

Área del Conocimiento de Agricultura

ANÁLISIS DE LA EFECTIVIDAD DE PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* COMO ESTRATEGIA PARA LA SOSTENIBILIDAD AMBIENTAL

Trabajo Monográfico para optar al título de
Ingeniero Químico

Elaborado por:

Br. Daniela Lucía
López Espinoza
(2019-0763U)

Tutor:

MSc. Johana Lisseth
O'Connor Mendoza

16 de octubre de 2024
Managua, Nicaragua

DEDICATORIA

A mi mami.

A la mujer que fue, es y será.

A la versión de ella que no pudo ser para que yo pudiera estar aquí hoy.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por su interés y apoyo constante, aunque no siempre comprendieran los detalles de mi investigación. Gracias por alentarme a seguir adelante, como siempre lo han hecho.

A mis amigos, por creer en mí y recordarme lo orgullosos que están de mis logros. A todos aquellos que me asistieron en este proceso, incluso corrigiendo tildes y comas donde era necesario.

A la MSc. Johana Lisseth O'Connor Mendoza, por ir siempre más allá en su apoyo. Gracias por ser una maestra e investigadora inspiradora desde el primer momento en que la conocí. No pude haber escogido mejor persona para orientarme en esta etapa.

Al Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA), por poner a mi disposición sus instalaciones y personal para el desarrollo de este proyecto. Gracias a cada uno por brindarme apoyo en todo lo que podían.

A la Téc. Dayanara del Carmen Alemán Canales, por prestarme su teléfono a pesar de ser una completa extraña, y al Lic. Elvis Rafael Conde Velásquez, por sus valiosos consejos profesionales. A ambos, gracias por hacer más llevadero mi trabajo en el laboratorio y por siempre ofrecerme ayuda cuando la necesitaba.

Al Ing. Jasser Alexander Villegas Ruiz, porque sin él y su amor por la biotecnología, no estaría aquí. Gracias por estar conmigo en cada paso del camino, incluso cuando hay kilómetros y 8 horas de diferencia horaria entre nosotros.

Y finalmente, a mí misma. Por mi dedicación, esfuerzo y perseverancia. Por las largas horas de trabajo, por enfrentar desafíos aun con miedo y ansiedad y por nunca rendirme.

RESUMEN

Los biosurfactantes son compuestos anfifílicos producidos por microorganismos que han captado una creciente atención en las últimas décadas debido a su versatilidad y compatibilidad con el medio ambiente. Estos compuestos naturales destacan por su capacidad para reducir la tensión superficial, lo que hace de ellos agentes valiosos para abordar desafíos de sostenibilidad en diversos sectores, como la biorremediación, facilitando la movilización y biodegradación de hidrocarburos, contribuyendo así a la limpieza de ambientes contaminados de manera más eficiente. En este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo analizar la capacidad de producción de biosurfactantes de *Pseudomonas aeruginosa* cultivada con diferentes fuentes de carbono adicionales: aceite de oliva, glicerol y diésel.

Para ello, se evaluó el crecimiento bacteriano en los diferentes medios de cultivo mediante mediciones de absorbancia y conteo de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), donde el aceite de oliva proporcionó el crecimiento más rápido alcanzando una absorbancia máxima de **1.576** y la mayor densidad celular final (**6.39E+12** UFC/mL), seguido por el glicerol (**1.458** Abs y **3.98E+12** UFC/mL) y el diésel (**1.405** Abs y **3.17E+12** UFC/mL).

Por otro lado, los datos obtenidos de biomasa (UFC/mL) se modelaron utilizando la función logística y se obtuvieron parámetros de crecimiento revelando que el medio con glicerol mostró la tasa de crecimiento específica más alta (**1.317 h⁻¹**) y el tiempo de duplicación más corto (**0.759 horas**). El aceite de oliva proporcionó la mayor densidad celular final (**6.39E+12 UFC/mL**), mientras que el diésel presentó la tasa de crecimiento más baja (**0.6059 h⁻¹**).

Se obtuvo el metabolito con potencial biosurfactante presente en el medio de cultivo por centrifugación y decantación. Se logró un rendimiento del **95%** en la recuperación del sobrenadante con potencial biosurfactante. La capacidad biosurfactante mediante el método de dispersión de aceite, confirmando cualitativamente la presencia de moléculas con propiedades biosurfactantes

en todos los medios, siendo más evidente en el medio suplementado con aceite de oliva.

En conjunto, los resultados de esta investigación indican que *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de producir biosurfactantes y el cultivo con fuentes de carbono suplementarias es una estrategia efectiva para potenciar la producción de los mismos. Estos hallazgos tienen importantes implicaciones para el desarrollo de procesos de producción más eficiente y sostenibles de estos compuestos de interés biotecnológico. Asimismo, esta investigación abre la puerta a futuros estudios en el ámbito de la biotecnología y la sostenibilidad ambiental dentro de la Universidad Nacional de Ingeniería. Al establecer un precedente en la detección y producción de biosurfactantes, esta investigación proporciona la base para que las próximas generaciones de estudiantes continúen explorando y avanzando en la ciencia e innovación dentro de nuestra universidad.

ABSTRACT

Biosurfactants are amphiphilic compounds produced by microorganisms that have garnered increasing attention in recent decades due to their versatility and environmental compatibility. These natural compounds stand out for their ability to reduce surface tension, making them valuable agents for addressing sustainability challenges in various sectors, such as bioremediation, by facilitating the mobilization and biodegradation of hydrocarbons, thus contributing to the efficient cleaning of contaminated environments. In this context, the present research aimed to analyze the biosurfactant production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* cultivated with different additional carbon sources: olive oil, glycerol, and diesel.

For this purpose, bacterial growth in the different culture media was evaluated by measuring absorbance and counting colony-forming units per milliliter (CFU/mL), where olive oil provided the fastest growth, reaching a maximum absorbance of **1.576** and the highest final cell density (**6.39E+12** CFU/mL), followed by glycerol (**1.458** Abs and **3.98E+12** CFU/mL) and diesel (**1.405** Abs and **3.17E+12** CFU/mL).

Moreover, the biomass data (CFU/mL) were modeled using the logistic function, and growth parameters revealed that the glycerol medium showed the highest specific growth rate (**1.317 h⁻¹**) and the shortest doubling time (0.759 hours). Olive oil provided the highest final cell density (**6.39E+12** CFU/mL), while diesel exhibited the lowest growth rate (**0.6059 h⁻¹**).

The metabolite with biosurfactant potential present in the culture medium was obtained by centrifugation and decantation. A **95%** recovery yield of the supernatant with biosurfactant potential was achieved. The biosurfactant capacity was determined using the oil dispersion method, qualitatively confirming the presence of molecules with biosurfactant properties in all media, being more evident in the medium supplemented with olive oil.

Overall, the results of this research indicate that **Pseudomonas aeruginosa** is capable of producing biosurfactants, and cultivation with supplementary carbon sources is an effective strategy to enhance their production. These findings

have significant implications for the development of more efficient and sustainable production processes for these biotechnologically important compounds. Furthermore, this research opens the door to future studies in the field of biotechnology and environmental sustainability at the National University of Engineering. By establishing a precedent in the detection and production of biosurfactants, this research provides a foundation for future generations of students to continue exploring and advancing science and innovation within our university.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	vi
I. Introducción	1
II. Objetivos.....	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
III. Marco teórico	4
3.1. Biosurfactantes	4
3.1.1. Tipos de biosurfactantes	4
3.1.2. Producción de biosurfactantes asociada al crecimiento	6
3.1.3. Obtención de metabolito extracelular con potencial biosurfactante	6
3.1.4. Aplicaciones de los biosurfactantes	7
3.2. Microorganismos empleados para la producción de biosurfactantes	8
3.3. Técnicas de identificación microscópica de microorganismos...	8
3.3.1. Tinción de Gram.....	8
3.4. Crecimiento microbiano	9
3.4.1. Fases de crecimiento	10
3.4.2. Técnicas para cuantificación del crecimiento microbiano ..	12
3.5. Método de dispersión de aceite	13
IV. Hipótesis.....	15
V. Metodología.....	16

