IJS.* 1(1): 35-39.
- Reis F. A., Sérvulo E. F. y França F. P. (2004). Lipopeptide Surfactant Production by *Bacillus subtilis* Grown on Low-Cost Raw Materials. *Appl Biochem Biotech.* 113-116:889-912.
- Rhbal H., Souabi S., Safi M., Terta M., Arad M., Anouzla A. y Hafid M. (2014). Soils bioremediation of hydrocarbons and green waste elimination through composting process. *IJEMA.* 2(6-1):13-22.
- Rocha C., San-Bias F., San-Bias G. y Vierma L. (1992). Biosurfactant production by two isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *World J Microb Biot.* 8:125-128.
- Rodrigues L R., Banat I. M., Teixeira J. y Oliveira R. (2006a). Biosurfactants: potential applications in medicine. *J Antimicrob Chemoth.* 57:609–618.
- Rodrigues L. R., Teixeira J. A., van der Mei H. C. y Oliveira R. (2006b). Isolation and partial characterization of a biosurfactant produced by *Streptococcus thermophilus* A. *Biointerfaces.* 53:105–112.
- Rodrigues L. R. y Teixeira J. A. (2008). Chapter 6: Biomedical and Therapeutic Applications of Biosurfactants. doi: 10.1007/978-1-4419-5979-9_6.
- Rosenberg E. (1986). Microbial surfactants. *CRC Rev Biotechnol.* 3:109-132
- Rosenberg E. y Ron, E.Z. (1999). High- and Low-molecular-mass Microbial Surfactants. *Appl Microbiol Biot.* 52:154-162.
- Ron, E. and Rosenberg, E. (2001) A Review of Natural Roles of Biosurfactants, *Environ Microbiol.* 3(4): 229-236.

- Ron E. y Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Environmental biotechnology*. 13: 249-252
- Rosenberg E., Zuckerberg A., Rubinovitz C., y Gutnick D. L. (1979). Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Isolation and Emulsifying Properties. *Appl Environ Microb.* 37(3): 402-408.
- Rosenberg M., Gutnick D. y Rosenberg E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons—a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett.* 9(1):29–33.
- Rosenberg M., Rottem S. y Rosenberg E. (1982). Cell surface hydrophobicity of smooth and rough *Proteus mirabilis* strains as determined by adherence to hydrocarbons. *FEMS Microbiology Letters*. 13:167-169.
- Rosenberg M. (1984). Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*. 22:289-295.
- Rosenberg M. y Rosenberg E. (1985). Bacterial Adherence at the Hydrocarbon-Water Interface. *Oil & Petrochemical Pollution*. 2:155-162.
- Rosenberg M. (2006). Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS Microbiol Lett.* 262:129–134.
- Rossi E. M., Beilke L., Kochhann M., Sarzi D. H. y Tondo E. C. (2016). Biosurfactant Produced by *Salmonella enteritidis* SE86 Can Increase Adherence and Resistance to Sanitizers on Lettuce Leaves (*Lactucasativa L. cichoraceae*). *Front. Microbiol.* 7(9):1-9.
- Saisa-ard K., Saimmai A y Maneerat S. (2014). Characterization and phylogenetic analysis of biosurfactant-producing bacteria isolated from palm oil contaminated soils. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 36(2):163-175
- Saimmai A., Kaewrueng J., y Maneerat S. (2012a). Used lubricating oil degradation and biosurfactant production by SC-9 consortia obtained from oil-contaminated soil. *Ann Microbiol.* 62:1757–1767.
- Saimmai A., Rukadee O., Onlamool T., Sobhon V. y Maneerat S. (2012b). Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by a new and promising strain of *Oleomonas sagaranensis* AT18. *World J Microbiol Biotechnol.* 28:2973–2986.
- Salager J. y Fernández A. (2004). Surfactantes. I. Generalidades II. Materias Primas. Cuaderno FIRP S301-PP. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela
- Saminathan P., y Rajendran P. (2014). Screening and Identification of Potential Biosurfactant producing microorganisms isolated from oil contaminated soils. *IJPBS*. 5(1): 1096-1106.
- Saranya P., Bhavani P., Swarnalatha S. y Sekaran G. (2015). Biosequestration of chromium (III) in an aqueous solution using cationic and anionic biosurfactants produced from two different *Bacillus* sp. – a comparative study. *RSC Adv*.5:80596–80611.
- Saravanan V., y Vijayakumar S. (2012). Isolation and screening of biosurfactant producing microorganisms from oil contaminated soil. *J. Acad. Indus. Res.* 1(5): 2278-5213.

- Sastoque-Cala L., Cotes-Prado A. M., Rodríguez-Vázquez R. y Pedroza-Rodríguez A. M. (2010). Effect of nutrients and fermentation conditions on the production of biosurfactants using rhizobacteria isolated from fique plants *Universitas Scientiarum*. 15(3), 251-264.
- Sathe S. J., Kadam S. P., Bankar V. P., Mulik M. L., Gajbhiye M. H. y Doshi D. V. (2012). Studies on Isolation and Bioemulsifier Production by Bacteria from Hydrocarbon Contaminated Soil. *JERHRE*. 1(1):45- 54.
- Satpute S.K., Bhawsar B.D., Dhakephalkar P.K. y Chopade B.A. (2008). Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. *Indian J Mar Sci* 37: 243-250.
- Satpute S.K., Banpurkar A.G., Dhakephalkar P.K., Banat I.B. y Chopade B.A. (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Crit Rev Biotechnol*. (Visitado el 02 de mayo de 2015). Disponible en: <http://www.informahealthcare.com/bty>
- Schaller K., Fox S., Bruhn D., Noah K., y Bala G. (2004). Characterization of Surfactin from *Bacillus subtilis* for Application as an Agent for Enhanced Oil Recovery. *Appl Biochem Biotech*. 113(116): 827-836.
- Sharma D., Ansari M. J., Al-Ghamdi A., Adgaba N., Khan K. A., Pruthi V. y Al-Waili N. (2015a). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* DSVP20 isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated soil and its physicochemical characterization. *Environ Sci Pollut Res*. 22(22): 17636-17643.
- Sharma D., Saharan B. S., Chauhan N., Procha S. and Lal S. (2015b). Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*. *SpringerPlus*. 4(4):1-14.
- Shennan J.L. y Levi J.D. (1987). In situ microbial enhanced oil recovery. *Surf Sci Series*. 21-35
- Siegmund I. y Wagner F. (1991). New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnol Tech*. 5(4):265–268.
- Silva F. S., Pylro V. S., Fernandes P. L., Barcelos G. S., Kalks K. H., Schaefer C. E. y Tótola M. R. (2015). Unexplored Brazilian oceanic island host high salt tolerant biosurfactant-producing bacterial strains. *Extremophiles*. 19(3):561-72.
- Smith D. D., Nickzad A., Déziel E. y Stavrínides J. (2016). A Novel Glycolipid Biosurfactant Confers Grazing Resistance upon *Pantoea ananatis* BRT175 against the Social Amoeba *Dictyostelium discoideum*. *mSphere*. 1(1):1-16.
- Song B., Rong Y., Zhao M. y Chi Z. (2013). Antifungal activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* anti-CA against *Candida albicans* isolated from clinic. *Appl Microb Biot*. 97:7141–7150
- Stoimenova E., Vasileva-Tonkova E., Sotirova A., Galabova D. y Lalchev Z. (2009). Evaluation of different carbon sources for growth and biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* isolated from wastewaters. *Z. Naturforsch*. 64, 96 – 102.

