

Desarrollo de un medio de cultivo para producir un biosurfactante bacteriano como coadyuvante en la degradación de crudo

Alvarado Carlos¹, Gómez Francisco¹, Moronta Daniel¹, Fernández Celeste^{1,2}, Labrador Henry^{1,2}

1 Centro de Investigaciones Químicas (CIQ). Laboratorio de Biotecnología Industrial (LABIOT). Facultad de Ingeniería. Universidad de Carabobo

2 Laboratorio de Petróleo, Hidrocarburos y Derivados (PHD). Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FaCyT). Universidad de Carabobo

Recibido:

Recibido en: 09/12/2025

| Aceptado:

Aceptado en: 06/04/2026

Contacto: Alvarado Carlos - claalmarza@gmail.com

Resumen

Como objetivo principal de la siguiente investigación se planteó desarrollar un medio de cultivo para producir un biosurfactante bacteriano como coadyuvante en la degradación del crudo. La investigación fue realizada en dos partes. En la primera parte se realizaron dos montajes experimentales, el primero de ellos consistió en tres biorreactores que contenían medio de cultivo, inóculo bacteriano con una densidad óptica comprendida entre 0,2 y 0,3 y aceite de soya como fuente de carbono a concentraciones de 3 g/L, 6 g/L y 8 g/L, dicho montaje se llevó a cabo por triplicado con el fin de determinar la concentración a la cual la *Pseudomonas aeruginosa* produciría la mayor cantidad de biosurfactante, dando como resultado que la concentración de 3 g/L fue la más apropiada para la producción del biosurfactante. Para el segundo montaje se tomaron otros tres biorreactores con el mismo contenido del montaje anterior, pero con tres fuentes de carbono que fueron crudo Furrial, aceite de motor y aceite de soya con la concentración previamente determinada, dicho montaje se realizó por triplicado con la finalidad de determinar la fuente de carbono a la cual la *P. aeruginosa* produciría la mayor cantidad de biosurfactante, siendo el aceite de soya la fuente de carbono más apropiada para producir biosurfactante. La identificación del biosurfactante producido se hizo mediante un análisis infrarrojo (FTIR). En la segunda parte se determinó la influencia del biosurfactante en la degradación del crudo mediante un diseño factorial donde se tomaron en cuenta las cantidades de inóculo bacteriano, biosurfactante y crudo Furrial, donde se concluyó mediante validación estadística que el incremento del volumen del biosurfactante aumenta el porcentaje de degradación del crudo.

Palabras Clave: Pseudomona aeruginosa, biosurfactante, degradación, crudo, inóculo bacteriano.

Development of a culture medium for the production of a bacterial biosurfactant as an adjuvant in crude oil degradation

Abstract

The main objective of the following study was raised develop a culture medium to produce a bacterial biosurfactant as an adjuvant in degradation in crude oil. The research was conducted in two parts. In the first part two experimental setups were performed, the first of which consisted of three bioreactors containing culture medium, bacterial inoculum with an optical density between 0.2 and 0.3 and soybean oil as carbon source at concentrations of 3 g/L, 6 g/L and 8 g/L, that assembly was carried out in triplicate in order to determine the concentration at which *Pseudomonas aeruginosa* produce as much biosurfactant, with the result that the concentration of 3 g/L was the most suitable for the production of biosurfactant, for the second assembly three bioreactors were taken with the same content from the previous installation but with three carbon sources, they were Furrial oil, motor oil and soybean oil with predetermined concentration, that assembly was performed in triplicate in order to determine the carbon source to which *P. aeruginosa* produce as much biosurfactant, soybean oil was the most likely source of carbon to produce biosurfactant. Determining the biosurfactant produced it was made by an infrared analysis (FTIR). In the second part the influence of biosurfactant was determined in the degradation of the oil by a factorial design which took into account the amounts of bacterial inoculum, biosurfactant and Furrial crude, which concluded by statistical validation that the increased volume of biosurfactant increases oil degradation percentage.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, biosurfactant, degradation, crude, bacterial inoculum.

Introducción

La contaminación ambiental ocasionada por el petróleo y productos petroquímicos (mezclas complejas de hidrocarburos) se reconoce como uno de los más graves problemas de la actualidad, sobre todo cuando se asocia a los derrames accidentales a gran escala.

Una vez derramado este contaminante en el suelo o en el agua, la mayoría de los compuestos alifáticos se pierden por volatilización, mientras que algunos hidrocarburos como los policíclicos persisten en la superficie, generando un gran impacto en virtud de sus efectos tóxicos y recalcitrantes para los seres vivos [1].

Se ha planteado la necesidad de buscar alternativas viables, ambientalmente sostenibles, simples y económicas, para la eliminación de los hidrocarburos presentes en los suelos. Aparecen así las técnicas de biorremediación, que consisten en hacer uso de microorganismos, los cuales son capaces de soportar las condiciones de los yacimientos y con habilidad para sintetizar productos químicos (gases, biopolímeros, compuestos orgánicos tensoactivos, etc.), que disminuyen la gravedad y viscosidad de crudos. Esta premisa, nos permite mediante el uso de microorganismos realizar ensayos con la posibilidad de estimular yacimientos con estos productos metabólicos a fin de mejorar sus propiedades fisicoquímicas [2].

Los crudos son mezclas complejas de hidrocarburos (fundamentalmente líquidos), y que pueden tener en disolución hidrocarburos gaseosos (crudos ligeros), o sólidos (crudos pesados). Estos hidrocarburos van desde sustancias simples altamente volátiles, hasta ceras complejas y compuestos asfálticos que no pueden ser destilados. Además, pueden combinarse con compuestos sulfurados y nitrogenados de carácter orgánico, compuestos oxigenados, como los ácidos grasos, y otros elementos como oxígeno, nitrógeno,

vanadio, níquel, sales minerales etc. [3]

Con respecto a la situación antes planteada se considera producir un biosurfactante bacteriano que coadyuve a degradar el crudo Furrial mediante la formulación de distintos medios de cultivo tomándose en consideración el tipo de fuente de carbono y su concentración, esto con el propósito de verificar y observar cuál es el medio más conveniente para que dicha producción ocurra en mayor proporción y de la mejor manera posible. El microorganismo a utilizar es la bacteria *P. aeruginosa*. Además de esto se tomaron en cuenta las cantidades de crudo, biosurfactante e inóculo para determinar la degradación del crudo Furrial en presencia del biosurfactante producido.

Materiales y métodos

Lugar de la investigación

Los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Industrial (LABIOT), adscrito al Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la Universidad de Carabobo, Valencia, Estado Carabobo.

Material biológico

La cepa bacteriana fue *P. aeruginosa* donada por la empresa PROTINAL, C.A. Inicialmente, esta se encontraba conservada en placas de Petri con agar nutritivo compuesto por en 5.0 g de extracto de levadura, 3.0 g de extracto de carne, 8.0 g de cloruro de sodio y 15.0 g de agar por cada litro de agua purificada.

Material para biodegradación

El crudo Furrial fue donado del Laboratorio PHD de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo. Es procedente de la Faja Petrolífera del Orinoco, Venezuela.