5.1. Descripción del ámbito de estudio	16
5.2. Activación de la cepa bacteriana <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
5.3. Evaluación del crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> utilizando distintas fuentes de carbono.....	20
5.4. Obtención de sobrenadante libre de células	28
5.5. Estimación cualitativa de actividad biosurfactante.....	30
VI. Resultados y discusión	32
6.2. Verificación de la pureza de la cepa bacteriana	33
6.3. Curva de calibración (UFC/mL vs Abs)	34
6.4. Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en diferentes fuentes de carbono adicionales	38
6.5. Obtención de metabolito con potencial biosurfactante	46
6.6. Método de dispersión de aceite	47
VII. Conclusiones	54
VIII.Recomendaciones	56
IX. Referencias.....	57
X. Anexos	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reactivos utilizados en la Tinción de Gram.....	9
Figura 2. Fases típicas del crecimiento microbiano.	10
Figura 3. Dispersión de aceite por actividad biosurfactante	14
Figura 4. Macrolocalización UNI-PIENSA.....	16
Figura 5. Preparación del medio de cultivo sólido. A) Medio de cultivo en su envase; B) Disolución del medio de cultivo en la placa calefactora; C) Placas Petri con el medio de cultivo solidificado	18
Figura 6. Siembra por estrías en 4 cuadrantes.....	19
Figura 7. Tinción de Gram. A) Preparación del frotis; B) Reactivos de tinción; C) Visualización en el microscopio (100X)	20
Figura 8. Fuentes adicionales de carbono seleccionadas	21
Figura 9. Preparación de preinóculo. A) Toma de asada de cultivo; B) Inoculación de <i>P. aeruginosa</i> en medio líquido; C) Crecimiento de las bacterias en diferentes sustratos en Shaker durante 16 horas a 220 rpm	24
Figura 10. Monitoreo del crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> . A) Crecimiento en shaker; B) Medición de absorbancia en espectrofotómetro.....	25
Figura 11. Técnica de recuento en placa y diluciones seriadas.....	26
Figura 12. Método de dispersión por superficie	27
Figura 13. Centrifugación de medio de cultivo líquido	29
Figura 14. Capa de aceite sobre agua destilada en placa Petri para la prueba de dispersión de aceite.....	30
Figura 15. Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en placas de agar LB	33
Figura 16. Resultado de tinción de Gram de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
Figura 17. Curva de calibración para <i>P. aeruginosa</i> en medio LB.....	36
Figura 18. Curva de calibración para <i>P. aeruginosa</i> suplementada con aceite de oliva	36
Figura 19. Curva de calibración para <i>P. aeruginosa</i> suplementada con glicerol	37
Figura 20. Curva de calibración para <i>P. aeruginosa</i> suplementada con diésel	38
Figura 21. Curva de concentración UFC/mL para <i>P. aeruginosa</i> en medio LB	39

Figura 22. Curva de concentración para <i>P. aeruginosa</i> suplementada con aceite de oliva.....	40
Figura 23. Curva de concentración para <i>P. aeruginosa</i> suplementada con glicerol	41
Figura 24. Curva de concentración para <i>P. aeruginosa</i> suplementada con diésel	44
Figura 25. Resultado de la centrifugación de los medios de cultivo	46
Figura 26. Dispersión del aceite utilizando sobrenadante con potencial biosurfactante obtenido del cultivo en LB	47
Figura 27. Dispersión del aceite utilizando un cultivo en LB suplementado con aceite de oliva.....	48
Figura 28. Dispersión del aceite utilizando un cultivo suplementado con glicerol	50
Figura 29. Dispersión del aceite utilizando sobrenadante con potencial biosurfactante obtenido del cultivo en LB suplementado con diésel.....	51
Figura 30. Control negativo para la prueba de dispersión de aceite	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos y origen microbiano de biosurfactantes	4
Tabla 2. Aplicaciones de los biosurfactantes en la industria petrolera	7
Tabla 3. Contenido de frascos para monitoreo de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i>	24
Tabla 4. Valores de absorbancias a 600 nm y valores de UFC/mL a partir de los cuales se construyen las curvas de calibración	35

I. Introducción

En un contexto global donde la sostenibilidad ambiental se ha convertido en una prioridad urgente, la búsqueda de alternativas ecológicas a los productos químicos convencionales ha ganado importancia. Los biosurfactantes, compuestos producidos por microorganismos como bacterias, hongos y levaduras, han emergido como una prometedora solución a los desafíos de biorremediación, recuperación de petróleo, formulación de productos farmacéuticos y alimentos (Ugaz-Hoyos *et al.*, 2020).

El hecho que los surfactantes sintéticos son derivados del petróleo y el consumo de este aumentó un 2.4% en 2023 (Enerdata, 2024), subraya la necesidad de transicionar hacia alternativas más sostenibles. Los biosurfactantes ofrecen ventajas significativas sobre sus contrapartes sintéticas, incluyendo menor toxicidad, mayor biodegradabilidad y mejor compatibilidad ambiental (Mounira y Abdelhadi, 2015). Estas características los posicionan como candidatos ideales para reemplazar los surfactantes convencionales en diversas aplicaciones industriales y ambientales.

Nicaragua, con su rica biodiversidad y posición geoestratégica, presenta un escenario ideal para la exploración y desarrollo de estas biotecnologías sostenibles. A pesar de los desafíos ambientales y económicos que enfrenta, el país alberga una diversidad de microorganismos con el potencial de contribuir significativamente al campo de la biotecnología, especialmente en la producción de compuestos con aplicaciones industriales y ambientales (Delgado *et al.*, 2019).

La investigación internacional en el campo de los biosurfactantes ha avanzado considerablemente, explorando la diversidad de microorganismos productores, los mecanismos de producción y las aplicaciones potenciales de estos compuestos. Estudios recientes han demostrado resultados prometedores: Al-Dhabi *et al.* (2020) aislaron la cepa *Bacillus subtilis* Al-Dhabi-130 de sedimentos marinos contaminados con petróleo, logrando una producción óptima de biosurfactantes en 72 horas utilizando melaza de dátil como sustrato.

Esta cepa demostró una alta capacidad para degradar petróleo crudo, eliminando más del 95% en 14 días.

Abdulsalam *et al.* (2017) compararon la producción de biosurfactantes entre *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando aceite de motor y diésel como sustratos respectivamente. *P. aeruginosa* alcanzó la mayor concentración de biosurfactante (0,0106 mg/ml) a las 144 horas. El-Sheshtawy y Doheim (2014) evaluaron el potencial de producción de biosurfactantes de *P. aeruginosa* y *B. subtilis* usando glucosa y n-hexadecano como sustratos. *P. aeruginosa* mostró un mejor desempeño, produciendo ramnolípidos que redujeron la tensión superficial del agua de 72 a 32 mN/m.

Estos estudios han demostrado la efectividad de bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* en la producción de biosurfactantes utilizando diversas fuentes de carbono. Sin embargo, en Nicaragua, la investigación en este campo aún es limitada, lo que destaca la importancia de explorar la capacidad de los microorganismos nativos para la producción de biosurfactantes.

En este contexto, la presente investigación se enfoca en analizar la capacidad de producción de biosurfactantes de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, conservada en el laboratorio de biotecnología de UNI-PIENSA, cuando es cultivada con diferentes fuentes de carbono, incluyendo aceite de oliva, glicerol y diésel. El objetivo principal es identificar las condiciones óptimas que favorecen la producción de biosurfactantes, obteniendo metabolitos con potencial para aplicaciones industriales y ambientales. Para ello, se empleó el método de dispersión de aceite, un procedimiento confiable para evaluar la eficiencia de los biosurfactantes en la reducción de la tensión superficial.

La relevancia de esta investigación radica en su potencial para contribuir al desarrollo de soluciones sostenibles en la biotecnología, brindando alternativas prácticas para la industria biotecnológica y ambiental en Nicaragua. Además, se espera que los resultados obtenidos sirvan como base para futuras investigaciones y aplicaciones, apoyando el avance del conocimiento científico en el país y ofreciendo soluciones innovadoras para los desafíos ambientales actuales.

II. Objetivos

2.1. Objetivo general

- Analizar la capacidad de producción de biosurfactantes de *Pseudomonas aeruginosa* cultivada con diferentes fuentes de carbono.

2.2. Objetivos específicos

- Examinar el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en diferentes fuentes de carbono.
- Obtener metabolito con potencial biosurfactante a partir de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Estimar la capacidad biosurfactante del metabolito obtenido por *Pseudomonas aeruginosa*, mediante el método de dispersión de aceite.

III. Marco teórico

A continuación, se presentan y explican los conceptos fundamentales para comprender a profundidad esta investigación:

3.1. Biosurfactantes

Los biosurfactantes (BS) son compuestos biológicos anfifílicos, es decir que se componen de dos lados: uno hidrofóbico y el otro hidrofílico, producidos extracelularmente o como parte de las membranas celulares por una variedad de levaduras, bacterias y hongos filamentosos a partir de diversas sustancias como azúcares, aceites y residuos. Son capaces de disminuir la tensión superficial, la tensión interfacial y formar microemulsiones para permitir la mezcla de dos soluciones inmiscibles (Jamal *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2014).

Esto quiere decir que, al reducir la tensión superficial, los biosurfactantes permiten que el líquido se extienda y moje superficies más fácilmente, asimismo, al reducir la tensión interfacial los BS permiten que líquidos inmiscibles, como el agua y el aceite, se mezclen fácilmente. Por último, la formación de microemulsiones permite la mezcla homogénea y estable de estos líquidos.

3.1.1. Tipos de biosurfactantes

Existen diferentes tipos de biosurfactantes que pueden ser producidos por microorganismos. La clasificación de los biosurfactantes se basa en su origen microbiano y su composición química. Según Mulligan y Gibbs (2004), se han identificado varios tipos principales de biosurfactantes y sus respectivos microorganismos productores, los cuales resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Tipos y origen microbiano de biosurfactantes (Fuente: Mulligan y Gibbs, 2004).