- Sulbarán, M. (2002). Producción y caracterización de biosurfactantes aislados de *Pseudomonas fluorescentes*. Tesis de Licenciatura. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.
- Sulbaran M., Bahsas, A., Velasquez, W. y Otoniel, J. (2005) Caracterización De Biosurfactantes Producidos Por *Pseudomonas* Fluorescentes Aisladas De Emulsiones De Petróleo Pesado. *Cien.* 13(2), 228-239
- Sweet S. P., MacFarlane T. W. y Samaranayake L. P. (1987). Determination of the cell surface hydrophobicity of oral bacteria using a modified hydrocarbon adherence method. *FEMS Microbiol Lett.* 48:159-163.
- Szulc A., Ambrozewicz D., Sydow M., Lawniczak L., Piotrowska-Cyplik A., Marecik R., Chrzanowski L. (2014). The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies. *J Environ Manage.* 132:121-128.
- Tabatabaee A., Assadi M.M., Noohi A.A. y Sajadian V.A. (2005). Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. *Iran J Environ Healt.* 2(1), 6-12.
- Tabuchi T., Martínez D., Hospinal M., Merino F. y Gutiérrez S. (2015). Optimización y modificación del método para la detección de ramnolípidos. *Revista peruana de biología.* 22(2):247-258. <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/index>. (Visitado el 29 de mayo del 2016).
- Tadros T. F. (2005). *Principles and Applications Applied Surfactants*. doi: 10.1002/3527604812.
- Tahmourespour A., Salehi R. y Kermanshahi R. K. (2011). *Lactobacillus acidophilus*-derived biosurfactant effect on GTFB and GTFC expression level in *Streptococcus mutans* biofilm cells. *Braz J Microbiol.* 42:330-339.
- Tambekar D.H. y Gadakh P.V. (2013). Bioemulsifier Production and Molecular Detection of *Pseudomonas* spp. Isolated from Hydrocarbon Contaminated Soil. *IJEST* 2(3): 470-477.
- Techaoei S., Leelapornpisid P., Santiarwarn D. y Lumyong S. (2007). Preliminary Screening of Biosurfactant-Producing Microorganisms Isolated from Hot Spring and Garages in Northern Thailand. *KMITL Sci. Tech. J.* Vol. 7(1): 38-43.
- Techaoei S., Lumyong S., Prathumpai W., Santiarwarn D. y Leelapornpisid P. (2011). Screening Characterization and Stability of Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* SCMU106 Isolated from Soil in Northern Thailand. *Asian J. Biol. Sci.*
- Thavasi R. y Jayalakshmi S. (2003). Bioremediation Potential of Hydrocarbonoclastic Bacteria in Cuddalore Harbour Waters (India). *Res. J. Chem. Environ.* 7 (1): 17-22.
- Thavasi R., Jayalakshmi S., Balasubramanian T. y Banat I. M. (2008). Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. *World J Microb Biot.* 24:917-925.
- Thavasi R., Sharma S. y Jayalakshmi S. (2011). Evaluation of Screening Methods for the Isolation of Biosurfactant Producing Marine Bacteria. *J. Pet Environ Biot.* S1:001

- Torres J.M. y Sánchez J.A. (2001). Producción de un biosurfactante microbiano por *Torulopsis magnoliae* en cultivos sumergidos por carga. *CIENCIA*. 9(3): 305-312
- Tugrul T. y Cansunar E. (2005). Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *World J Microb Biot*. 21:851–853.
- Updegraff D. M. y Wren G. B. (1954). The Release of Oil from Petroleum-Bearing Materials by Sulfate-Reducing Bacteria. (Visitado el 15 de junio de 2015). Disponible en la web: <http://aem.asm.org/>
- Urum K., Grigson S., Pekdemir T. y McMenamy S. (2006). A Comparison of the efficiency of different surfactants for removal of crude oil from contaminated soils. *Chemosphere*. 62:1403–1410.
- Uzoigwe, C., Burgess, J. G., Ennis, C. J., Rahman, P. K. S. M. (2015). Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in Microbiol*. 6: 10.3389 (Visitado el 02 de mayo de 2015). Disponible en la web: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00245/full>
- Van Dyke M.I., Gulley S.L., Lee H. y Trevors J.T. (1993). Evaluation of microbial surfactants for recovery of hydrophobic pollutants from soil. *J. Ind. Microbiol*. 11, 163–170.
- Van Hamme J.D., Singh A. y Ward OP. (2003). Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol Mol Biol*. 67(4): 503–549.
- Van Hamme J.D., Singh A. y Ward OP. (2006). Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol Adv*. 24(6):604 –620.
- Vanavil B., Perumalsamy M. y Seshagiri R.A. (2013). Biosurfactant Production from Novel Air Isolate NITT6L: Screening, Characterization and Optimization of Media. *J. Microbiol Biot*. 23(9), 1229–1243.
- Vargas J., Reza O.A., Chang C.K., Membrillo I.L. y Calva G. (2010). Producción de biosurfactantes por bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno crecidas en hidrocarburos. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*. Vol 41. pp 1-9. Cuba.
- Varjani S., Rana D., Bateja S., Sharma M., y Upasani V. (2014). Screening and identification of biosurfactant (bioemulsifier) producing bacteria from crude oil contaminated sites of Gujarat, India. *IJIRSET*. 3(2):9205-9213.
- Vasileva-Tonkova E. y Gesheva V. (2007). Biosurfactant Production by Antarctic Facultative Anaerobe *Pantoea* sp. During Growth on Hydrocarbons. *Curr Microbiol*. 54:136–141.
- Vaux D. y Cottingham M. (2001) Method and apparatus for measuring surface configuration. Patent number WO 2007/039729 A1.
- Vegt W., Mei H. C., Noordmans J. y Busscher H. J. (1991). Assessment of bacterial biosurfactant production through axisymmetric drop shape analysis by profile. *Appl Microbiol Biot*. 35:766-770.
- Velioglu Z. y Urek R. O. (2014). Concurrent Biosurfactant and Ligninolytic Enzyme Production by *Pleurotus* spp. in Solid-State Fermentation. *Appl Biochem Biotech*. 174:1354–1364.

- Vijaya B., Jayalakshmi N. R. y Manjunath K. (2014). Isolation and partial characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* PAVIJ from contaminated soil. *RJPBCS*. 5(2):881-895.
- Viramontes-Ramos S., Portillo-Ruiz M., Ballinas-Casarrubias M., Torres-Muñoz J., Rivera-Chavira B., Nevárez-Moorillón G. (2010). Selection of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated soil. *Braz. J. Microbiol.* 41, 668-675.
- Vyas T. y Dave B. P. (2016). Biosynthesis of Rhamnolipid Biosurfactant by Newly Isolated Marine Bacterium *Methylobacterium mesophilicum* MTCC 6839 from Oil Contaminated Sites at Alang Coast, Gujarat, India. *IJBMSM*. 7(1): 74-79.
- Walter V., Syltatk C., y Hausmann. (2010). Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. Madame Curie Bioscience Database (Online). *Landes Bioscience* (Visitado el 07 de diciembre de 2014). Disponible en la web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6189/#A76787>.
- Wang W., Cai B. y Shao Z. (2014). Oil degradation and biosurfactant production by the deep sea bacterium *Dietzia maris* As-13-3. *Front Microbiol.* 5(711):1-11.
- Wattanaphon H.T., Kerdsin A., Thammacharoen C., Sangvanich P. y Vangnai A.S. (2008). A biosurfactant from *Burkholderia cenocepacia* BSP3 and its enhancement of pesticide solubilization. *J Appl Microbiol.* 105:416–423.
- Wei Y.H., Chou C.L. y Chang J.S. (2005) Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochem Eng J* 27:146–154.
- Willumsen P. y Karlson U. (1997). Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*. 7(5): 415–423.
- Windevoxhel R., Malaver N., Bastardo H., Subero N., Sancheza N. y Marcanao L. (2009a). Caracterización de la comunidad bacteriana de un Ripio de perforación y aislamiento de un consorcio bacteriano con capacidad hidrocarburoclástica. *Revista Ingeniería UC*. 16(2):14-19.
- Windevoxhel R., Sánchez N., Subero N., Bastardo H. y Malaver N. (2009b) Grupos funcionales de bacterias con potencial para Biodegradación de Hidrocarburos. *Revista Ingeniería UC*. 16(1): 51-53
- Windevoxhel R., Sánchez N., Bastardo H. y Malaver N. (2011). Biorremediación de un suelo petrolizado empleando humus del Río Caroní. *Ingeniería y Sociedad UC*. 6(2): 94-99.
- Witek-Krowiak A., Witek J., Gruszczynska A., G. Szafran R., Kozlecki T. y Modelski S. (2010). Scale up and Application of Biosurfactant from *Bacillus subtilis* in Enhanced Oil Recovery. *Appl Biochem Biotech.* 162:510–523.
- Witek-Krowiak A., Witek J., Gruszczynska A., Szafran R., Kozlecki T. y Modelski S. (2011). Ultrafiltrative separation of rhamnolipid from culture medium. *World J Microb Biot.* 27:1961–1964.
- Xia W., Luo Z., Dong H., Yu L., Cui Q. y Bi Y. (2012). Synthesis, Characterization, and Oil Recovery Application of Biosurfactant Produced by Indigenous *Pseudomonas aeruginosa* WJ-1 Using Waste Vegetable Oils. *Appl Biochem Biotech.* 166:1148–1166.