Preparación del inóculo

A partir de la cepa de *P. aeruginosa* conservada en agar nutritivo suplementado con glicerol, se recolectó material biológico mediante raspado superficial para su activación en 5 mL de caldo nutritivo, manteniéndose en reposo a 37 °C durante 15 minutos para su homogeneización. Posteriormente, esta suspensión se utilizó para realizar una siembra masiva en superficie sobre placas de agar nutritivo modificado cuya composición es (g/L): 2,50 de extracto de levadura; 8,00 de caldo nutriente; 1,00 de glucosa; 15,00 de agar nutriente y agua destilada. Dichas placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas hasta obtener un crecimiento abundante. Finalizado este periodo, se realizó un lavado de la superficie del agar con 3 mL de solución fisiológica, empleando un asa de siembra para desprender y recolectar la biomasa, la cual fue concentrada en una fiola de 50 mL para conformar el inóculo final.

Producción del biosurfactante bacteriano

El medio de cultivo empleado consistió de una solución de macronutrientes cuya composición fue la siguiente en gramos por litro: 4,00 de NaNO_3 , 1,00 de NaCl , 1,00 de KCl , 0,10 de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,00 de KH_2PO_4 , 3,00 de K_2HPO_4 y 0,20 de MgSO_4 . Y otra solución de micronutrientes: (g/L) 0,001 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,080 de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,750 de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,080 de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,075 de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,150 de H_3BO_3 y 0,050 de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [4]

Se realizaron cultivos sumergidos en fiolas de 250 mL con 50 mL de solución de macronutrientes y 0,50 mL

de micronutrientes, con una densidad óptica ajustada del microorganismo comprendida entre 0,2 y 0,3 medida a 620 nm.

Una vez establecida la cantidad de inóculo, se realizaron experimentos con biorreactores que consistieron en fiolas de 250mL, con la fuente de carbono, 50,0 mL de solución de macronutrientes, 0,50 mL de solución de micronutrientes y la cantidad de inóculo establecida anteriormente. Se llevaron a cabo dos montajes experimentales: (1) en el primero de ellos, se trabajó con tres concentraciones diferentes de fuente de carbono (aceite de soya) por triplicado. Las concentraciones fueron 3, 6 y 8 g/L (Tabla 1). En el segundo se evaluaron dos fuentes de carbono adicionales con la mejor concentración obtenida en el primer experimento (Tabla 2).

Los biorreactores fueron cubiertos con tapones hechos de algodón y gasa, incubados en agitación a 150rpm a 37°C durante 24 h [5]. Al finalizar el tiempo de cultivo se extrajeron los biorreactores del incubador orbital y el cultivo fue centrifugado a 14.000 rpm y a 4°C durante 15 minutos, y el precipitado obtenido correspondió a la biomasa producida.

El pH del sobrenadante fue ajustado a 2 utilizando ácido sulfúrico concentrado, luego se conservó en la nevera toda la noche. Al día siguiente la solución fue centrifugada durante 15 minutos a 4°C y 14000 rpm, cuyo precipitado fue el biosurfactante; éste se extrajo del tubo de centrífuga con una solución 2:1 de cloroformo-etanol en vasos de precipitados previamente pesados en una balanza analítica, luego la solución fue calentada para evaporar el cloroformo-etanol, obteniéndose finalmente de esta manera una sustancia de apariencia oleosa y color miel la cual corresponde a los ramnolípidos (biosurfactante). Se preparó una mezcla en una proporción 1:2 (biosurfactante, sustancia oleosa: polvo seco de KBr), la cual fue triturada, homogeneizada y prensada hasta obtener una pastilla fina y transparente, adecuada para su análisis mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). Se cuantificó la masa de biosurfactante empleando la ecuación 1 [6].

$$B=(m_{rll}-m_{rv})/V_{mc} \times 1000 \quad (1)$$

Donde:

B: producción de biosurfactante (g/L)

m_{rll}: masa del recipiente lleno (g)

m_{rv}: Masa del recipiente vacío (g)

V_{mc}: Volumen del medio de cultivo (mL)

Tabla 1. Diseño experimental en bloques al azar para evaluar la concentración de aceite de soya. Experimentos por triplicado: 3x3= 9 experimentos (x triplicado).

Factor	Nivel de concentración (g/L)	Variable de respuesta
Concentración de aceite de soya	3	Biosurfactante producido (g/L)
	6	
	9	

Tabla 2. Diseño experimental en bloques al azar para evaluar el tipo de fuente de carbono a una concentración de 3 g/L. Experimentos por triplicado: 3x3= 9 experimentos (x triplicado).

Factor	Nivel	Variable de respuesta
Fuente de carbono	Aceite de Soya Crudo Furrial Aceite Motor Usado	Biosurfactante producido (g/L)

Para la selección del mejor medio de cultivo se validaron estadísticamente los datos obtenidos mediante análisis de varianza, basándose en la producción de biosurfactante obtenido en los montajes anteriores. Luego se produjo el biosurfactante con el mejor medio de cultivo para la biodegradación.

Caracterización del biosurfactante

Para la caracterización del biosurfactante se hizo un análisis de infrarrojo (FTIR) [7]

Proceso de biodegradación del crudo Furrial empleando el biosurfactante bacteriano

Esta fase experimental se llevó a cabo en dos partes, en la primera parte se utilizó el medio mineral descrito anteriormente y se controlaron dichas variables, las cuales fueron, volumen de inóculo bacteriano, volumen de biosurfactante producido en el objetivo anterior y masa del crudo Furrial a degradar. Todas las variables fueron agregadas a dos concentraciones diferentes con un punto central con un diseño factorial 2x2, el montaje consta de diez biorreactores donde se encuentran todas las variaciones posibles de dichas variables y dos blancos tal como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Diseño experimental factorial para evaluar la degradación del crudo Furrial. Experimentos por triplicado: $2 \times 2 \times 2 = 8$ + punto central $\times 2 = 10$ experimentos (x triplicado).

Factor	Nivel	Variable de respuesta
Cantidad de crudo CC (g)	0,4 0,8	Degradación (%)
Volumen añadido de biosurfactante VB (mL)	5 10	
Volumen añadido de inóculo VI (mL)	0,5 1,0	
Punto central (CC, VB, VI)	0,6 7,5 0,75	

En la segunda parte se varió la cantidad de biosurfactante añadido y se utilizó la menor cantidad de inóculo (0,5 mL) y la menor cantidad de crudo Furrial (8 g/L) (Tabla 4).

Tabla 4. Diseño experimental en bloques al azar para evaluar la biodegradación variando la cantidad de biosurfactante con 0,5 mL de inóculo añadido y 8 g/L de crudo Furrial. Experimentos por triplicado: $3 \times 3 = 9$ experimentos (x triplicado).

Factor	Nivel	Variable de respuesta
--------	-------	-----------------------

Volumen de Biosurfactante añadido, mL	15	Degradación (%)
	20	
	25	

Una vez culminado el proceso de incubación se vertieron los medios de cultivo contenidos en los biorreactores en embudos de separación con el fin de descartar la fase acuosa (Figura 1) y separar el crudo utilizando cloroformo como solvente extractor, el crudo fue recuperado en vaso de precipitados previamente pesados en una balanza analítica [8].