Tipos de surfactantes	Microorganismos
Lípidos de trehalosa	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> , <i>Mycobacterium spp.</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i>

Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>
Lípidos de soforosa	<i>Candida apicola</i> , <i>Candida bombicola</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida bogoriensis</i>
Lípidos de glucosa, fructosa, sacarosa	<i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> , <i>R. erythropolis</i>
Lípidos de celobiosa	<i>Ustilago maydis</i>
Lípidos de poliol	<i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Rhodotorula graminis</i>
Diglicéridos diglicosilados	<i>Lactobacillus fermentii</i>
Lipopolisacáridos	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (RAG1), <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Candida lipolytica</i>
Lipopéptidos	<i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Bacillus pumilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Péptidos de ornitina y lisina	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>Streptomyces sioyaensis</i> , <i>Gluconobacter cerinus</i>
Fosfolípidos	<i>Acinetobacter sp.</i>
Sulfonolípidos	<i>T. thiooxidans</i> , <i>Corynebacterium alkanolyticum</i>
Ácidos grasos (ácidos corinomicólicos, etc.)	<i>Capnocytophaga sp.</i> , <i>Penicillium spiculisporum</i> , <i>Corynebacterium lepus</i> , <i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Talaromyces trachyspermus</i> , <i>Nocardia erythropolis</i>

Como se observa en la **Tabla 1**, *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de producir biosurfactante del tipo ramnolípidos, los cuales son el tipo más común y se han estudiado ampliamente por sus aplicaciones biotecnológicas. Estos

biosurfactantes se producen principalmente durante la fase estacionaria del crecimiento bacteriano y se encuentran en el medio extracelular, lo que los hace accesibles para diversas aplicaciones industriales y ambientales.

3.1.2. Producción de biosurfactantes asociada al crecimiento

En la producción de biosurfactantes asociada al crecimiento, existe una estrecha relación entre el sustrato, el crecimiento y la producción de biosurfactante. Más específicamente, la producción de ramnolípidos es influenciada por diversos factores, como la disponibilidad de fuentes de carbono, el pH, la temperatura, y las condiciones de agitación durante el cultivo (Tejeda, 2012). En consecuencia, la composición del medio de cultivo, incluyendo las fuentes de carbono, desempeña un papel fundamental en la influencia sobre el crecimiento de las células y la acumulación de productos metabólicos (Gibson *et al.*, 2018), esto permite lograr una producción eficiente de estos compuestos de interés tecnológico.

- **Efecto de la fuente de carbono en la producción de biosurfactantes**

La fuente de carbono desempeña un papel crucial en la regulación de la síntesis de biosurfactantes, pudiendo estimular o inhibir su producción. La incorporación de sustratos no solubles en agua conduce a la estimulación de la biosíntesis de estos compuestos. Por ejemplo, en la producción de ramnolípidos, se observa que el uso de sustratos solubles en agua, como glicerol, glucosa, manitol y etanol, resulta en una producción menor de biosurfactantes en comparación con el uso de sustratos no solubles en agua, como los n-alcanos y otros tipos de hidrocarburos. Esto destaca la importancia de seleccionar adecuadamente la fuente de carbono para optimizar la producción de biosurfactantes en un proceso determinado (Barrionuevo, 2017).

3.1.3. Obtención de metabolito extracelular con potencial biosurfactante

Los biosurfactantes son metabolitos extracelulares secretados por las células microbianas al medio ambiente circundante, es decir, al medio de cultivo. Incluyen todos los metabolitos liberados desde el interior celular hacia el espacio extracelular, así como los componentes del medio que se encuentran

en el sobrenadante. La separación de los metabolitos extracelulares de las células microbianas puede lograrse mediante técnicas sencillas como la centrifugación y la filtración, para aislar el sobrenadante o el medio de cultivo libre de células (Pinu y Villas-Boas, 2017). Este sobrenadante del cultivo libre células se utiliza para los ensayos de detección de biosurfactantes.

3.1.4. Aplicaciones de los biosurfactantes

Los biosurfactantes se han convertido recientemente en un importante producto de la biotecnología para aplicaciones industriales. Algunas de las más estudiadas están relacionadas con la industria del petróleo. Guzmán (2019) reporta dichas aplicaciones en la siguiente tabla:

Tabla 2. Aplicaciones de los biosurfactantes en la industria petrolera (Fuente: Guzmán, 2019).

Proceso	Aplicaciones	Actividades
Extracción de crudo	Modificación de la mojabilidad de la roca de yacimiento	Agentes espumantes de mojabilidad
	Reducción de la viscosidad	Emulsificantes
	Dispersión de fluidos de perforación	Agentes dispersantes
	Control de deposición de parafinas y asfaltenos	Agentes solubizantes
	Incremento del desplazamiento de aceite	Agente reductor de tensión interfacial
Transportación de aceite	Reducción de la viscosidad	Emulsificantes
	Estabilización de emulsiones	Agentes espumantes
	Control de deposición de parafinas/asfaltenos	Agentes solubizantes

Tanques de aceites y contenedores	Emulsificación de lodos Dispersión de hidrocarburos	Emulsificantes Dispersantes
--	---	--------------------------------

Sin embargo, Sriram (2020) destaca que, las aplicaciones industriales de los biosurfactantes aún se encuentran en proceso de evolución y se orientan principalmente hacia el aumento de la eficiencia en la producción y la generación de biosurfactantes altamente efectivos, con propiedades específicas adecuadas para aplicaciones concretas

3.2. Microorganismos empleados para la producción de biosurfactantes

En el ámbito de la biotecnología y las ciencias ambientales, los microorganismos se han convertido en activos de incalculable valor por su notable capacidad para producir una amplia gama de compuestos con propiedades únicas. Entre estos, *Pseudomonas aeruginosa* destaca como importantes productores de biosurfactantes.

Son bacilos quimioorganotróficos, es decir que obtienen su energía a través de la oxidación de compuestos orgánicos, son aeróbicos y gramnegativos, tienen puntas polares, pueden utilizar una variedad de fuentes de carbono para obtener energía y, por lo general, son oxidasa y catalasa positivas. Posee una variación metabólica y una producción enzimática que les permite adaptarse a ambientes contaminados con hidrocarburos (Rabelo y Márquez, 2022).

3.3. Técnicas de identificación microscópica de microorganismos

3.3.1. Tinción de Gram

La tinción de Gram, una técnica microbiológica fundamental, es un método de tinción diferencial utilizado para clasificar las bacterias en dos grupos distintos: Gram-positivas y Gram-negativas. Las bacterias Gram positivas aparecen de color azul violeta, mientras que las Gram negativas adquieren una tonalidad rosada o roja. El procedimiento comienza con la fijación térmica de la muestra, seguida de la tinción con cristal violeta, que da color a todas las bacterias del medio. A continuación, un mordiente, normalmente yodo, intensifica la tinción.

Si la tinción se detuviera en esta fase, todas las bacterias aparecerían de color violeta.

Posteriormente, un agente decolorante, como la alcohol-acetona, elimina el cristal violeta de las bacterias Gram negativas, volviéndolas incoloras. En cambio, las bacterias Gram positivas conservan el color violeta. Para visualizar las bacterias Gram negativas, se aplica una tinción de contraste, normalmente safranina o fucsina, que les confiere un color rojo, en la **Figura 1.** pueden observarse los reactivos utilizados en la tinción de Gram.

Estos resultados diferenciales de la tinción se deben a variaciones en la composición química y la estructura de las paredes celulares bacterianas, que influyen en la retención o eliminación de la tinción primaria tras el proceso de decoloración López-Jácome *et al.* (2013).

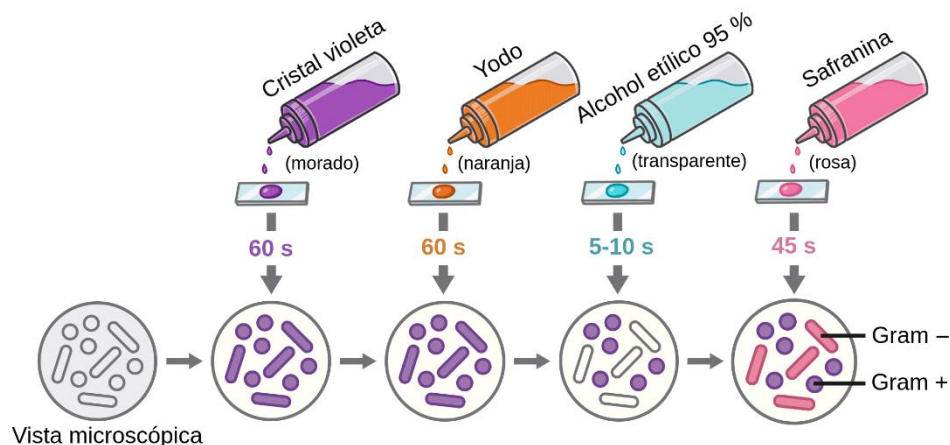


Figura 1. Reactivos utilizados en la Tinción de Gram (Fuente: Theory Labster, 2021).