- Yañez-Ocampo G. y Wong-Villarreal A. (2013). Biosurfactantes Microbianos, Producción Potencial con Residuos Agroindustriales de Chiapas. *BioTecnología*. 17 (3): 12-28.
- Yilmaz F., Ergene A., Yalçın E. y Tan S. (2009). Production and characterization of biosurfactants produced by microorganisms isolated from milk factory wastewaters. *Environ Technol*. 30(13):1397–1404.
- Youssef N., Duncan K., Nagle D., Savage K. N., Knapp R. M. y McInerney M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J Microbiol Meth*. 56(3): 339–347.
- Youssef N., Duncan K., y McInerney M. (2005). Importance of 3-Hydroxy Fatty Acid Composition of Lipopeptides for Biosurfactant Activity. *Appl Environ Microb*. 71 (12): 7690–7695.
- Youssef N., Nguyen T., Sabatini D. A. y McInerney M. J. (2007). Basis for formulating biosurfactant mixtures to achieve ultra-low interfacial tension values against hydrocarbons. *J Ind Microbiol Bio*. 34:497–507.
- Zamora, A. (2006). Análisis Funcional De Comunidades Bacterianas Asociadas A Un Proceso De Biorremediación De Muestras De Suelo Contaminado Con Hidrocarburo. Tesis de Licenciatura. Universidad Central De Venezuela – Facultad De Ciencias (Venezuela).
- Zamora, A., Malaver, N. y Ramos, J. (2012). Análisis Funcional de Microorganismos: un estimador de diversidad y estructura comunitaria. *Acta Biol. Venez*. Vol 32 (1):57-86.
- Zhang T., Shi Z., Hu L., Cheng L. y Wang F. (2008). Antifungal compounds from *Bacillus subtilis* B-FS06 inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*. *World J Microb Biot*. 24:783–788.
- Zhou H., Chen J., Yang Z., Qin B., Li Y. y Kong X. (2015). Biosurfactant production and characterization of *Bacillus* sp. ZG0427 isolated from oil-contaminated soil. *Ann Micro*. 65(4):2255-2264.

Consultas en línea;

- Biosurfactantes. [En línea] [17 páginas en PDF]. Disponible en: https://ximegabydelatorre.wikispaces.com/file/view/pinedorevilla_trigochorda.pdf. (Consulta: el 4 noviembre de 2014).
- Biosurfactants of Probiotic Lactic Acid Bacteria. Chapter 2. [En línea] [14 páginas en PDF]. Disponible en: http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/9783319262130-c2.pdf?SGWID=0-0-45-1549541-p177778746. (Consulta: el 05 de abril de 2017).
- <http://vlab.amrita.edu/?sub=3&brch=70&sim=638&cnt=2>, (Visitado el 19 de abril de 2016).

X. Anexos

Anexo I. Resultados de ls métodos de detección cualitativos

Cepas	Fuentes de Carbono	OSM (cm ²)	BATH* (%)	Parafilm	DC
MN2-13 (FMA)	Glucosa	0,2±0,14	2,24±7,7	-	-
	Acetato de Sodio	0,3±0,10	9,23±3,5	-	-
	Gasoil	0,3±0,14	-	-	-
	Oliva	0,5±0,05	4,07±1,4	-	-
MR1-24 (FMC)	Glucosa	0,3±0,10	33,09±18,4	-	-
	Acetato de Sodio	0,4±0,05	38,69±2,9	-	-
	Gasoil	0,1±0,12	38,50±54,4	-	-
	Oliva	0,3±0,18	79,73±5,4	-	-
MR3-25 (FMD)	Glucosa	0,3±0,09	1,98±7,7	-	-
	Acetato de Sodio	0,3±0,08	-4,69±6,6	-	-
	Gasoil	0,0±0,00	49,55±26,3	-	-
	Oliva	0,3±0,05	19,97±6,7	-	-
ER3-11 (FME)	Glucosa	0,2±0,15	-2,25±3,2	+	+
	Acetato de Sodio	0,3±0,08	-	-	-
	Gasoil	0,0±0,00	28,50±40,3	-	-
	Oliva	0,2±0,10	44,05±67,9	++	-
BR2-26 (FMF)	Glucosa	1,2±0,23	-	+++	++
	Acetato de Sodio	0,4±0,26	-	-	-
	Gasoil	0,0±0,00	-	-	-
	Oliva	0,2±0,14	-36,83±52,1	++	+
MN3-5 (FMG)	Glucosa	0,8±0,14	-0,56±0,8	-	+
	Acetato de Sodio	0,4±0,23	-	-	-
	Gasoil	0,0±0,00	-	-	-
	Oliva	0,4±0,12	8,13±20,5	-	+
MR3-26 (FMH)	Glucosa	0,4±0,08	12,05±3,6	++	++
	Acetato de Sodio	0,2±0,21	-17,72±4,8	-	+
	Gasoil	0,1±0,09	-	-	-
	Oliva	0,2±0,12	-13,96±19,7	-	++
MR1-25 (FMI)	Glucosa	0,8±0,14	-	++	++
	Acetato de Sodio	0,5±0,04	-	+	+
	Gasoil	0,0±0,00	-	-	-
	Oliva	0,3±0,16	-13,96±19,7	-	++
BR1-16 (FMJ)	Glucosa	0,4±0,12	-	-	-
	Acetato de Sodio	0,2±0,10	-	-	-
	Gasoil	0,3±0,19	-	-	-
	Oliva	0,3±0,17	-116,20±90,8	-	-