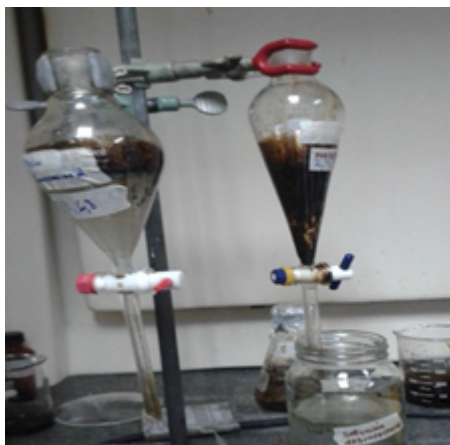


Figura 1. Separación líquida – líquido del crudo en el medio de cultivo

Luego de la extracción del crudo se esperó que el cloroformo se evaporara en los vasos de precipitados dentro de la campana extractora y posteriormente los vasos de precipitados llenos de crudo fueron pesados en una balanza analítica para calcular el porcentaje de degradación del crudo con la ecuación 2 [9].

$$\%Deg = (Mci - Mcf) / Mci \times 100$$

Donde:

Mci: Masa de crudo Furryal agregada a los biorreactores (g)

Mcf: Masa de crudo recolectada después de la separación (g)

%Deg: Porcentaje de degradación del crudo (%)

Resultados

A continuación, se presentan los resultados tras diseñar un medio de cultivo optimizado, que simula el hábitat natural y satisface las necesidades vitales del microorganismo para potenciar su crecimiento y cumplir su objetivo biotecnológico con alta eficiencia [10].

Producción del biosurfactante bacteriano

En las Figuras 2 y 3 se muestra la producción del biosurfactante y biomasa en gramos por litro, para la evaluación de la concentración de aceite de soya como fuente de carbono en la producción del biosurfactante bacteriano.

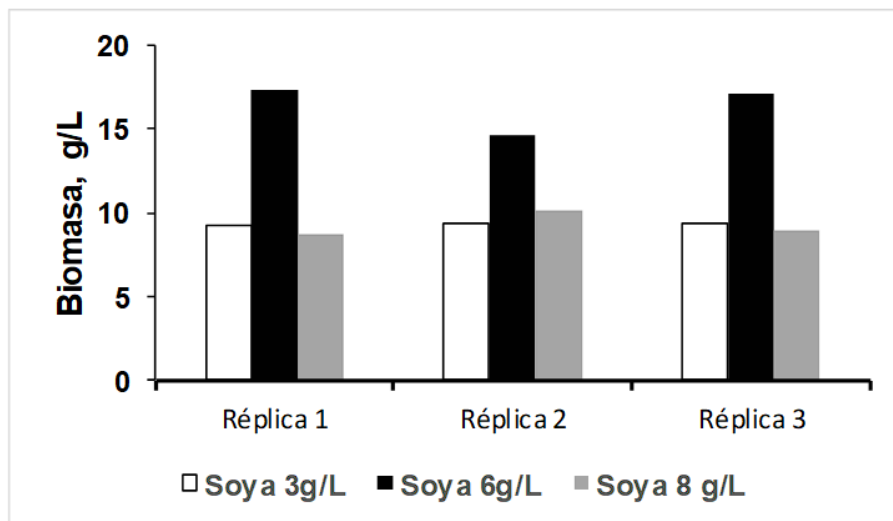


Figura 2: Biomasa producida a diferentes concentraciones de aceite de soya con *Pseudomonas aeruginosa*.

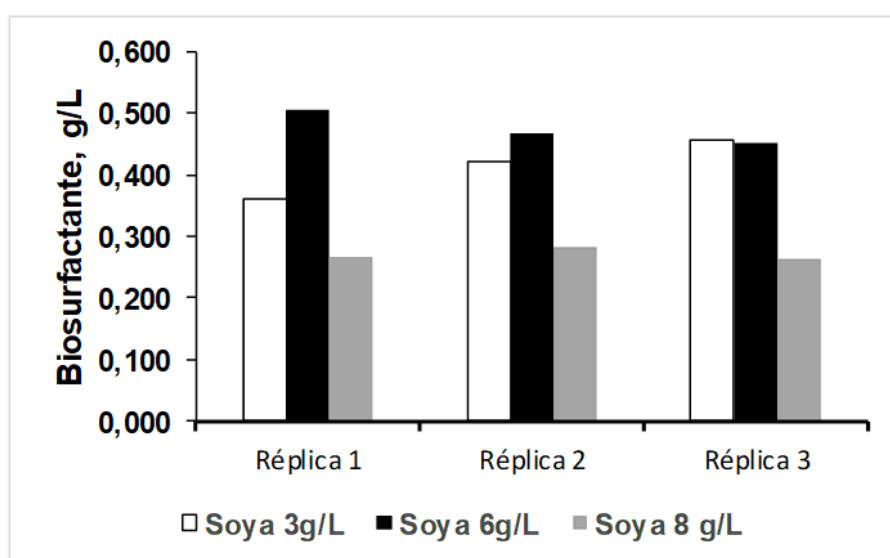


Figura 3: Producción de biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* en función de la concentración de aceite de soya.

Las Tablas 5 y 6 muestran el análisis de varianza para la producción de biosurfactante y biomasa en la evaluación de la concentración de aceite de soya como fuente de carbono.

Tabla 5. Análisis de Varianza para la producción de biosurfactante

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0652702	2	0,0326351	31,80	0,0006
Intra grupos	0,00615733	6	0,00102622		
Total (Corr.)	0,0714276	8			

Tabla 6. Análisis de Varianza para la producción de biomasa.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F
--------	-------------------	----	----------------	---------

Entre grupos	99,0779	2	49,538	51,36
Intra grupos	5,78733	6	0,964555	
Total (Corr.)	104,865	8		

Las Figuras 4 y 5 muestran los gráficos de medias para la producción de biomasa y biosurfactante, mostrando que las concentraciones 1 y 3 son estadísticamente equivalentes entre sí y diferentes a la concentración 2 para la biomasa, y las concentraciones 1 y 2 son estadísticamente equivalentes entre sí y diferentes a la concentración 3 para la producción de biosurfactante.