3.4. Crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano se considera como la observación de las actividades de las células vivas. Es importante controlar el crecimiento celular y las actividades biológicas y biocatalíticas en el metabolismo celular. Existen varios métodos para predecir el crecimiento celular mediante mediciones directas o indirectas. El peso seco celular, la densidad óptica celular (DO), la turbidez celular, la respiración celular, la tasa metabólica y los metabolitos son muy adecuados para analizar el crecimiento celular, la utilización de sustratos y la formación de productos (Najafpour, 2007).

3.4.1. Fases de crecimiento

Cuando hay un número significativo de células microbianas y estas se encuentran en una fase de rápido crecimiento, la población de células aumenta exponencialmente con el tiempo. Para visualizar y comprender este patrón de crecimiento, se crea un gráfico en el que se representan el peso celular seco (g/L) en el eje **y** y el tiempo de incubación (h) en el eje **x**, de la misma manera, el gráfico permite distinguir varias fases de crecimiento (**Figura 2**) que se producen regularmente: la fase de latencia (lag), la fase exponencial (logarítmica), la fase estacionaria y la fase de muerte (Herrera y Sieza, 2021).

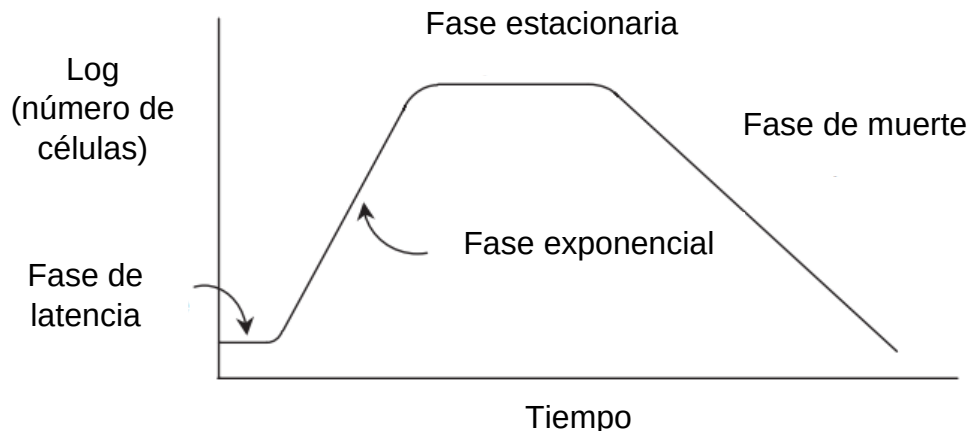


Figura 2. Fases típicas del crecimiento microbiano (Fuente: Najafpour, 2007).

En la investigación realizada por Herrera y Sieza (2021) explican las fases de la siguiente manera:

Fase Lag o latencia: La primera fase del crecimiento microbiano se conoce como fase de latencia o lag. En esta etapa inicial, el crecimiento del microorganismo no comienza inmediatamente después de la inoculación en el medio de cultivo. En cambio, los microorganismos requieren un periodo de adaptación a las nuevas condiciones antes de comenzar a dividirse y multiplicarse. Durante la fase de latencia, no hay división celular, pero los microorganismos aumentan su masa individual al sintetizar ARN, ribosas y enzimas necesarias para su crecimiento. La duración de esta fase depende de la cantidad de inóculo inicial, la edad y el estado fisiológico de las células inoculadas. Una vez que los microorganismos se han adaptado

completamente al medio, entran en la siguiente fase de crecimiento exponencial.

Fase exponencial (logarítmica): Una vez finalizada la fase de latencia, la concentración de biomasa microbiana comienza a incrementarse lentamente al principio y luego de forma más acelerada. Eventualmente, las células alcanzan una velocidad máxima y constante de crecimiento exponencial, y representa el punto de máxima concentración microbiana. Durante esta fase, las células se dividen y replican a intervalos regulares, generando un aumento logarítmico de la población. Por ello también se le denomina fase de "crecimiento equilibrado", ya que la síntesis de todos los componentes celulares se incrementa a una tasa constante.

Fase estacionaria: En la fase estacionaria, la velocidad de crecimiento (reproducción) del microorganismo se equilibra con la velocidad de muerte celular. Se alcanza así un estado estable donde no hay aumento neto en la población microbiana. La relevancia de esta fase depende del tipo de fermentación. Por ejemplo, en la producción de etanol no es necesario (ni rentable) continuar el proceso una vez que se llega a la fase estacionaria, dado que la concentración máxima de células ya se ha alcanzado y la producción de etanol comienza a disminuir. En cambio, en la elaboración de antibióticos, la mayor acumulación del producto ocurre durante la fase estacionaria. Por lo tanto, la importancia de mantener esta fase depende del objetivo buscado en cada proceso fermentativo específico.

Fase de declinación o muerte: En esta fase, la concentración de células microbianas comienza a disminuir. Esto ocurre debido a la escasez de nutrientes y reservas de energía en el medio de cultivo, lo que provoca la autólisis o muerte celular. A medida que el medio se agota, las tasas de crecimiento y división celular ya no pueden sostenerse, y la población microbiana empieza a decrecer hasta eventualmente morir. Esta fase final de declinación y muerte marca el fin del ciclo de crecimiento microbiano en el cultivo dado.

Dichas fases del crecimiento bacteriano han sido tradicionalmente representadas mediante diversos modelos matemáticos, uno de los más

conocidos es el modelo de Monod, que describe el crecimiento microbiano como una curva sigmoideal. Sin embargo, existen otros modelos que ofrecen representaciones similares y, en algunos casos, más adaptables a condiciones específicas (Pla et al., 2015).

Entre estos, la función logística destaca como una alternativa eficaz y ampliamente utilizada para describir el crecimiento de poblaciones, incluido el crecimiento bacteriano (Wachenheim et al., 2003). Al igual que el modelo de Monod, la función logística produce una curva en forma de S que refleja con precisión las fases de latencia, crecimiento exponencial y estacionarias observadas en el crecimiento bacteriano real, y se representa de la siguiente manera:

$$X(t) = \frac{X_{max}}{1 + e^{-\mu_{max}(t-t_{exp})}}$$

Donde:

$X(t)$ = Es la población o concentración de biomasa (UFC/mL) en el tiempo.

X_{max} = Es la población máxima que el medio puede sostener.

μ_{max} = Es la tasa máxima de crecimiento específico (h^{-1}), que indica qué tan rápido crece la población en su fase más activa.

t_{exp} = Es el período durante el cual el crecimiento es más rápido y se aproxima a una función exponencial.

Estos parámetros son cruciales para comprender la dinámica del crecimiento bacteriano y pueden variar dependiendo de las condiciones del medio y las características de la cepa bacteriana.

3.4.2. Técnicas para cuantificación del crecimiento microbiano

Contar con precisión las células microbianas es esencial para estudiar cómo crecen los microorganismos y cómo responden a las condiciones del ambiente. Dos técnicas habituales para cuantificarlos son el recuento en placa y la turbidimetría, que se explican a continuación:

Recuento en placa: El método más utilizado en microbiología para cuantificar las células viables consiste en hacer diluciones y contar las colonias en medios de cultivo específicos para la población de interés. Esta técnica se basa en el supuesto de que cada bacteria incluida en un medio de agar o en su superficie se multiplicará y producirá una colonia visible. Por lo tanto, el número de colonias que se observarán a simple vista será igual al número de bacterias viables o unidades formadoras de colonias (UFC) inoculadas en el agar multiplicado por la dilución. Este método también se conoce como "método de recuento de colonias" y se utiliza ampliamente en microbiología para determinar el número de células viables en una muestra (Herrera y Sieza, 2021).

Turbidimetría: Cuando se emplea este método, se obtiene una ventaja del hecho de que las células microbianas en una celda espectrofotométrica dispersan la luz, de forma que la cantidad de luz que llega al detector del espectrofotómetro está directamente relacionada con el número de células presentes en la muestra de cultivo, siguiendo la Ley de Beer. Normalmente, se utilizan longitudes de onda en torno a 600 nm. Es importante entender que, dado que la absorbancia es afectada por el tamaño y la forma de las células, la relación entre la absorbancia y el número de células cambia si el tamaño o la forma de las células se altera durante el crecimiento del cultivo (O'Connor, 2019).

Las UFC proporcionan un recuento de células viables y cultivables, mientras que la turbidimetría permite monitorear el crecimiento en tiempo real. Ambas técnicas son herramientas valiosas para comprender la proliferación y la dinámica de los microorganismos.

3.5. Método de dispersión de aceite

La dispersión de aceite es una prueba de selección rápida y sencilla para determinar si un microorganismo es potencialmente productor de biosurfactante, esta prueba se basa en la evaluación de la dispersión de un aceite por efecto del BS contenido en el sobrenadante de un cultivo microbiano, sobre una superficie agua-aceite (Guzmán, 2019).