ER1-11 (FMK)	Glucosa	0,3±0,13	43,54±5,8	-	-
	Acetato de Sodio	0,3±0,12	19,55±28,1	-	-
	Gasol	0,0±0,00	-	-	-
	Oliva	0,5±0,16	22,84±15,6	-	-
MR2-11 (FMM)	Glucosa	0,5±0,06	11,51±0,3	-	-
	Acetato de Sodio	0,6±0,08	1,26±17,6	-	+
	Gasol	0,1±0,15	-	+	-
	Oliva	0,5±0,14	-15,35±4,5	-	+
BN1-7 (FMO)	Glucosa	0,5±0,08	30,32±17,1	-	-
	Acetato de Sodio	0,1±0,12	6,06±8,6	-	-
	Gasol	0,0±0,00	-	-	-
	Oliva	0,5±0,13	33,43±4,6	-	-
BR1-11 (FMP)	Glucosa	0,3±0,10	20,69±37,4	-	-
	Acetato de Sodio	0,4±0,15	-5,00±15,0	-	-
	Gasol	0,2±0,08	-	-	-
	Oliva	0,4±0,10	40,86±4,9	-	-
BN1-1 (FMQ)	Glucosa	0,5±0,08	-11,61±10,5	+	+
	Acetato de Sodio	0,5±0,08	-11,02±8,9	-	+
	Gasol	0,3±0,10	-	-	-
	Oliva	1,3±0,93	7,93±2,7	++	++
MR2-18 (FMR)	Glucosa	0,7±0,15	-	++	++
	Acetato de Sodio	0,4±0,06	-13,53±10,7	-	-
	Gasol	0,0±0,00	-	-	-
	Oliva	0,6±0,26	-	++	+
MR3-20 (FMS)	Glucosa	0,7±0,05	5,74±3,3	-	-
	Acetato de Sodio	0,5±0,05	-14,85±13,1	-	+
	Gasol	0,0±0,00	-	-	-
	Oliva	0,7±0,27	24,56±11,4	+	+
BR1-15 (FMT)	Glucosa	0,7±0,12	-31,73±8,6	+	+
	Acetato de Sodio	1,2±0,27	-	-	-
	Gasol	0,2±0,11	-	-	-
	Oliva	0,5±0,05	-	-	+
BR2-14 (FMU)	Glucosa	0,4±0,06	-20,68±23,5	++	-
	Acetato de Sodio	0,4±0,04	-	-	-
	Gasol	0,1±0,08	-	-	-
	Oliva	0,2±0,08	59,93±9,9	+	+
MR3-27 (FMV)	Glucosa	0,5±0,00	0,99±2,4	-	-
	Acetato de Sodio	0,5±0,10	-	-	-
	Gasol	0,5±0,08	-14,58±35,9	-	-
	Oliva	0,6±0,17	17,02±3,1	-	+
MN2-16 (FMW)	Glucosa	0,3±0,12	29,11±5,1	-	-

	Acetato de Sodio	0,4±0,10	-21,72±2,0	-	-
	Gasoil	0,0±0,00	-	-	+
	Oliva	1,1±0,15	25,51±6,1	+	+
MN3-4 (FMX)	Glucosa	0,7±0,20	-26,88±6,7	+++	++
	Acetato de Sodio	0,3±0,14	-24,02±42,2	-	+
	Gasoil	0,2±0,13	-	-	-
	Oliva	5,7±0,45	-	+++	+++
MN3-1 (FMY)	Glucosa	0,8±0,15	-	++	++
	Acetato de Sodio	0,5±0,05	-	-	-
	Gasoil	0,5±0,08	-	-	++
	Oliva	2,1±0,49	9,22±13,0	+++	++
MR1-2 (FMZ)	Glucosa	0,3±0,16	21,37±12,7	-	-
	Acetato de Sodio	0,0±0,00	-24,12±18,8	-	-
	Gasoil	0,0±0,00	-	-	-
	Oliva	0,4±0,12	-	-	-
SDS	-	6,00±0,0	-	+++	+++

*Resultados en negro representan los valores de absorbancia negativos

Anexo II. Resultados de los índice de emulsificación (E%) a las 24, 48, 72 y 96 horas

Cepas	Fuentes de Carbono	E _{24%} (%)	E _{48%} (%)	E _{72%} (%)	E _{96%} (%)
MN2-13 (FMA)	Glucosa	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
	Acetato de Sodio	2,8±6,8	2,8±6,8	3,3±8,2	3,3±8,16
	Gasoil	3,1±7,7	3,1±7,7	3,3±8,2	3,6±8,75
	Oliva	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
MR1-24 (FMC)	Glucosa	72,4±4,0*	67,4±4,5	57,0±7,7	56,0±6,84
	Acetato de Sodio	11,9±11,7	11,9±11,7	8,0±8,0	6,6±7,30
	Gasoil	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
	Oliva	15,8±8,1	15,8±8,1	10,4±4,2	6,2±5,17
MR3-25 (FMD)	Glucosa	65,0±3,1	58,8±5,8	54,7±2,6	54,7±2,64
	Acetato	64,4±7,5	61,3±8,6	57,3±8,5	57,3±8,51
	Gasoil	3,1±3,4	3,1±3,4	3,1±3,4	0,0±0,00
	Oliva	46,9±24,9	34,4±20,4	34,4±20,4	33,3±20,03
ER3-11 (FME)	Glucosa	68,1±1,7	66,1±4,3	66,1±4,3	61,9±4,23
	Acetato de Sodio	44,4±15,0	44,4±15,0	37,8±14,4	37,8±14,40
	Gasoil	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
	Oliva	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
BR2-26 (FMF)	Glucosa	36,7±15,6	36,7±15,6	32,1±14,4	24,7±6,00
	Acetato de Sodio	29,2±16,6	29,2±16,6	22,9±18,4	14,6±14,61
	Gasoil	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00

	Oliva	72,2±3,2	72,2±3,2	70,1±2,5	69,1±0,75
MN3-5 (FMG)	Glucosa	63,0±3,1	63,0±3,1	63,4±5,0	67,4±6,54
	Acetato de Sodio	37,5±13,4	35,3±9,5	28,8±8,4	25,5±10,83
	Gasoil	12,8±14,0	12,8±14,0	2,2±5,4	0,0±0,00
	Oliva	69,5±5,9	68,4±5,3	67,5±5,4	65,4±5,73
MR3-26 (FMH)	Glucosa	48,5±3,6	48,5±3,6	47,5±4,0	46,4±4,00
	Acetato de Sodio	49,3±13,7	42,7±10,8	38,6±16,8	27,8±17,60
	Gasoil	6,3±15,3	3,1±7,7	3,1±7,7	0,0±0,00
	Oliva	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
MR1-25 (FMI)	Glucosa	63,2±10,6	51,7±13,0	43,2±7,5	41,1±8,90
	Acetato de Sodio	16,6±5,3	14,5±5,2	13,5±5,1	12,4±4,00
	Gasoil	0,0±0,0	3,1±0,0	3,1±0,0	0,0±0,00
	Oliva	65,0±3,1	66,3±2,3	65,4±1,0	63,5±2,9
BR1-16 (FMJ)	Glucosa	67,8±3,6	67,8±3,6	67,8±3,6	64,6±2,28
	Acetato de Sodio	26,0±10,0	12,5±5,2	12,5±5,9	8,3±4,74
	Gasoil	7,3±15,0	0±0,0	0±0,0	0±0,00
	Oliva	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
ER1-11 (FMK)	Glucosa	61,2±9,4	55,1±7,1	54,4±16,2	48,0±16,84
	Acetato de Sodio	67,7±1,7	64,8±5,2	66,6±5,9	63,8±4,74
	Gasoil	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
	Oliva	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
MR2-11 (FMM)	Glucosa	53,0±4,7	46,3±4,4	44,6±4,6	37,0±2,45
	Acetato	53,4±3,9	44,9±6,3	44,0±7,3	43,2±5,96
	Gasoil	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
	Oliva	41,2±5,9	34,4±6,4	27,6±9,8	23,1±7,19
BN1-7 (FMO)	Glucosa	67,5±8,2	63,3±4,1	61,7±4,1	61,7±4,08
	Acetato de Sodio	50,0±28,9	46,6±26,0	46,6±26,0	41,4±21,48
	Gasoil	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
	Oliva	40,7±4,2	40,7±4,2	32,5±5,2	24,2±5,85
BR1-11 (FMP)	Glucosa	63,7±12,1	60,3±11,4	52,6±11,8	52,6±11,82
	Acetato	66,3±2,0	66,3±2,0	65,3±2,2	64,2±2,89
	Gasoil	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
	Oliva	8,8±13,8	4,9±12,0	3,9±9,6	2,0±4,80
BN1-1 (FMQ)	Glucosa	53,2±13,8	48,9±13,9	48,1±14,1	39,7±17,82
	Acetato de Sodio	66,0±5,0	66,0±5,0	65,0±6,4	63,9±4,69
	Gasoil	4,8±11,7	2,4 ± 5,8	2,4±5,8	0,8±1,94
	Oliva	10,0±15,6	10,0±15,6	8,9±13,8	3,3±8,16
MR2-18 (FMR)	Glucosa	62,6±4,5	64,1±4,5	60,0±3,1	60,0±7,59
	Acetato de Sodio	26,3±3,3	21,3±3,6	16,1±4,7	13,1±2,25
	Gasoil	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
	Oliva	59,3±16,9	57,2±15,9	58,3±16,4	55,1±14,88