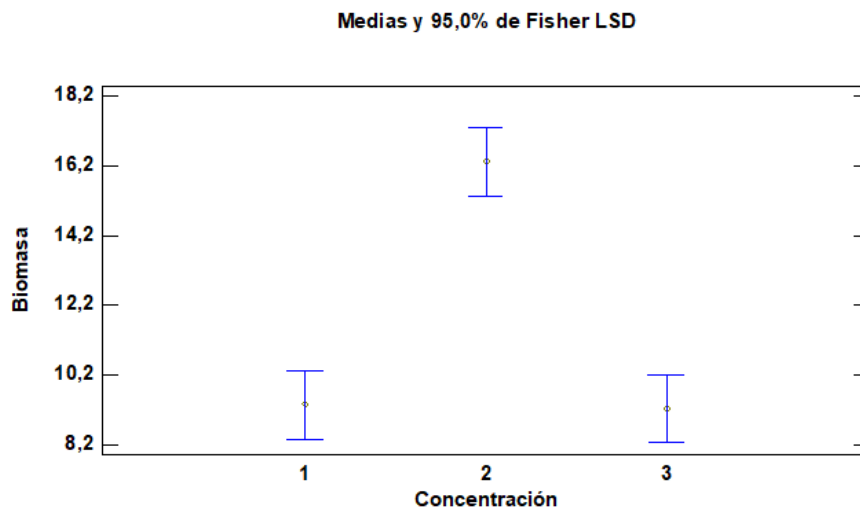


Figura 4: Gráfica de medias para la producción de biomasa con *P. aeruginosa*. Concentraciones de aceite de soya 1: 3g/L; 2: 6 g/L; 3: 8 g/L.

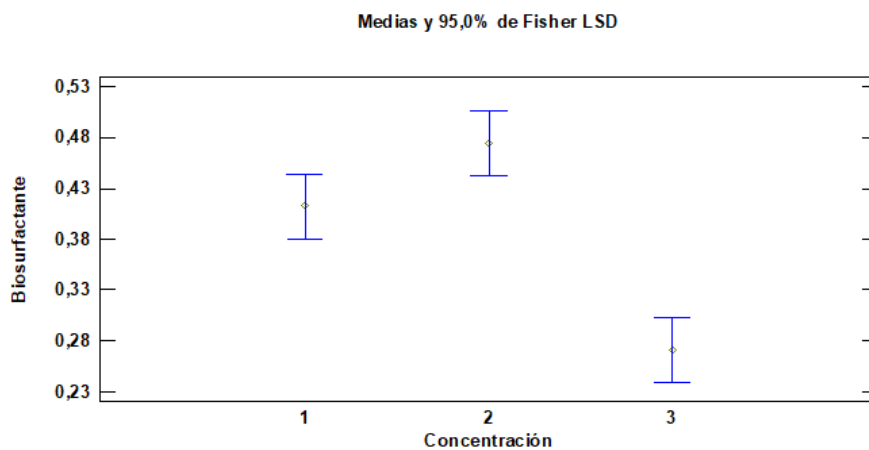


Figura 5: Gráfica de medias para la producción de biosurfactante con *P. aeruginosa*. Concentraciones de aceite de soya 1: 3g/L; 2: 6 g/L; 3: 8 g/L.

En la Tabla 7 se detallan los rendimientos globales obtenidos, donde se evidencia la relación estequiométrica entre la síntesis de biosurfactante y la generación de biomasa para cada concentración de aceite de soya evaluada.

Tabla 7. Rendimientos globales en evaluación de concentraciones de aceite de soya expresados en gramos de biosurfactante por gramos de biomasa, YP/X

Concentración de sustrato (g/L)	Rendimiento Global (Y P/X)
3	0,0444
6	0,0290
8	0,0293

En las Figuras 6 y 7 se muestra la producción del biosurfactante y biomasa en gramos por litro, para la evaluación de las distintas fuentes de carbono: soya, aceite de motor usado y crudo, en la producción del biosurfactante bacteriano.

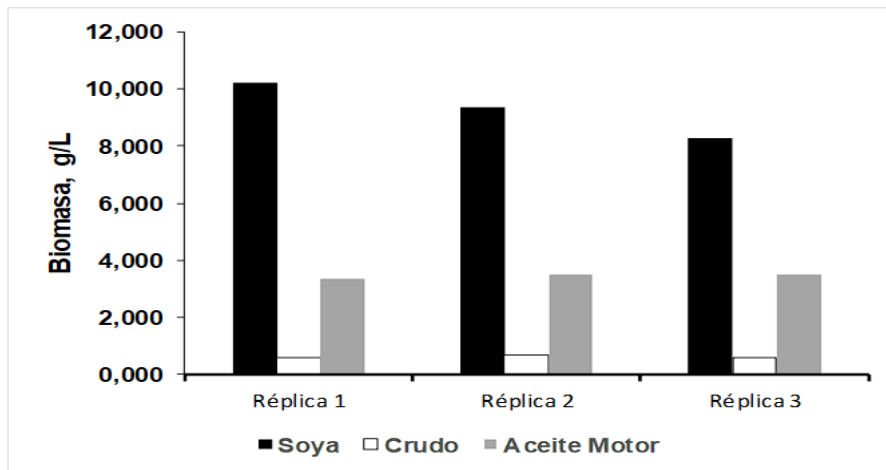


Figura 6: Biomasa producida con diferentes fuentes de carbono con *Pseudomonas aeruginosa*.

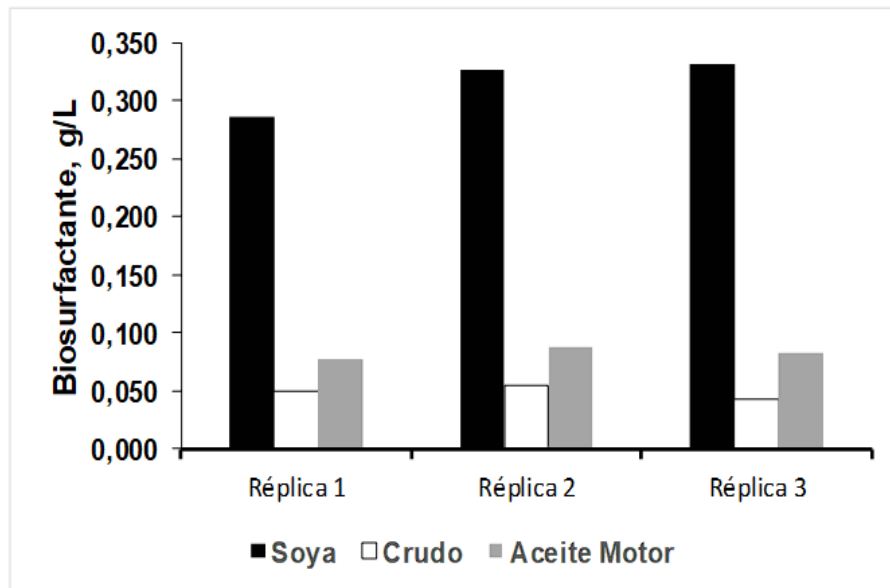


Figura 7: Biosurfactante producido con diferentes fuentes de carbono con *Pseudomonas aeruginosa*.

Las Tablas 8 y 9 muestran el análisis de varianza para la producción de biosurfactante y biomasa en la evaluación de las distintas fuentes de carbono. Estas muestran diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas ($p < 0,05$).

Tabla 8. Análisis de Varianza para la producción de biosurfactante

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,125736	2	0,062868	274,13	0,0000
Intra grupos	0,001376	6	0,000229333		
Total (Corr.)	0,127112	8			

Tabla 9. Análisis de Varianza para la producción de biomasa

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	117,472	2	58,7361	184,55	0,0000
Intra grupos	1,90961	6	0,318269		
Total (Corr.)	119,382	8			

Las Figuras 8 y 9 muestran los gráficos de medias para la producción de biomasa y biosurfactante, mostrando que las fuentes de carbono 2 (crudo Furrial) y 3 (aceite de motor usado) son estadísticamente equivalentes entre sí y distintas a la fuente 1 (aceite de soya) tanto para la producción de biomasa como de biosurfactante.