Para este ensayo, se añade aceite crudo a la superficie de agua destilada en una placa de Petri para formar una fina capa de aceite. A continuación, se colocan suavemente el cultivo o sobrenadante de cultivo en el centro de la capa de aceite. En un ensayo cualitativo, se determina que existe presencia de biosurfactante en la muestra, si el aceite se desplaza y se forma el halo (Walter *et al.*, 2000), como se muestra en la **Figura 3**.

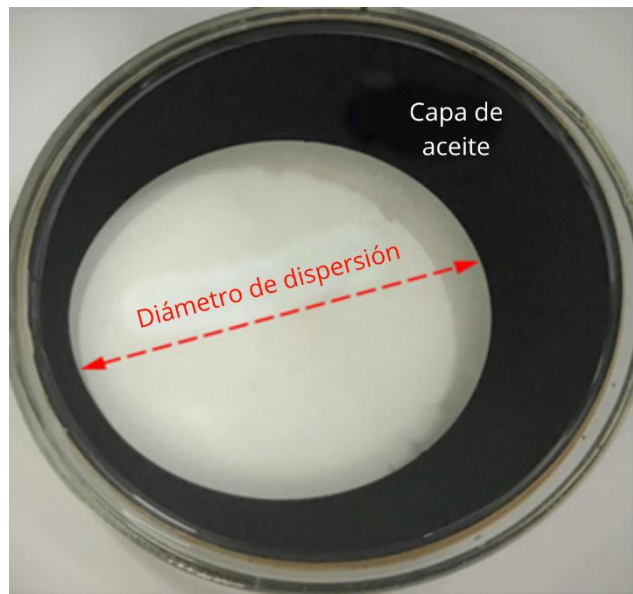


Figura 3. Dispersión de aceite por actividad biosurfactante (Fuente: Walter *et al.*, 2000).

IV. Hipótesis

- Hipótesis nula (H_0): Cultivar *Pseudomonas aeruginosa* con diferentes fuentes de carbono no afectará significativamente su crecimiento y la capacidad biosurfactante de los metabolitos obtenidos.
- Hipótesis alternativa (H_1): Cultivar *Pseudomonas aeruginosa* con diferentes fuentes de carbono afectará significativamente su crecimiento y la capacidad biosurfactante de los metabolitos obtenidos.
- Hipótesis positiva (H_+): Cultivar *Pseudomonas aeruginosa* con ciertas fuentes de carbono incrementará significativamente tanto su crecimiento como la capacidad biosurfactante de los metabolitos obtenidos en comparación con otras fuentes de carbono.

V. Metodología

A continuación, se describe la metodología empleada para llevar a cabo la presente investigación:

5.1. Descripción del ámbito de estudio

La realización de ensayos, se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (UNI-PIENSA) de la Universidad Nacional de Ingeniería, ubicado en el Recinto Simón Bolívar en la ciudad de Managua, Nicaragua con coordenadas geográficas 12.1435887 - 86.2675189 (UTM).

El programa forma parte de las instalaciones de investigación de la Universidad, y se encuentra especializado en estudios relacionados con la biotecnología y el medio ambiente. Cuenta con áreas equipadas para el cultivo y análisis microbiológico. Además, se tiene acceso a las cepas bacterianas y

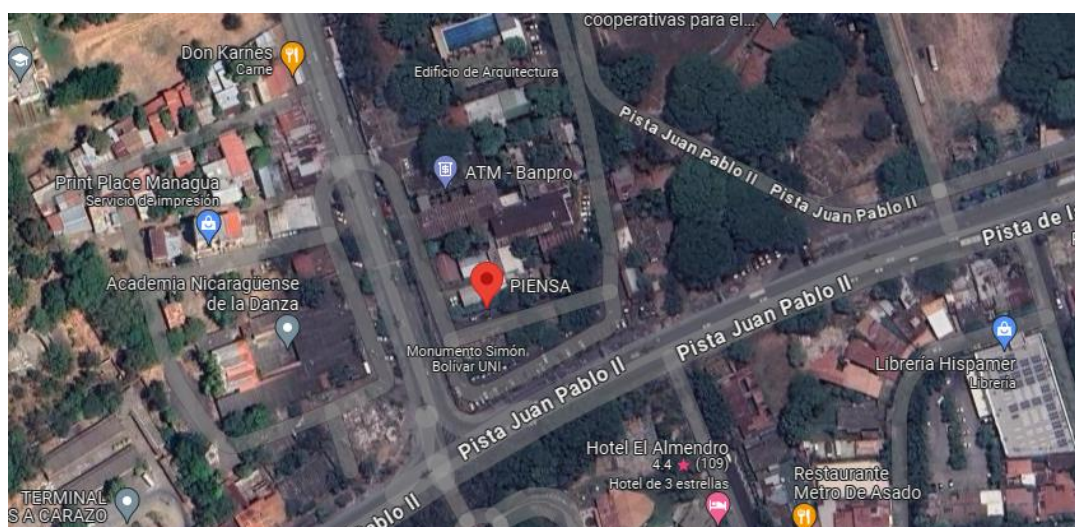


Figura 4. Macrolocalización UNI-PIENSA (Fuente: Google Maps, 2024).

5.2. Activación de la cepa bacteriana *Pseudomonas aeruginosa*

La cepa *Pseudomonas aeruginosa* que se utilizó en esta investigación se encuentra aislada y fue suministrada por el banco de microorganismos del Laboratorio de Biotecnología del Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (UNI-PIENSA).

Este laboratorio cuenta con un total de 365 cepas bacterianas, entre las cuales se encuentran dos especies de *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa* y

Pseudomonas mendocina. Las cepas se conservan mediante el método de transferencia periódica, el cual se basa en transferir el cultivo del medio seco a uno fresco, proporcionándole las condiciones óptimas de crecimiento a intervalos que aseguran su viabilidad (Weng *et al.*, 2005). La transferencia se realiza cada 30 días utilizando el medio Agar Miller (LB) y se mantienen en refrigeración a una temperatura de 10 °C.

Esta conservación es fundamental para garantizar la viabilidad y funcionalidad de la cepa durante los procesos experimentales, especialmente en la activación de cepas bacterianas (Acosta, 2019), la cual es el proceso donde las bacterias pasan de un estado inactivo o latente a un estado activo y funcional.

5.2.1. Preparación del medio de cultivo sólido

La preparación adecuada del medio de cultivo es un paso fundamental en cualquier experimento microbiológico, para ello se disolvieron 20 g de Agar LB (Miller) (**Figura 5A**) en 500 mL de agua destilada, la mezcla se calentó en una placa calefactora y agitador magnético Fisherbrand Isotemp (**Figura 5B**) hasta alcanzar el punto de ebullición con una velocidad de agitación baja para una disolución homogénea. Una vez disuelto completamente, se dispensaron 15 mL del medio a tubos de ensayos para su posterior esterilización en autoclave. Los tubos se esterilizaron en autoclave YAMATO SQ810C, sometidos a una temperatura de 121 °C durante un periodo de alcance de temperatura de dos horas y a una presión de 121 kPa bajo el periodo de esterilización de 15 minutos.

Se utilizó una cinta indicadora o testigo que cambia de color cuando se expone a esta temperatura, para confirmar que se alcanzaron las condiciones de esterilización. Después del proceso de autoclavado, el medio estéril se vertió asépticamente en placas de Petri cerca del mechero Busen para prevenir contaminación. Las placas se dejaron enfriar a temperatura ambiente y solidificar (**Figura 5C**). Finalmente, las placas con agar LB esterilizado se almacenaron en refrigeración para su posterior uso.

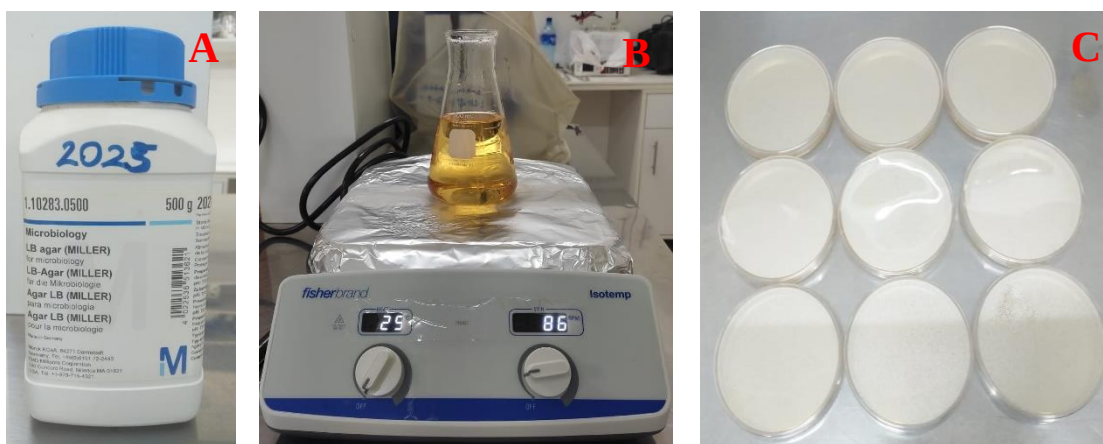


Figura 5. Preparación del medio de cultivo sólido. A) Medio de cultivo en su envase; B) Disolución del medio de cultivo en la placa calefactora; C) Placas Petri con el medio de cultivo solidificado (Fuente: Elaboración propia).