MR3-20 (FMS)	Glucosa	55,2±24,1	53,1±23,2	50,0±21,6	47,9±20,71
	Acetato de Sodio	18,3±28,3	16,2±25,2	16,2±25,2	12,9±20,03
	Gasoil	3,9±9,6	4,4±10,9	4,4±10,9	1,0±2,40
	Oliva	62,0±21,9	62,0±3,0	56,0±2,9	56,0±2,95
BR1-15 (FMT)	Glucosa	56,2±11,0	52,8±14,0	48,6±12,5	46,9±12,91
	Acetato de Sodio	62,6±16,5	60,0±17,6	57,5±16,1	54,1±19,49
	Gasoil	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
	Oliva	64,3±3,9	63,3±3,3	63,3±3,3	60,3±3,89
BR2-14 (FMU)	Glucosa	56,5±13,0	56,5±13,0	49,3±15,6	41,2±14,22
	Acetato de Sodio	48,6±16,5	48,6±16,5	33,9±19,3	28,8±16,55
	Gasoil	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
	Oliva	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
MR3-27 (FMV)	Glucosa	55,9±7,6	50,6±2,5	48,3±1,8	45,2±1,60
	Acetato de Sodio	73,0±6,5	65,3±4,3	65,3±4,3	65,3±4,26
	Gasoil	34,4±37,7	33,3±36,6	31,3±34,2	30,2±33,17
	Oliva	66,0±2,8	63,9±2,2	60,6±2,5	59,6±2,81
MN2-16 (FMW)	Glucosa	16,3±14,9	13,0±10,4	7,4±12,8	7,4±12,83
	Acetato de Sodio	65,0±2,4	55,6±2,2	55,6±2,2	54,6±3,12
	Gasoil	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
	Oliva	20,8±3,6	18,8±6,3	14,6±3,6	14,6±3,61
MN3-4 (FMX)	Glucosa	52,1±26,5	44,3±33,1	44,3±33,1	39,9±29,30
	Acetato	23,1±9,9	9,5±6,5	7,5±5,0	7,5±5,00
	Gasoil	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
	Oliva	58,4±9,3	54,0±7,2	55,1±5,8	52,9±6,62
MN3-1 (FMY)	Glucosa	70,9±4,8	68,7±5,7	63,5±7,5	62,5±5,79
	Acetato de Sodio	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
	Gasoil	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
	Oliva	60,1±2,5	59,1±2,6	59,1±2,6	55,9±4,66
MR1-2 (FMZ)	Glucosa	67,5±3,7	66,5±3,5	65,5±4,7	63,3±3,10
	Acetato de Sodio	59,7±10,3	52,2±8,2	50,1±9,4	49,0±7,23
	Gasoil	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
	Oliva	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,00
SDS	-	80±0,0	80±0,0	80±0,0	80±0,0

*Resultados en negro son los índices de emulsificación por encima del 40%

Anexo III. Resultados de las mediciones de tensión superficial (mN/m)

Cepas	Glucosa (mN/m)	Acetato de Sodio (mN/m)	Gasoil (mN/m)	Oliva(mN/m)
MN2-13 (FMA)	61,50±0,42	60,66±2,45	61,79±1,56	61,96±2,02
MR1-24 (FMC)	58,02±3,77	56,15±3,25	63,14±1,01	62,04±1,91
MR3-25 (FMD)	64,14±2,52	65,29±4,00	62,29±1,50	65,84±1,26
ER3-11 (FME)	42,29±3,59	54,85±2,81	58,35±2,46	45,27±5,22
BR2-26 (FMF)	42,29±3,59	54,85±2,81	58,35±2,46	45,27±5,22
MN3-5 (FMG)	47,34±3,78	65,99±1,59	62,02±2,12	46,33±1,90
MR3-26 (FMH)	48,72±3,38	54,39±3,09	61,28±3,01	53,47±5,62
MR1-25 (FMI)	29,58±3,79	56,66±1,94	58,10±3,39	57,34±2,59
BR1-16 (FMJ)	56,43±5,78	52,88±1,84	63,19±1,06	61,90±2,51
ER1-11 (FMK)	61,90±5,60	65,61±1,79	62,89±2,33	66,96±2,84
MR2-11 (FMM)	61,77±3,15	64,53±1,96	60,91±2,80	61,57±5,33
BN1-7 (FMO)	57,61±2,71	60,62±2,84	64,53±1,86	66,22±1,82
BR1-11 (FMP)	56,79±4,20	60,37±0,96	64,38±2,38	55,25±1,14
BN1-1 (FMQ)	39,79±3,64	45,01±2,70	65,18±2,21	41,92±4,65
MR2-18 (FMR)	39,39±3,93	48,44±3,24	63,09±3,28	42,34±3,73
MR3-20 (FMS)	66,88±4,35	56,71±4,08	65,72±2,99	33,06±0,44
BR1-15 (FMT)	42,65±6,67	45,00±4,28	65,96±3,02	53,98±2,26
BR2-14 (FMU)	42,28±16,75	63,58±1,26	65,79±3,50	64,59±2,32
MR3-27 (FMV)	54,13±4,14	52,01±1,77	55,75±2,62	44,99±6,24
MN2-16 (FMW)	64,75±2,20	66,03±1,75	61,13±2,17	46,63±2,85
MN3-4 (FMX)	30,39±1,79	56,51±2,13	59,01±2,81	24,98±0,85
MN3-1 (FMY)	39,93±7,83	67,82±5,99	49,81±4,31	39,72±4,68
MR1-2 (FMZ)	64,34±5,43	65,61±1,53	66,26±1,07	60,73±4,49
Medios sin inocular	65,71±1,60	66,56±2,36	55,65±1,09	61,33±5,47
Agua destilada	70±1,01			

Anexo IV. Resultados de los métodos de detección a nivel de respuesta de todas las cepas bajo las cuatro fuentes de carbono.

	Nivel de respuesta	Glucosa		Acetato de Sodio		Gasol		Aceite de Oliva	
		# de cepas	% de cepas	# de cepas	% de cepas	# de cepas	% de cepas	# de cepas	% de cepas
E% ^a	-	3	13%	10	43%	23	100%	13	57%
	+	0	0%	3	13%	0	0%	1	4%
	++	1	4%	0	0%	0	0%	0	0%
	+++	19	83%	10	44%	0	0%	9	39%
BATH ^b	-	22	96%	23	100%	22	96%	19	83%
	+	1	4%	0	0%	1	4%	1	4%
	++	0	0%	0	0%	0	0%	3	13%
	+++	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Parafilm ^c	-	13	57%	22	96%	22	96%	14	61%
	+	3	13%	1	4%	1	4%	3	13%
	++	5	22%	0	0%	0	0%	4	17%
	+++	2	9%	0	0%	0	0%	2	9%
DC ^d	-	13	57%	21	91%	21	91%	9	39%
	+	4	17%	2	9%	1	4%	9	39%
	++	6	26%	0	0%	1	4%	4	17%
	+++	0	0%	0	0%	0	0%	1	4%
OSM ^e	-	11	48%	16	70%	21	91%	12	52%
	+	11	48%	6	26%	2	9%	7	30%
	++	1	4%	1	4%	0	0%	2	9%
	+++	0	0%	0	0%	0	0%	1	4%
	++++	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	<++++	0	0%	0	0%	0	0%	1	4%
SFT ^f	-	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	+	12	52%	20	87%	22	96%	14	61%
	++	6	26%	3	13%	1	4%	6	26%
	+++	5	22%	0,00	0%	0	0%	3	13%

^a (-) no productora de espuma, (+) índice de $\geq 40\%$ a las 48 horas, (++) índice de $\geq 40\%$ a las 72 horas, (+++) índice de $\geq 40\%$ a las 96 horas.