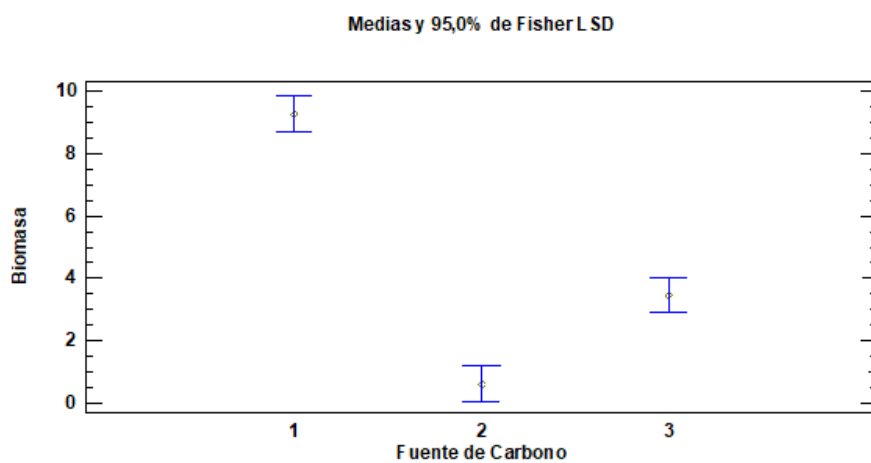


Figura 8: Gráfica de medias para la producción de biomasa con *P. aeruginosa*.

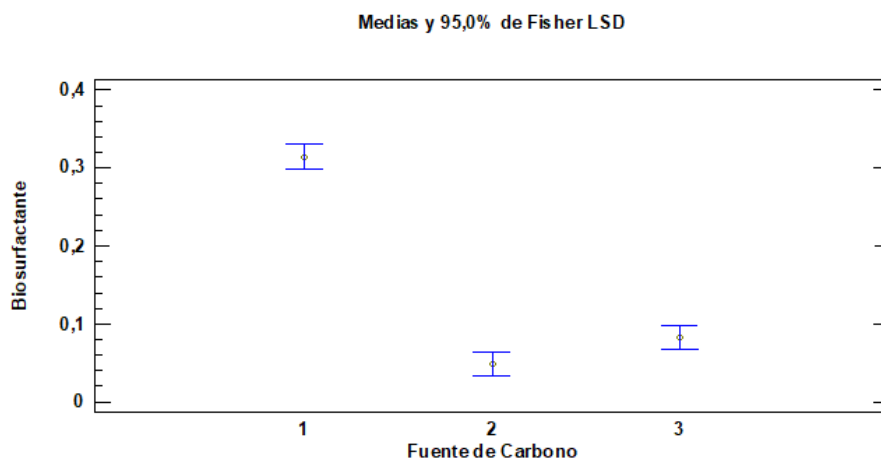


Figura 9: Gráfica de medias para la producción de biosurfactante con *P. aeruginosa*.

En la Tabla 10 se presentan los rendimientos globales de producto sobre biomasa (YP/X) obtenidos para las distintas fuentes de carbono, permitiendo contrastar la capacidad de biosíntesis de la cepa frente a sustratos de diversa naturaleza química y determinar el coeficiente de conversión específico para cada tratamiento.

Tabla 10. Rendimientos globales en evaluación de fuentes de carbono, expresados en gramos de biosurfactante por gramos de biomasa, Y P/X

Sustrato	Rendimiento Global (Y P/X)
Soya	0,0339
Crudo	0,0812
Aceite Motor	0,0239

En la Tabla 11 se resumen los diferentes reportes de producción de biosurfactante por la *P. aeruginosa*, según el tipo de fuente de carbono y la concentración de ésta.

Tabla 11. Reportes de producción de biosurfactante con *P. aeruginosa*.

Autor	Microorganismo	Fuente de Carbono	Concentración de fuente de carbono	Producción de biosurfactante(g/L)
Thavasi (2012) [11]	<i>P. aeruginosa</i>	Aceite de maní	2% v/v	8,6
		Aceite de motor usado		4,37
Yañes y Wong (2013) [12]	<i>P. aeruginosa</i>	Aceite de soya	-----	112
Joice y Parthasarathi (2014) [13]	<i>P. aeruginosa</i>	Glicerina	3,27 g/L	5,14
		Petróleo		2,50

Aceite de motor usado	4,99			
Rashedi et al. (2005) [14]	<i>P. aeruginosa</i>	Glicerina	Se varió desde 1 hasta 6 % v/v	La mayor producción fue de 2,8 g/L con 5% en concentración de fuente de carbono

Caracterización del biosurfactante bacteriano

Para la caracterización del biosurfactante se realizó un análisis de infrarrojo (FTIR) tal como se muestra en la Figura 10, en la cual se observan los valores de absorbancia correspondientes a la muestra, el valor de $1114,28 \text{ cm}^{-1}$ demuestra la presencia de ésteres alifáticos ya que el rango de valores para la presencia de dicha molécula es de 1070 cm^{-1} a 1150 cm^{-1} , el valor de $1714,28 \text{ cm}^{-1}$ evidencia que en la muestra estudiada existe un ácido carboxílico debido a que ésta molécula presenta valores entre 1700 cm^{-1} y 1725 cm^{-1} , el valor de $1466,66 \text{ cm}^{-1}$ está entre el rango de 1435 cm^{-1} y 1470 cm^{-1} rango que corresponde a la presencia de alcanos (CH_3), finalmente se observó el valor de $728,57 \text{ cm}^{-1}$, valor que entra al rango de alcanos $(-\text{CH}_2-)_n$ comprendido entre 720 cm^{-1} y 750 cm^{-1} .

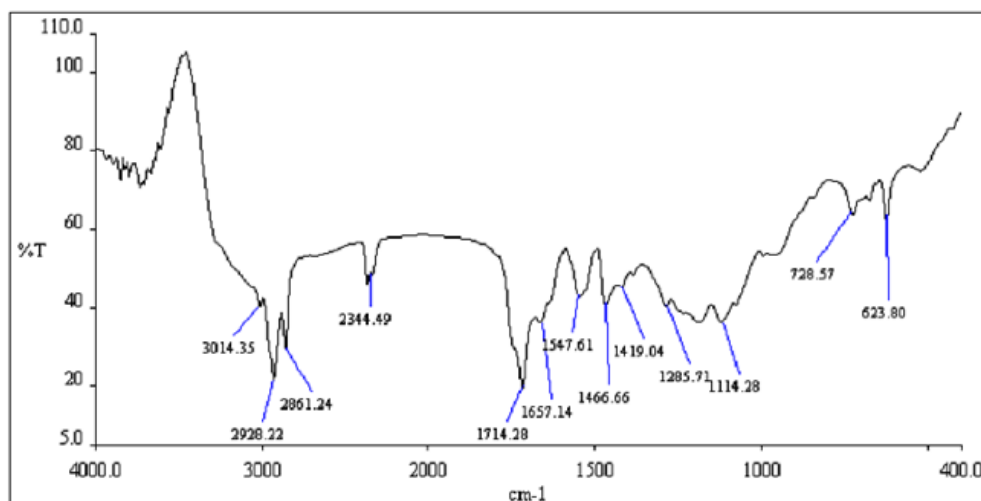


Figura 10: Resultados del análisis de Espectrometría de Infrarrojo con transformada de Fourier realizada al biosurfactante.