5.2.2. Siembra por agotamiento en estrías

La técnica de siembra por estrías se utiliza para el aislamiento de colonias bacterianas puras a partir de un cultivo mixto o preservado. En este caso, se empleó dicha técnica para reactivar las cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* con código QIA-02 y QIA-13, las cuales se encontraban previamente conservadas.

El objetivo principal de utilizar este método fue obtener un cultivo fresco y puro de la cepa de interés, libre de contaminantes, para poder iniciar los ensayos posteriores con un inóculo adecuado. La siembra por estrías permite diluir progresivamente la muestra original a través de los distintos cuadrantes de la placa de agar, logrando así repicar colonias a partir de las células viables presentes (Sanz, 2011).

Se utilizó la técnica de siembra de agotamiento por estrías, descrita por Sanz (2011), donde se tomó una pequeña cantidad de la cepa bacteriana conservada utilizando un asa de siembra estéril, y se realizaron estrías en la superficie del agar siguiendo un patrón de cuatro cuadrantes, como se muestra en la **Figura 6**.

Las estrías se trazaron perpendicularmente para extender la muestra de manera uniforme sobre toda la placa Petri. Las muestras fueron incubadas de forma invertida a 37 °C por 24 h, además se incubó una placa sin inocular como control negativo y asegurar el manejo aséptico y cuidadoso en cada fase del proceso. Este procedimiento se realizó para cada cepa con 5 réplicas cada una

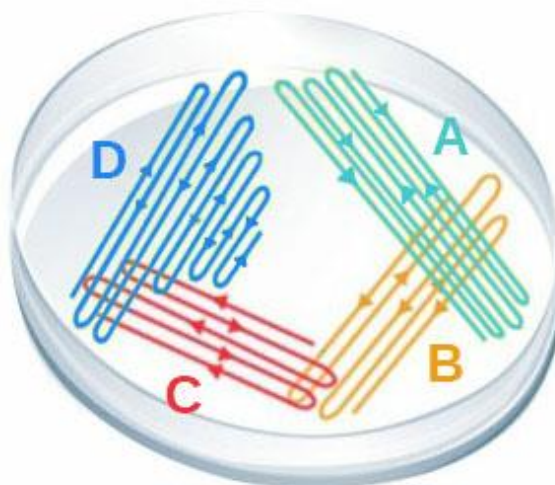


Figura 6. Siembra por estrías en 4 cuadrantes (Fuente: Theory Labster, 2021)

(Anexo 1 y Anexo 2). Posterior a esto, las colonias aisladas fueron evaluadas y seleccionadas para los ensayos subsiguientes.

5.2.3. Confirmación de pureza la cepa bacteriana

Tras la siembra de colonias por agotamiento de estrías, se confirmó la pureza de la cepa bacteriana obtenida para garantizar que las colonias corresponden efectivamente al microorganismo de interés (*Pseudomonas aeruginosa*), y se encontraban libres de contaminantes que pudieran interferir en los ensayos posteriores. La técnica usada para la identificación bacteriana fue la tinción de Gram, la cual permitió visualizar características morfológicas y diferenciar entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Para esto, una vez finalizada la incubación de las cepas bacterianas, se realizó la tinción de Gram siguiendo el protocolo establecido por Méndez, (2018). Primeramente, a partir de los cultivos se preparó un frotis en porta objetos (**Figura 7A**) que fueron fijados con calor. Se añadió cristal violeta durante 1 minuto, se enjuagó con agua destilada y luego se agregó lugol por 1 minuto más, enjuagando nuevamente con agua destilada. Posteriormente se decoloró

con alcohol-acetona por 20 segundos, se enjuagó y se tiñó con safranina por 1 minuto.

Esta secuencia de coloración diferencial permite distinguir las bacterias Gram positivas, que retienen el complejo cristal violeta-lugol, de las Gram negativas, que se decoloran con el alcohol-acetona y son teñidas posteriormente por la safranina. En el caso de la *Pseudomonas aeruginosa*, se esperaba observar células coloradas de rojo o rosado tras la tinción.

Finalmente, tras el último enjuague con agua destilada, se dejó secar la muestra. La morfología bacteriana se estudió mediante microscopía óptica con un microscopio OLYMPUS BH-2 a 100X utilizando inmersión en aceite para una mejor visualización (**Figura 7C**).



Figura 7. Tinción de Gram. A) Preparación del frotis; B) Reactivos de tinción; C) Visualización en el microscopio (100X) (Fuente: Propia).

5.3. Evaluación del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando distintas fuentes de carbono.

5.3.1. Selección de las fuentes de carbono:

Aunque el medio LB ya contiene fuente de carbono (Acuña, 2019; Pornsunthorntawe et al., 2008), se agregaron 3 fuentes de carbono adicionales (Aceite de oliva, glicerol, diésel) para evaluar su efecto sobre el crecimiento de las bacterias.

Para la elección de las fuentes de carbono, se tuvieron en cuenta factores relevantes para la investigación y para las potenciales aplicaciones del producto obtenido, entre los que se destacan: la literatura científica existente y

asequibilidad. De esta manera, se eligieron 3 sustratos: **diésel**, un hidrocarburo complejo, el cual fue seleccionado debido a la conocida capacidad de *P. aeruginosa* para degradar compuestos petroleros, lo que tiene implicaciones importantes en biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos (Abdulsalam *et al.*, 2017).

Aceite de oliva, rico en ácidos grasos de cadena larga, representa un sustrato lipídico que puede estimular la producción de biosurfactantes (Ji *et al.*, 2016); por último, **glicerol**, un subproducto abundante en la industria de biodiesel, este ofrece una fuente de carbono económica y sostenible que *P. aeruginosa* puede utilizar eficientemente para su crecimiento y para la síntesis de diversos metabolitos de interés (Becerra y Horna, 2016).

Por otra parte, la elección de la concentración de fuente de carbono se fundamenta en una revisión exhaustiva de la literatura científica. Investigaciones han demostrado que concentraciones entre 2% y 6% v/v son óptimas para el género *Pseudomonas* (Putri y Hertadi, 2015). A partir de esta consideración se escogió el 2% v/v, pues esta concentración ha sido reportada como efectiva en múltiples contextos (Pornsunthorntawee *et al.*, 2008; Osorio, 2018; Acuña, 2019; Ardila, 2019). Esta selección no solo proporciona un punto de partida sólido para el desarrollo de los experimentos, sino que también permitió realizar comparaciones más directas con investigaciones previas, facilitando así la interpretación de los resultados obtenidos.

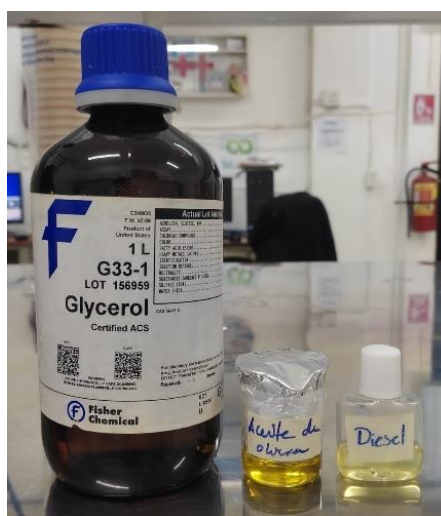


Figura 8. Fuentes adicionales de carbono seleccionadas (Fuente: Propia)

La utilización de estas fuentes adicionales de carbono no solo permite evaluar la versatilidad metabólica de la bacteria de interés, sino que también proporciona información valiosa sobre su potencial en aplicaciones biotecnológicas, desde la biorremediación hasta la producción de compuestos de valor añadido. Además, la comparación del crecimiento bacteriano en estos sustratos con el crecimiento en medio LB estándar puede revelar adaptaciones metabólicas específicas y posibles inducciones de rutas biosintéticas de interés para esta investigación, como la producción de biosurfactantes.

5.3.2. Preparación del medio de cultivo líquido

Similar al Agar LB, el medio de cultivo líquido LB es ampliamente utilizado en microbiología debido a su versatilidad y capacidad para soportar el crecimiento rápido de una variedad de bacterias, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*. La formulación Miller del caldo LB (**Anexo 4**), al igual que su contraparte sólida, contiene una concentración relativamente alta de cloruro de sodio, esta ayuda a mantener el equilibrio osmótico, lo cual es importante para muchas bacterias (Caycedo *et al.*, 2021).