^b (-) 0-39% porcentaje de adsorción de las células; (+) 40-59% porcentaje de adsorción de las células; (++) 60-89% porcentaje de adsorción de las células; (+++) >90% de porcentaje de adsorción de las células

^c (-) no cambia su forma; (+) la gota “colapsa” al 1’; (++) la gota “colapsa” a los 30’; (+++) la gota colapsa inmediatamente.

^d (-) sin dispersión de la gota; (+) poca dispersión de la gota; (++) mediana dispersión de gota; (+++) amplia dispersión de la gota.

^e (-) no forma halo de dispersión en el aceite; (+) dispersión de aceite con un halo de diámetro entre 0,5 cm < X < 0,9 cm; (++) diámetro de halo entre 1 cm < X < 1,5 cm; (+++) diámetro de halo entre 1,5 cm < X < 2,1 cm; (++++ diámetro de halo entre 2,1 cm < X < 3 cm; (<++++ diámetro de halo >3 cm.

^f (-) no hay actividad surfactante; (+) tensión superficial entre 51-70 mN/m; (++) tensión superficial entre 41-50 mN/m; (+++) tensión superficial ≤ 40 mN/m.

Anexo V. Resultados según de los métodos de comportamiento específico

Aislados Bacterianos	Actividad Hemolítica	Agar Azul (CTAB)	Agar Azul (SDS)	Producción de Lipasa
MN2-13 (FMA)	-	-	-	+++
MR1-24 (FMC)	++	-	-	-
MR3-25 (FMD)	+++	+	+++	-
ER3-11 (FME)	+++	-	-	-
BR2-26 (FMF)	+++	-	-	+
MN3-5 (FMG)	+++	-	-	++
MR3-26 (FMH)	-	-	-	-
MR1-25 (FMI)	++++	-	-	++
R1-16 (FMJ)	-	-	-	-
ER1-11 (FMK)	-	++	-	-
MR2-11 (FMM)	+++	++	+++	-
BN1-7 (FMO)	++	-	-	-
BR1-11 (FMP)	++	-	-	-
BN1-1 (FMQ)	+++	-	-	-
MR2-18 (FMR)	+++	-	-	++
MR3-20 (FMS)	+++	+	+++	++
BR1-15 (FMT)	+++	-	-	++
BR2-14 (FMU)	++	-	-	-
MR3-27 (FMV)	+++	+	-	+++
MN2-16 (FMW)	++	+	+++	-
MN3-4 (FMX)	+++	+++	+	++
MN3-1 (FMY)	+++	-	-	++
MR1-2 (FMZ)	+++	-	-	-

Anexo VI. Resultados de los métodos cualitativos y cuantitativo de la cepas seleccionadas para la incubación de los 3 días

Cepas	Fuente de Carbono	OSM (cm ²)		BATH (%)		Parafilm		DC		TS (mN/m)	
		3 días	7 días	3 días	7 días	3 días	7 días	3 días	7 días	3 días	7 días
BR2-26	Glucosa	0,5±0,1	1,18±0,23	23,06±2,1	0,0±0	+	++	++	+	62,69±2,90	42,29 ± 3,59
	Acetato	0,27±0,23	0,42±0,26	22,34±0,36	0,0±0	-	-	+	-	64,27±1,74	54,85 ± 3,033
	Gasoil	0,37±0,058	0±0	0±0	-	-	-	-	-	63,40±2,11	58,35 ± 2,66
	Oliva	0,7±0,17	0,23±0,14	10,85±2,78	0,0±0	++	-	++	-	52,64±2,67	43,37 ± 7,2
MR1-25	Glucosa	1,5±0,1	0,77±0,14	51,81±4,43	0,0±0	++	+	+++	+	32,72±1,81	29,58 ± 3,77
	Acetato	0,33±0,06	0,48±0,04	57,42±2,04	0,0±0	+	+	+	-	67,84±4,2	56,66 ± 1,94
	Gasoil	0,13±0,12	0±0	0±0	0,0±0	-	-	-	-	60,90±1,42	58,10 ± 3,39
	Oliva	2,2±0,46	0,32±0,16	0±0	-	++	-	+++	+	48,41±2,39	47,36 ± 8,61
MN3-4	Glucosa	3,23±0,25	0,7±0,2	0±0	-26,88±6,7	++	++	+++	++	27,31±0,44	30,39 ± 1,71
	Acetato	0,4±0,1	0,25±0,14	17,18±0,75	-	-	-	+	+	68,06±1,17	56,46 ± 2,08
	Gasoil	0,4±0	0,22±0,13	0±0	0,0±0	-	-	-	-	65,48±0,41	59,47 ± 2,79
	Oliva	2,2±0,1	5,67±0,44	0±0	0,0±0	++	++	+++	+++	31,95±0,62	24,64±0,48
MN3-1	Glucosa	0,37±0,12	0,77±0,15	52,69±4,43	0,0±0	+	+	++	+	43,27±6,80	64,59±1,55
	Acetato	0,27±0,23	0,47±0,052	63,04±0,31	0,0±0	-	-	+	-	61,86±5,25	60,94±1,50
	Gasoil	0,17±0,15	0,52±0,08	0±0	0,0±0	-	-	-	+	55,36±0,99	64,10±2,31
	Oliva	2±0,1	2,07±0,49	58,49±0,87	9,22±13,0	++	+	++	+	41,97±0,39	43,05±2,34

Anexo VII. Resultados del índice de emulsificación (%) de las cepas seleccionadas para la incubación de los 3 días

Aislado Bacteriano	Fuente de Carbono	3días	7días	3días	7días	3días	7días	3días	7días
		24h		48h		72h		96h	
BR2-26	Glucosa	55,3±1,7	36,7±15,6	51,1±1,9	36,7±15,6	51,0±1,9	32,1	51,0±1,9	24,7
	Acetato de Sodio	15,6±26,9	29,2±16,6	15,6±26,9	29,2±16,6	15,6±26,9	22,9	15,6±26,9	14,6
	Gasoil	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	Oliva	59,7±13,8	72,2±3,16	55,4±8,5	72,2±3,1	53,3±8,5	70,1	51,1±8,5	69,1
MR1-25	Glucosa	60,02,1	63,2±10,6	60,0±2,1	51,7±13,0	60,0±2,1	43,2	60,0±2,1	41,1
	Acetato de Sodio	0,0±0,0	16,6±5,3	0,0	14,5±5,3	0,0	13,5	0,0	12,4
	Gasoil	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	Oliva	61,2±15,9	72,1±2,2	59,1±13,4	66,3±2,2	59,1±1,01	65,4±3,1	40,8±2,9	63,5±,9
MN3-4	Glucosa	63,9±2,4	48,6±28,5	61,7±1,4	44,3±1,4	61,7±1,4	44,3±1,4	59,6±1,4	39,9±1,4
	Acetato de Sodio	0,0±0,0	23,1±9,8	0,0±0,0	9,5±9,8	0,0±0,0	7,5±9,8	0,0±0,0	7,5±9,8
	Gasoil	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	Oliva	70,33±2,6	58,4±9,2	63,9±2,4	54,0±9,2	63,9±2,4	55,1±9,2	59,7±2,4	52,9±9,2
MN3-1	Glucosa	70,83±2,6	70,9±4,7	68,8±0,0	68,7±4,7	68,8±0,0	63,5±4,7	68,8±0,0	62,5±4,7
	Acetato de Sodio	62,7±3,9	0,0±0,0	62,7±3,9	0,0±0,0	62,7±3,9	0,0±0,0	60,6±3,9	0,0±0,0
	Gasoil	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	Oliva	23,0±3,9	60,1±2,5	20,9±4,5	59,1±2,5	14,8±4,5	59,1±2,5	14,8±4,5	55,9±2,5

Anexo VIII. Matriz de similitud de Pearson.