Proceso de biodegradación del crudo Furrial empleando el biosurfactante bacteriano

En la Tabla 12 se muestran los porcentajes de degradación de crudo incorporando el biosurfactante bacteriano producido por la *P. aeruginosa*, variando tanto las concentraciones de crudo Furrial a biorremediar, el volumen de biosurfactante y el inóculo.

Tabla 12. Diseño factorial 2x2 con punto central para evaluar la degradación del crudo Furrial con biosurfactante añadido.

Exp	Concentración Crudo (g/L)	Volumen añadido de biosurfactante (mL)	Volumen añadido de inóculo (mL)	% Degradación
1	8	5	0,5	35,99

2	8	10	0,5	29,21
3	17	5	1	9,32
4	8	5	1	9,90
5	17	5	0,5	2,01
6	8	10	1	18,63
7	17	10	0,5	26,45
8	17	10	1	17,49
9	13	7,5	0,75	25,56
10	13	7,5	0,75	23,94

En la Figura 11 se muestra el diagrama de Pareto del análisis estadístico del diseño factorial, Así, por tanto, se muestra la Figura 12 la gráfica de superficie de respuesta para la menor cantidad de inóculo añadida, en donde se visualiza la pendiente de ascenso de la degradación hacia la utilización de la menor cantidad de crudo (8 g/L) y mayor cantidad añadida de biosurfactante (10 mL).

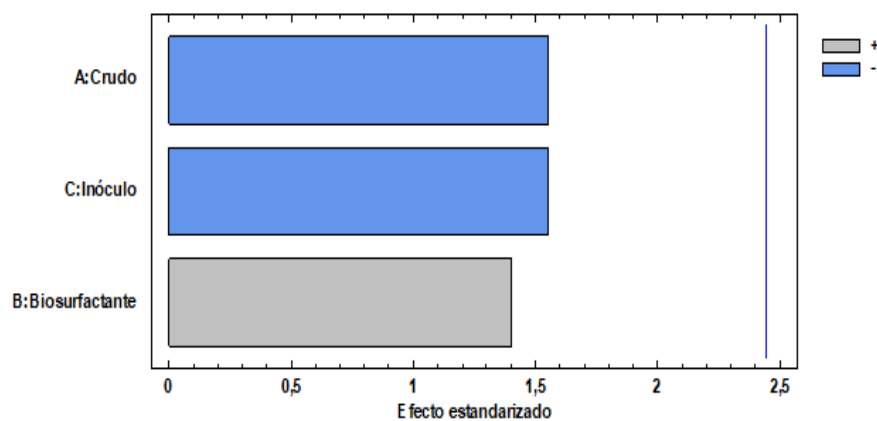


Figura 11: Diagrama de Pareto estandarizado para la degradación de crudo Furrial *P. aeruginosa*.

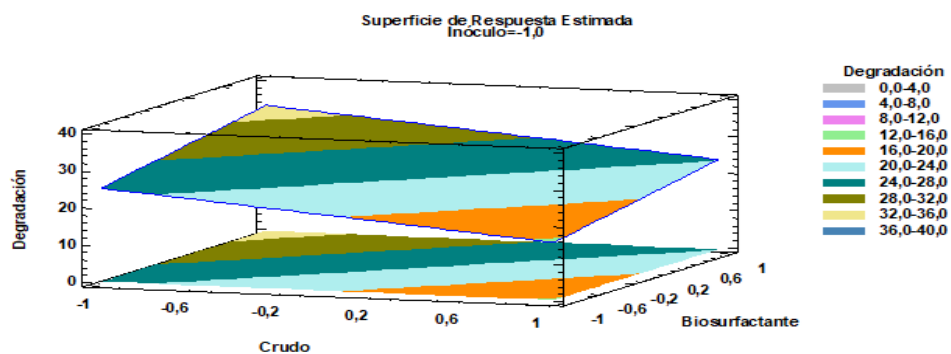


Figura 12: Superficie de respuesta estimada para la degradación de crudo Furrial *P. aeruginosa*.

En la Figura 13 se muestran los valores obtenidos para la degradación del crudo Furrial variando la cantidad añadida de biosurfactante, y usando las mejores condiciones anteriores (0,5 mL de inóculo y 8 g/L de crudo Furrial).

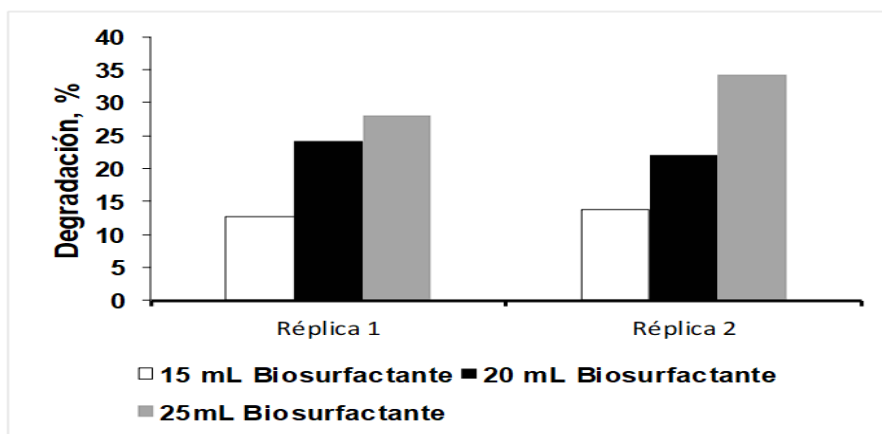


Figura 13: Valores para la degradación de crudo variando la cantidad de biosurfactante.

La Tabla 13 muestran el análisis de varianza para la degradación del crudo Furrial con la variación de biosurfactante añadido en los tratamientos. Se muestran diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($p < 0,05$).

Tabla 13. Análisis de Varianza para la degradación del crudo Furrial con la variación de biosurfactante añadido *P. aeruginosa*.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	322,955	2	161,477	21,80	0,0163
Intra grupos	22,2197	3	7,40655		
Total (Corr.)	345,174	5			

En la Figura 14 se muestra la gráfica de medias.