La preparación del medio líquido sigue principios similares a los del medio sólido, sin embargo, existen diferencias clave, como la ausencia de agar, lo que permite una disolución más rápida y uniforme de los componentes, aunque sigue siendo crucial el mantener una agitación constante durante el calentamiento para asegurar la homogeneidad de la mezcla.

La metodología para preparar el medio fue la siguiente: Se disolvieron 25 g de Caldo LB (Miller) en un litro de agua destilada. Luego, se calentó la mezcla en una placa calefactora con agitador magnético hasta alcanzar el punto de ebullición. Durante este proceso, se mantuvo una velocidad de agitación baja para asegurar una disolución homogénea. Una vez preparado el medio de cultivo, se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121 °C y a una presión de 121 kPa durante un período de 15 minutos.

5.3.3. Preparación de preinóculos

Para evaluar el efecto de las fuentes de carbono adicionales en el crecimiento de la cepa bacteriana se prepararon cuatro preinóculos (**Figura 9A**), lo cual es

fundamental en estudios de crecimiento microbiano (Hernández y Nápoles, 2018), en especial en los que se evalúan diferentes condiciones de cultivo, como en esta investigación. El preinóculo permite que las células bacterianas se adapten al medio líquido y comiencen a multiplicarse activamente, esta fase de adaptación es particularmente importante cuando las bacterias provienen de un medio sólido o de un cultivo en condiciones diferentes, como en este caso.

- **Preinóculos sin adición de fuentes adicionales de carbono**

Para ello, se prepararon dos matraces Erlenmeyer con capacidad de aforo de 250 ml, en cada uno de ellos se agregaron 50 ml de medio líquido y tres asadas de un cultivo con 24 horas de crecimiento como inóculo inicial (**Figura 9B**). La edad del inóculo es importante, pues asegura que las bacterias estén en una fase de crecimiento activa y saludable (Caycedo *et al.*, 2021), esto es crucial pues las células en esta etapa son más resistentes a cambios en las condiciones de cultivo y responden más rápidamente a los nuevos sustratos introducidos en el medio, a diferencia de un cultivo que tenga más horas de crecimiento.

- **Preinóculos con adición de fuentes adicionales de carbono**

Se prepararon tres matraces Erlenmeyer adicionales con 48 ml de caldo LB y 2 ml de cada una de las tres fuentes de carbono adicionales (aceite de oliva, glicerol y diésel), lo cual permitió a las bacterias comenzar a adaptar su metabolismo a estos sustratos específicos. Los matraces inoculados se colocaron en un shaker de laboratorio SCILOGEX SK-O330-Pro a una agitación de 220 rpm (Ardila, 2019) durante 16 horas (**Figura 9C**). Al proporcionar este período de aclimatación, se reduce significativamente la variabilidad en los experimentos posteriores, ya que todas las células estarán en un estado fisiológico similar al inocular el cultivo principal.

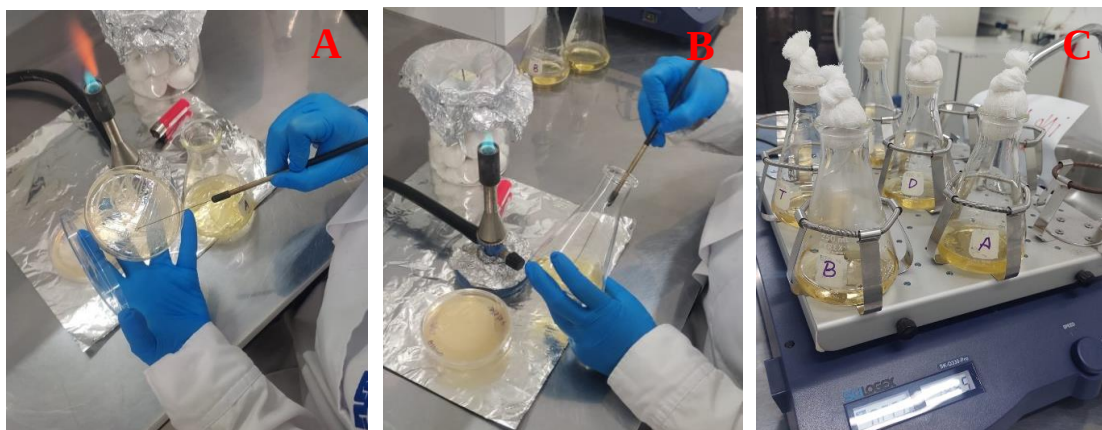


Figura 9. Preparación de preinóculo. A) Toma de asada de cultivo; B) Inoculación de *P. aeruginosa* en medio líquido; C) Crecimiento de las bacterias en diferentes sustratos en Shaker durante 16 horas a 220 rpm (Fuente: Elaboración propia).

5.3.4. Evaluación del crecimiento de *P. aeruginosa*

Para este proceso, se llevó a cabo la preparación de cinco frascos Erlenmeyer de 250 ml siguiendo la metodología descrita por Ardila (2019) con los siguientes contenidos:

Tabla 3. Contenido de frascos para monitoreo de crecimiento de *P. aeruginosa* (Fuente: Elaboración propia)

Frasco	Contenido
B – Blanco o control	100 ml de caldo LB (Miller)
T – Testigo	90 ml de medio líquido
A – Aceite de oliva	88 ml de medio líquido + 2 ml de aceite de oliva
G – Glicerol	88 ml medio líquido + 2 ml glicerol
D – Diésel	88 ml medio líquido + 2 ml de diésel

Los frascos B y T son cruciales en este tipo de experimentos, pues el blanco, al solo contener medio de cultivo permite establecer un control de calidad en las lecturas de absorbancia, además que es el punto de referencia para el espectrofotómetro, por otro lado, el testigo proporciona una línea base para el crecimiento de *P. aeruginosa* en condiciones estándar, contra la cual se pueden comparar los efectos de las fuentes adicionales de carbono.

Los frascos T, A, G y D fueron inoculados con 10 ml del preinóculo preparado, como se explica en el acápite **5.3.3**. Luego, se colocaron el shaker de a una velocidad de 220 rpm (**Figura 10A**), anotando el tiempo cero y habiendo tomado una primera lectura de absorbancia a 600 nm (Pornsunthorntawee *et al.*, 2008), se eligió esta longitud de onda porque está en el rango visible del espectro donde la mayoría de los medios de cultivo tienen absorción mínima, permitiendo, de esta manera, una medición más precisa de la turbidez causada por las células bacterianas.

La lectura inicial utilizó como punto de partida para monitorear el crecimiento bacteriano en cada frasco, durante las primeras 3 horas del experimento, se tomaron muestras de 4 ml cada media hora, estas muestras se colocaron en una celda y se midió su absorbancia utilizando un espectrofotómetro Hach DR 6000 (**Figura 10B**). Las lecturas siguientes se realizaron a cada hora por 4 horas.

Posteriormente, se continuó monitoreando el crecimiento 16 horas después de la última lectura, esto permitió obtener la curva de crecimiento bacteriano. Lo descrito se realizó por triplicado para cada medio como parte del control de calidad de los ensayos realizados y la precisión en los resultados obtenidos, los cuales fueron simplificados mediante una media aritmética.

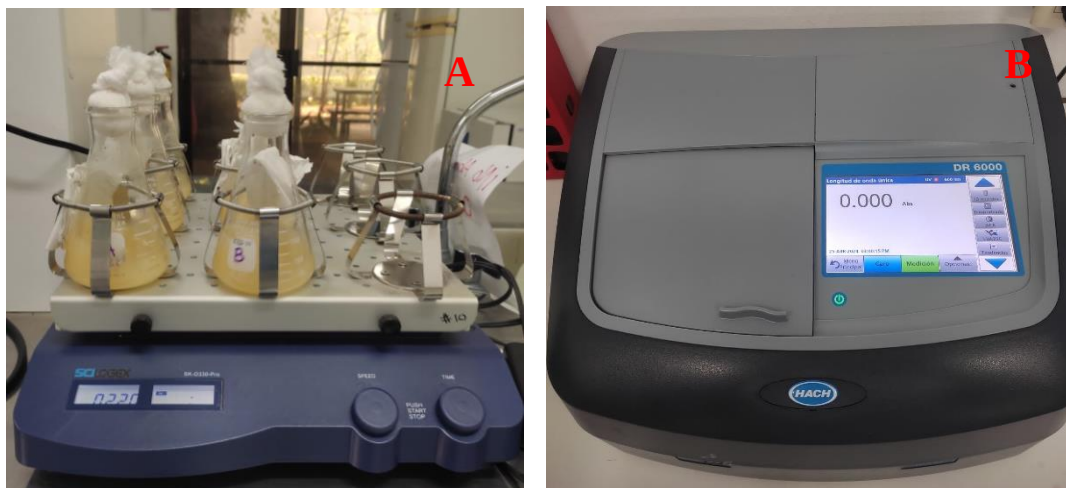


Figura 10. Monitoreo del crecimiento de *P. aeruginosa*. A) Crecimiento en shaker; B) Medición de absorbancia en espectrofotómetro (Fuente: Propia).