	Hemólisis	CTAB	SDS	Lipasa	Espuma	BATH	E%	Parafilm	DC	OSM	SFT
Hemólisis	1,000										
CTAB	0,203	1,000									
SDS	0,175	0,615	1,000								
Lipasa	0,332	0,093	-0,135	1,000							
Espuma	0,124	0,019	0,040	0,071	1,000						
BATH	0,178	0,016	-0,012	-0,091	-0,055	1,000					
E%	-0,158	-0,085	-0,070	-0,091	-0,079	-0,194	1,000				
Parafilm	0,233	0,178	-0,074	0,122	0,113	0,282	0,043	1,000			
DC	0,273	0,219	-0,018	0,225	0,081	0,295	-0,113	0,688	1,000		
OSM	0,287	0,222	0,069	0,334	0,128	0,270	-0,103	0,547	0,590	1,000	
SFT	0,305	0,131	-0,077	0,278	0,165	0,465	-0,150	0,755	0,723	0,598	1,000

Anexo IX. Matriz de similitud de Spearman.

	Hemólisis	CTAB	SDS	Lipasa	Espuma	BATH	E%	Parafilm	DC	OSM	SFT
Hemólisis	1										
CTAB	0,055	1									
SDS	0,034	0,98	1								
Lipasa	0,522	-0,028	-0,08	1							
Espuma	0,098	0,066	0,07	0,144	1						
BATH	-0,156	-0,025	0,006	-0,113	0,05	1					
E%	0,192	-0,007	-0,003	0,056	-0,247	-0,166	1				
Parafilm	0,254	0,042	0,005	0,104	-0,036	-0,039	0,178	1			
DC	0,318	0,109	0,069	0,233	-0,038	-0,203	0,267	0,627	1		
OSM	0,226	0,079	0,064	0,308	-0,16	0,009	0,444	0,4	0,491	1	
SFT	-0,302	0,111	0,167	-0,341	0,091	0,163	-0,361	-0,551	-0,64	-0,512	1

Anexo X. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas sobre los 14 aislados bacterianos con potencial de producción de biosurfactantes

	ER3-11 (FME)	BR2-26 (FMF)	MN3-5 (FMG)	MR3-26 (FMH)	MR1-25 (FMI)	BN1-1 (FMQ)	MR2-18 (FMR)	MR3-20 (FMS)	BR1-15 (FMT)	BR2-14 (FMU)	MR3-27 (FMV)	MN2-16 (FMW)	MN3-4 (FMX)	MN3-1 (FMY)
Gram	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Morfología	Bastón	Cocos cadenas	Bastón	Coco- bastón	Cocos	Cocos cadenas	Cocos cadenas	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Bastón	Bastón	Coco- bastón
Tioglicolato*	A	F	F	F	MA	F	A	A	A	F	A	F	A	F
Catalasa	+	+	+	+	++	+	+	+	+	++	++	++	++	++
Oxidasa	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Maconkey**	-	G	-	G	-	V+	V+	V+	V+	-	-	G	V	G
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidad	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
OF*** Glucosa		F	FG	FG	F	F	F	F	F	FG	F	F	O	F
OF Sacarosa	FG	F	F	FG	F	F	F	F	F	F	-	F	-	F
OF Lactosa	FG	-	F	F	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-
H ₂ S	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gas	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Fructosa	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Maltosa	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
Manitol	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
Inositol	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Xilosa	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
Bilis esculina	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Gelatina	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Almidón	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Rojo Metilo	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornitina	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Lisina	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Arginina	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
Uso de Citrato	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
Urea	-	+		+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

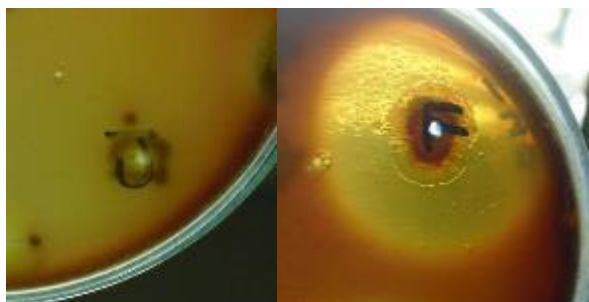
*A=Aerobio; F= facultativo; MA=microaerobio

**G=crecimiento de colonias rosadas o violetas; V+=Crecimiento colonias pardas o transparentes; V+=crecimiento rosado con bordes verdes; V=crecimiento rosado o violeta; V-
=crecimiento colonias transparentes

***F=fermentación; FG=fermentación con gas; O=oxidativa

Anexo XI. Resultados de la actividad microbiana (cm²) observada por los distintos biosurfactantes producidos por los aislado bacterianos

Aislado Bacteriano	<i>S.epidermis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>S. Enteridis</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Candida</i> sp	<i>Criptococcus</i> sp	<i>Geotricum</i> sp	<i>A. niger</i>	<i>Penicillium</i> sp	<i>Fusarium</i> sp
MN3-5 (FMG)	0,45±0,07	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,25±0,21	0,20±0,00	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
MR3-26 (FMH)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,45±0,07	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
MR1-25 (FMI)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,53±0,06	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
BN1-1 (FMQ)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,57±0,23
MR2-18 (FMR)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,85±0,19
MR3-20 (FMS)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,47±0,12	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,47±0,14
MN3-4 (FMX)	1,45±0,07	0,95±0,07	0,25±0,07	1,00±0,00	0,80±0,14	0,75±0,21	0,00±0,0	0,65±0,07	0,1±0,0	0,10±0,04	0,77±0,23	0,50±0,26	0,53±0,21	0,10±0,00	1,80±0,07	0,0±0,0



A.

B.

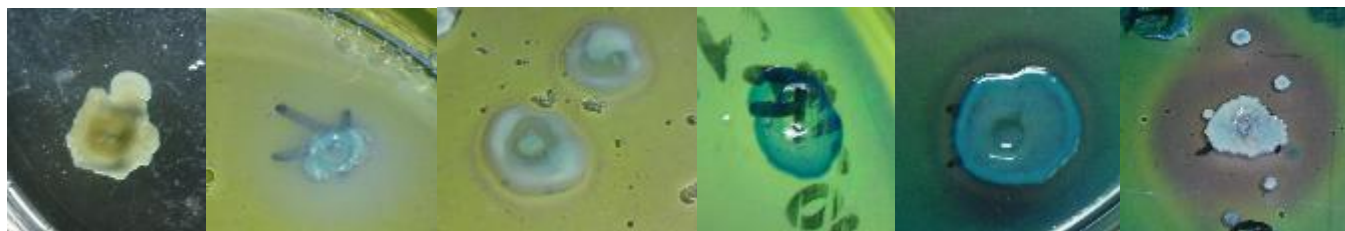
Anexo XII. Resultados de la actividad hemolítica. (A) Ausencia de actividad hemolítica (ausencia de halo transparente alrededor de la colonia); (B) Presencia de hemolisis completa en el medio (halo transparente alrededor de la colonia).