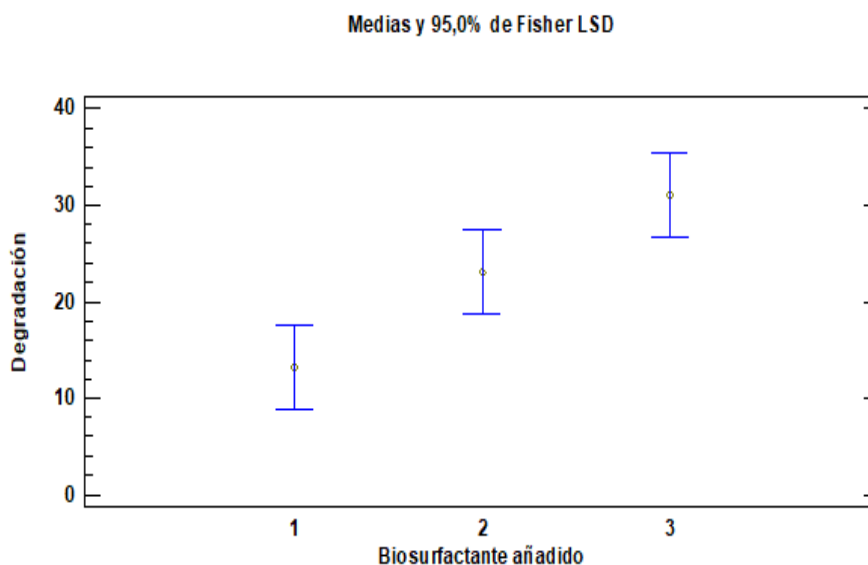


Figura 14: Gráfica de medias para la degradación del crudo Furrial con la variación de biosurfactante añadido con *P. aeruginosa*.

La Tabla 14 muestra la prueba de múltiples rangos para la degradación del crudo Furrial con la variación de biosurfactante añadido en los tratamientos. Se muestran grupos homogéneos para los niveles 1 (15 mL de biosurfactante añadido) y 2 y 3 (20 y 25 mL de biosurfactante añadido), lo que indica que los niveles 1 y 2, y 1 y 3 son diferentes estadísticamente ($p < 0,05$) (Tabla 14). Esto indica que las cantidades de biosurfactante de 20 y 25 mL son estadísticamente equivalentes, pudiendo sugerir emplear la menor cantidad. De igual manera se sugiere estudiar mayores cantidades añadidas y un método de purificación del biosurfactante que permita agregarlo en cantidades menores, en este caso la liofilización.

Tabla 14. Prueba de múltiples rangos para evaluar la degradación del crudo Furrial con biosurfactante añadido. Método: 95,0 porcentaje LSD, * indica una diferencia significativa.

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	2	13,2278	X
2	2	23,0522	X
3	2	31,1718	X

Contraste	Sig	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*	-9,82439	8,66103
1 - 3	*	-17,944	8,66103
2 - 3		-8,11957	8,66103

En la Tabla 15 se presentan los reportes de porcentaje de degradación del crudo obtenidos por diversos autores, detallando las condiciones operacionales de carga de inóculo, sustrato y concentración de biosurfactante que determinaron la eficiencia de cada proceso biotecnológico.

Tabla 15. Reportes de porcentaje de degradación del crudo.

Autor	Cantidad de inóculo (mL)	Cantidad de hidrocarburo (g)	Cantidad de biosurfactante (g/L)	Degradación (%)
Chen et al. (2012)	0,5	0,2	0	97,3
Aouad y Abbouni (2012)	1	1	0	88,5
Zhang et al. (2005)	-----	0,7	0,22	60

Discusión

Producción del biosurfactante bacteriano

Es pertinente precisar que, si bien la suplementación con 6 g/L de aceite de soya maximizó la productividad volumétrica de biomasa (16,321 g/L) y biosurfactante (0,474 g/L), el análisis de los coeficientes estequiométricos posiciona a la concentración de 3 g/L como la condición operacional óptima. Esta superioridad se fundamenta en el rendimiento global de producto sobre biomasa ($Y_{P/X}$), el cual alcanzó un valor de 0,0444 g/g (Tabla 8), lo que indica una canalización metabólica más eficiente hacia la síntesis del metabolito de interés por cada unidad de masa celular generada.

No obstante, al contrastar las diversas fuentes de carbono, se observó que el crudo Furrial presentó el rendimiento específico más elevado (0,081 g/g, Tabla 10). A pesar de este indicador, se seleccionó el aceite de soya para el escalamiento del proceso debido a que permitió obtener una mayor masa absoluta de biosurfactante y presentó propiedades reológicas y fisicoquímicas en la mezcla de reacción que simplificaron significativamente las operaciones unitarias de extracción y purificación.

Finalmente, al comparar estos resultados con la literatura consultada, se advierte que los niveles de producción fueron inferiores a otros reportes. Esta discrepancia es atribuible a que, a diferencia de las formulaciones optimizadas específicamente para la síntesis de biosurfactante descritas en dichos estudios, el presente medio de cultivo fue diseñado bajo criterios de versatilidad para la degradación de hidrocarburos.

Caracterización del biosurfactante bacteriano

Los valores de $1114,28 \text{ cm}^{-1}$ para la absorbancia presentes en la Figura 10, demuestra la presencia de ésteres alifáticos ya que el rango de valores para la presencia de dicha molécula es de 1070 cm^{-1} a 1150 cm^{-1} , el valor de $1714,28 \text{ cm}^{-1}$ evidencia que en la muestra estudiada existe un ácido carboxílico debido a que ésta molécula presenta valores entre 1700 cm^{-1} y 1725 cm^{-1} , el valor de $1466,66 \text{ cm}^{-1}$ está entre el rango de 1435 cm^{-1} y 1470 cm^{-1} rango que corresponde a la presencia de alcanos (CH_2), finalmente se observó el valor de $728,57 \text{ cm}^{-1}$, valor que entra al rango de alcanos $(-\text{CH}_2-)_n$ comprendido entre 720 cm^{-1} y 750 cm^{-1} [15]. Debido a la presencia de todas esas funciones orgánicas mencionadas se puede concluir la presencia de biosurfactante ramnolípido tal como se muestra en la Figura 15.

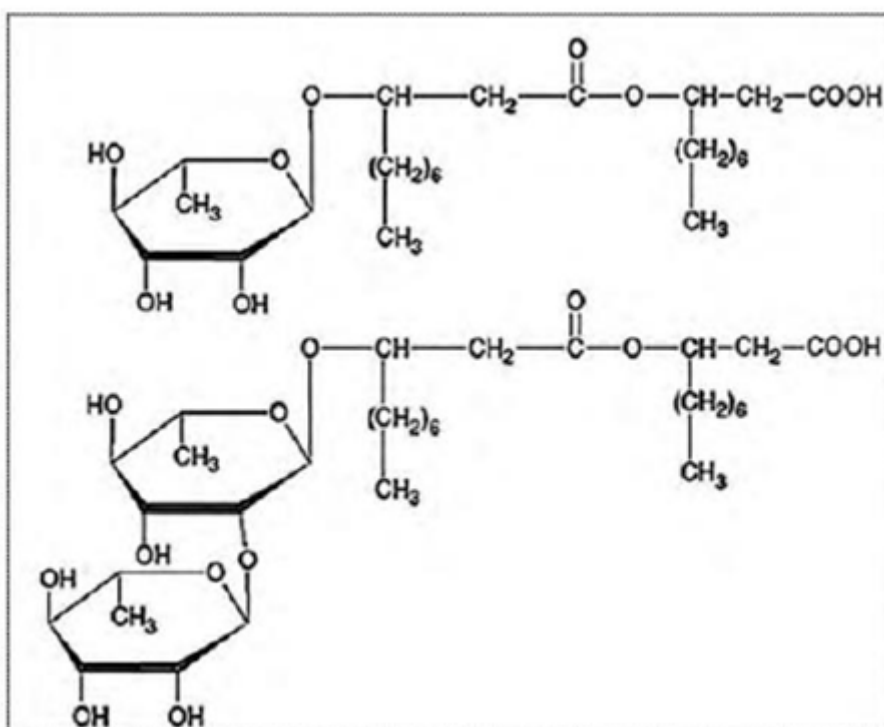


Figura 15: Representación molecular de mono-ramnolípidos (parte superior) y di-ramnolípidos (parte inferior) producidos por *P. aeruginosa* [7]