A.

B.

Anexo XIII. Resultados de la producción de lipasas. (A) Ausencia de lipasas en el medio (ausencia de halo tornasolado alrededor de la colonia); (B) Presencia de lipasas degradando los lípidos presentes en el medio (presencia de halo tornasolado alrededor de la colonia).



A.

B.

C.

D.

E.

F.

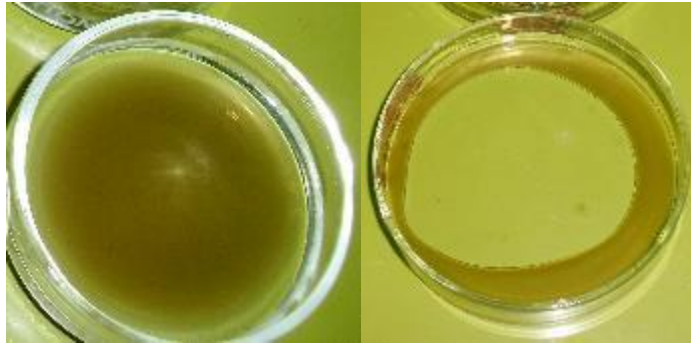
Anexo XIV. Niveles de respuesta los aislados bacterianos en Agar Azul. Resultado de Agar Azul + CTAB (A), ausencia de algún tipo de pigmentación (-); pigmentos visibles en el pocillo (+); (C) pigmentos alejados del pocillo (+++). Resultados Agar Azul + SDS, (D) ausencia de algún tipo de pigmentación (-); (E) pigmentos visibles en el pocillo (+); (F) pigmentos alejados del pocillo (+++).



A.

B.

Anexo XV. Resultados encontrados en la medición de la actividad emulsificante (E%). (A) No hay formación de emulsión; (B) Formación de emulsión, con apariencia de espuma “cremosa”, con un índice de emulsión superior al 40%.



A.

B.

Anexo XVI. Resultados encontrados en la dispersión de aceite (OSM). (A) No se observa dispersión sobre la capa de aceite; (B) Formación de dispersión mediante la aparición de un halo en el centro de la capa de aceite, a mayor diámetro presente el halo, mayor será la concentración del biosurfactante.



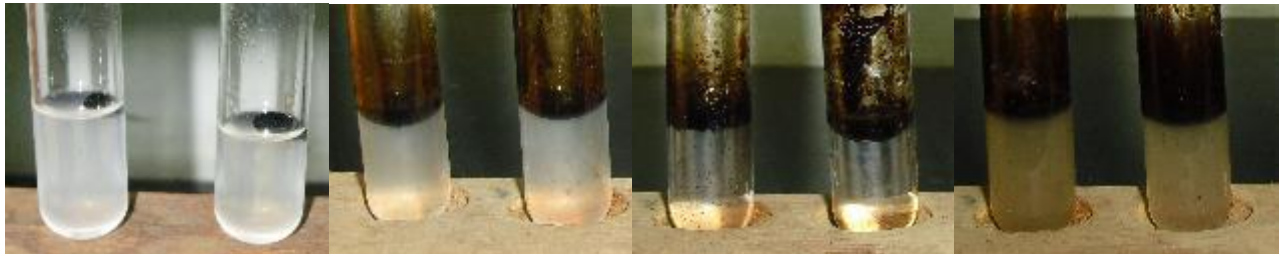
A.

B.

C.

D.

Anexo XVII. Resultados encontrados en Prueba de Parafilm (A) Colapso de la gota (pierde su forma y se vuelve aplanada) inmediatamente, vista desde arriba (A) y vista periférica (B); Comportamiento del colapso de la gota a en un minuto vista desde arriba (C) y vista periférica (D).



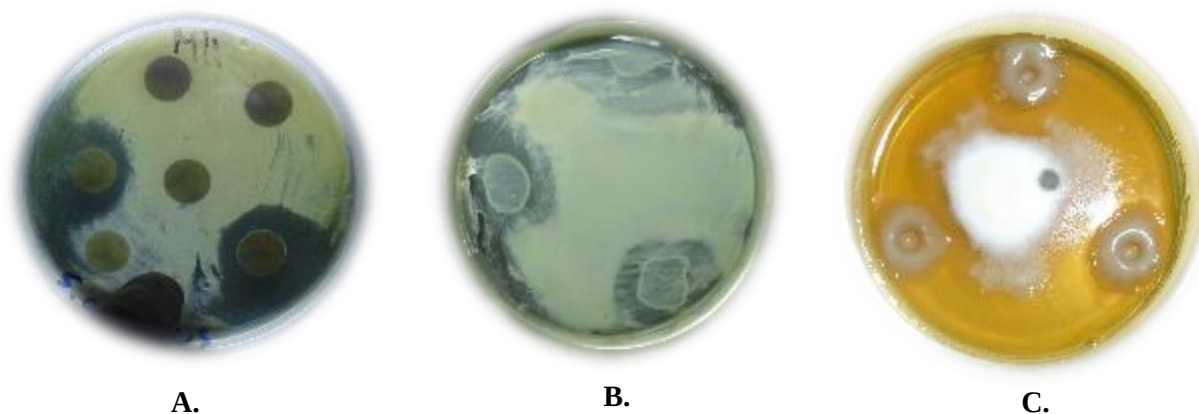
A.

B.

C.

D.

Anexo XVIII. Resultados encontrados en obtenidos de la prueba de BATH, antes y después de la agitación de la suspensión bacteriana (solución acuosa) con los 150 μ l de crudo (solución hidrofóbica). (A) Solución acuosa previa a la agitación crudo; Tras la agitación tenemos que: (B) La suspensión bacteriana no mostro una alta afinidad por el crudo, por lo tanto no se observó un descenso significativo en la turbidez de la solución acuosa; (C) La suspensión bacteriana mostro cierta afinidad por la solución hidrofóbica, lo cual se traduce en un descenso significativo de la turbidez de la solución acuosa; (D) En ocasiones las gotas del crudo no se separan de la solución acuosa, y aumentan la turbidez de la misma, generando así resultados negativos dentro del índice utilizado para el cálculo de la adherencia bacteriana.



Anexo XIX. Presencia de Actividad antimicrobiana, mediante la aparición de un halo transparente alrededor del filtro/pocillo que indica la inhibición del organismo patógeno seleccionado. (A) Actividad antibacteriana del biosurfactante producido por las cepas MN3-4 y MN3-5 sobre el organismo patógeno *S. aureus*; (B) Actividad antifúngica del biosurfactante producido por la cepa MR3-26 sobre la levadura *Cryptococcus* sp.; (C) Actividad antifúngica del biosurfactante producido por la cepa MR2-18 sobre el organismo patógeno *Fusarium* sp.



Anexo XX. Resultados en la doble difusión con agar (ADD) para determinar la carga iónica del biosurfactante. Los pocillos superiores están cubiertos con solución de SDS a 0,5g/l, mientras que los pocillos inferiores están cubiertos de una solución de CTAB 0,5g/l. En los pocillos del centro están las muestras de los biosurfactantes producidos por las cepas MN3-4 (pocillo del centro a la derecha, sobre la X) y la cepa MN3-1 (pocillo del centro a la izquierda, sobre la Y). El biosurfactante producido por la cepa MN3-4 es de carga aniónica, y en presencia de SDS precipitara y formara un precipitado (halo difuso alrededor del pocillo) orientado hacia su carga opuesta, mientras que en presencia de CTAB, su misma carga se repelerá. En el caso de la cepa MN3-1, esta al no presentar carga iónica no responderá a ninguno de los dos surfactantes y no formara precipitado.