Proceso de biodegradación del crudo Furrial empleando el biosurfactante bacteriano

El mayor porcentaje de degradación es de 35,99 % y se obtuvo con la concentración de 8 g/L de crudo Furrial, 5 mL de biosurfactante añadido y 0,5 mL de inóculo añadido.

Al observar el diagrama de Pareto con respecto a estas variables mencionada anteriormente, indican que, a pesar de no existir diferencias significativas entre los factores evaluados, la tendencia de estos valores demuestra que la adición de biosurfactante aumenta la degradación del crudo Furrial e inóculo añadido produciéndose una biodegradación.

Estos valores demuestran que la adición de biosurfactante si aumenta la degradación. Estudios recientes realizados [16] concluyen que las cepas Gx y Fx de *P. aeruginosa* productoras de biosurfactantes podrían degradar eficazmente los asfaltenos recalcitrantes en el crudo y, por lo tanto, son cepas candidatas para la recuperación mejorada de petróleo mediante microbios.

Conclusión

La investigación concluye que el aceite de soya, a una concentración de 3 g/L, constituye el sustrato más eficiente para la producción de biosurfactantes por *P. aeruginosa* al equilibrar la facilidad de extracción con un rendimiento global de 0,0444 g/g , superando operativamente al crudo Furrial a pesar de que este último presentó un rendimiento teórico superior de 0,0812 g/g. Mediante el análisis de espectroscopía infrarroja (FTIR), se confirmó la síntesis de ramnolípidos al identificar bandas características de ésteres alifáticos ($1114,28\text{ cm}^{-1}$), ácidos carboxílicos ($1714,28\text{ cm}^{-1}$) y alcanos ($1466,66\text{ cm}^{-1}$ y $728,57\text{ cm}^{-1}$). En cuanto a la aplicación biotecnológica, se demostró que el biosurfactante actúa como un coadyuvante crítico que incrementa la biodisponibilidad de los hidrocarburos, logrando una degradación máxima del 35,99% en condiciones de baja carga de crudo (8 g/L) e inóculo (0,5 mL). Finalmente, la validación estadística mediante el diagrama de Pareto y pruebas de rangos múltiples determinó que, si bien volúmenes de 20 y 25 mL de biosurfactante optimizan la remoción, estos son estadísticamente equivalentes, sugiriendo la viabilidad de esta bacteria y sus metabolitos para estrategias de biorremediación y recuperación mejorada de petróleo.

Referencias

1. **Tissot B, Welte W.** (1984). "Formación del petróleo y acontecimientos". New York USA: Springer – Verlag.
2. **Bastardo Héctor, Bermúdez D, Betancourt L, Guerra Pedro.** (2007). "Técnicas microbiológicas y su aplicación en biorremediación". VII Congreso Venezolano de Ecología. Simposio I. Ambiente y Petróleo: La nueva Dimensión Ambiental dentro de la Industria Gasífera y de Hidrocarburos de Venezuela.
3. **Silos Rodríguez José María.** (2008) Manual de lucha contra la contaminación por hidrocarburos. Universidad de Cádiz. https://www.uea.edu.ec/pmb/index.php?lvl=author_see&id=3692
4. **Zhang G, Wu Y, Qian X, Meng Q.** (2005). "Biodegradación del crudo petróleo por medio de la *Pseudomona aeruginosa* en presencia de ramnolípidos". [Documento en línea]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1389852/>
5. **Aouad L, Abbouni B.** (2012). "Biodegradación de petróleo por *Corynebacterium aquaticum* y cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de la Refinería de ARZEW-Argelia". [Documento en línea]. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.389.4455>
6. **Giraldo J.** (2012). "Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* Pb 25: evaluación de su actividad emulsificante y de remoción de metales pesados". Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Carlos, Facultad de Ciencias Biológicas. Lima – Perú.
7. **Giraldo J, Gutierrez S, Merino F.** (2014). "Actividad emulsificante y de remoción de metales pesados del ramnolípidos producido por *Pseudomona aeruginosa* PB25". [Documento en línea]. Disponible en:

<http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v80n1/a05v80n1.pdf>

8. **Giam C, Dou H.** (1984). "Estrategias y avances técnicos en estudios de contaminación marina: mar mediterraneo". Editorial Springer – Verlag, Francia. Página: 164.
9. **Felder R, Rousseau R.** (2008). "Principios elementales de los procesos químicos". Tercera edición. Limusa Wiley, México. Páginas: 110.
10. **Owen W.** (1991). "Biotecnología de la fermentación". Editorial Acribia, S. A. Zaragoza. Página
11. **Thavasi R, Subramanyam V, Jayalakshmi S, Balasubramanian T, Banat I.** (2012). "La Producción de Biosurfactante por P. Aeruginosa Empleando Recursos Renovables". [Documento en línea]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3209860/>.
12. **Yañez G, Wong A.** (2013). "Biosurfactantes microbianos, producción potencial con residuos agroindustriales de Chiapas". [Documento en línea]. Disponible en: http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2013_3/biosurfactantes.pdf
13. **Joice P, Parthasarathi R.** "Optimización de producción de biosurfactante mediante la P. aeruginosa PBSC1". [Documento en línea]. Disponible en: <http://www.ijcmas.com/vol-39/P.Anna%20Joice%20and%20R.Parthasarathi.pdf>
14. **Rashedi H, Jamshidi E, Mazaheri M, Bonakdarpour B.** (2005). "Aislamiento y producción de biosurfactante a través de la Pseudomona aeruginosa aislada de pozos petroleros del sur de Irán". [Documento en línea]. Disponible en: <http://www.bioline.org.br/pdf?st05016>
15. **Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D., & Bryce, D.** (2014). Spectrometric identification of organic compounds (8th ed.) [Kindle edition]. Wiley.
16. **Gao Hui, Zhang Junhui, Lai Hangxian, Xue Quan-Hong.** (2017) Degradation of asphaltenes by two Pseudomonas aeruginosa strains and their effects on physicochemical properties of crude oil *International Biodeterioration & Biodegradation* 122:12-22

Química Viva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista Química Viva

Volumen 25, Número 1, Abril 2026

ID artículo: E0309

DOI: no disponible

[Versión online](#)