5.3.5. Recuento de unidades formadoras de colonias por diluciones seriadas

El recuento en placa es una técnica que proporciona información importante sobre la viabilidad celular, complementando así los datos obtenidos mediante métodos turbidimétricos, para esto se realizaron diluciones seriadas, siguiendo la metodología descrita por Madigan *et al.*, (2006) (**Figura 11**). Se esterilizaron 10 tubos de ensayo y se le agregaron 9 mL de solución salina cada uno. Lenis *et al.* (2009) explican que la alteración de la osmolaridad es un factor de estrés celular que afecta el balance iónico e hídrico. Por lo que el uso de solución salina como diluyente es importante porque mantiene la osmolaridad del medio, previniendo la lisis celular durante el proceso de dilución.

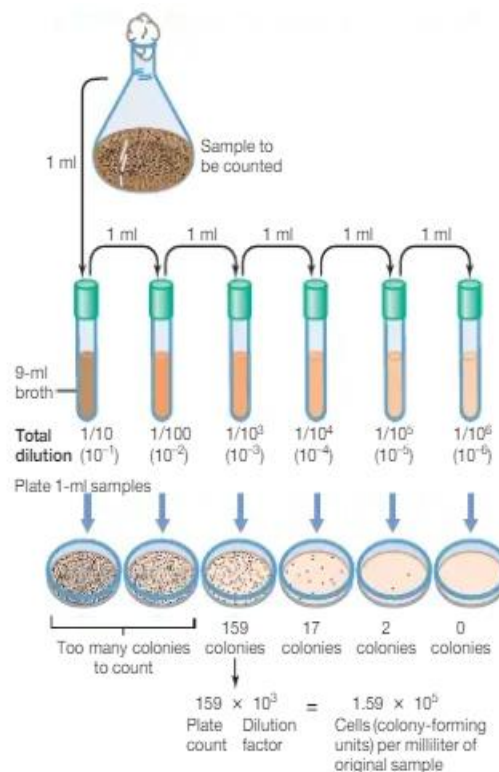


Figura 11. Técnica de recuento en placa y diluciones seriadas. (Fuente: Madigan *et al.*, 2006)

Cada vez que se medía la absorbancia a cada uno de los Erlenmeyer se tomó 1 mL de la suspensión bacteriana inicial con una micropipeta estéril y se transfirió al primer tubo con solución salina (dilución 10^{-1}). Se mezcló con ayuda de un vórtex y se tomó 1 mL de la dilución 10^{-1} para inocular el segundo tubo

(dilución 10^{-2}). Este procedimiento se repitió sucesivamente hasta llegar a la dilución de 10^{-10} . La realización de diluciones seriadas permitió reducir la concentración de células a un nivel que produzca un número contable de colonias en placas.

De las diluciones se tomaron alícuotas de 1 mL y se distribuyeron en la superficie de las placas Petri con LB sólido utilizando la técnica de siembra en superficie (**Figura 12**), extendiendo uniformemente con un asa de Drigalsky estéril, realizándose por triplicado. Las placas sembradas se incubaron de forma invertida a 37°C por 24 h.

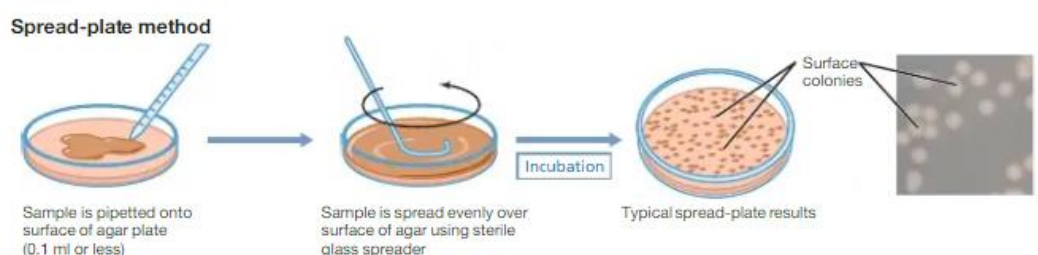


Figura 12. Método de dispersión por superficie. (Fuente: Madigan et al., 2006)

Rivera *et al.* (2021) explican que para determinar el número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) de una muestra, se seleccionan las placas que contienen entre 30 y 300 colonias, se cuenta el número de colonias en esas placas y se multiplica por el número de veces que se diluyó el mL original de las bacterias. Es decir, el número de UFC/mL se calcula con la fórmula representada en la **Figura 11**:

$$\text{UFC por mL de muestra} = \text{Número colonias contadas} * \text{Factor de dilución de la placa contada}$$

Nuevamente, los resultados obtenidos serán simplificados mediante la media aritmética. Por otro lado, es importante resaltar que, solo se realizaron diluciones seriadas para la muestra testigo y para el aceite de oliva. Esto se debe a que el proceso de dilución seriada requiere una gran cantidad de recursos, como medio de cultivo y placas, de los cuales no se disponía en cantidad suficiente.

Por esta razón, se optó por realizar el conteo en el medio basal y en uno enriquecido, lo que permitió construir una curva de calibración. A partir de esta curva, se pudo obtener el número de unidades formadoras de colonia (UFC) por mL de los medios enriquecidos restantes (glicerol y diésel) (**Anexo 7**).

Este enfoque también facilitó el cálculo de las UFC/ml para las demás horas en las que no se realizaron diluciones seriadas y siembras paralelas a las mediciones de absorbancia. De este modo, se optimizó el uso de los recursos disponibles y se logró una estimación práctica del crecimiento bacteriano en los diferentes medios de cultivo.

Para analizar y visualizar los datos de crecimiento bacteriano, se utilizó MATLAB para graficar UFC/mL versus tiempo (horas). Se empleó la función logística para obtener un mejor ajuste de la curva de crecimiento. Este enfoque permitió una representación más precisa de las diferentes fases del crecimiento bacteriano y facilitó la obtención de parámetros importantes como $X_{m\acute{a}x}$, $\mu_{m\acute{a}x}$ y t_{exp} .

La construcción de estas curvas de crecimiento facilitó la comprensión de las diferentes fases del comportamiento cinético del microorganismo de estudio, esto dio la pauta para conocer el tiempo óptimo para obtener mejores rendimientos del producto de interés (O'Connor, 2019).

De la misma manera, se graficó la concentración UFC/mL vs Absorbancia, que nos sirvió como una curva de calibración, las cuales son básicas para el momento en que se desee continuar con la investigación o se escale el proceso (Páramo, 2018).

5.4. Obtención de sobrenadante libre de células

Con el propósito de comprobar si efectivamente el medio de cultivo contiene biosurfactantes sintetizados por los microorganismos, se planteó separar y analizar el sobrenadante libre de células. Para ello, una vez culminada la incubación bacteriana, se homogenizó el cultivo en los frascos Erlenmeyer y se vertió el contenido de estos en tubos cónicos para centrifuga de 50 mL previamente etiquetados, los cuales se colocaron en la centrifugadora marca Boyn, modelo HR/T20MM, asegurando que los tubos estuvieran equilibrados

en peso para la centrifugación, la cual tuvo una duración de 5 minutos a 8000 rpm (Jamal *et al.*, 2012) (**Figura 13**).

Tras la centrifugación, se separó el sobrenadante de la biomasa precipitada en el fondo del tubo por medio de decantación, con cuidado de no perturbar el pellet de biomasa (Malik, 2022). Una vez obtenido el sobrenadante libre de células, se transfirió a otros tubos cónicos para analizar la actividad biosurfactante en un ensayo posterior.



Figura 13. Centrifugación de medio de cultivo líquido (Fuente: Elaboración propia).

Además, se calculó el rendimiento del medio líquido recuperado para evaluar la eficiencia del proceso de separación. Este rendimiento se determinó como la relación entre el volumen del sobrenadante recuperado después de la centrifugación y el volumen inicial del medio de cultivo introducido en la centrífuga.

La fórmula utilizada para calcular rendimiento fue:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Volumen recuperado (mL)}}{\text{Volumen inicial (mL)}} * 100\%$$

Este cálculo es esencial para asegurar que el proceso de centrifugación y separación sea eficiente y que la pérdida de medio sea mínima, lo que es

crucial para mantener la precisión en los análisis posteriores de la actividad biosurfactante.

5.5. Estimación cualitativa de actividad biosurfactante

El método de dispersión de aceite es una técnica ampliamente utilizada para la detección cualitativa de actividad biosurfactante debido a su simplicidad, rapidez y sensibilidad. Esta prueba se basa en la capacidad de los biosurfactantes para reducir la tensión superficial entre el aceite y el agua, lo que resulta en la dispersión visible del aceite cuando se añade una solución que contiene biosurfactantes.

Para evaluar la capacidad de producción de biosurfactantes por parte de *P. aeruginosa*, se realizó la prueba de dispersión de aceite en placa Petri según la metodología de Sharma *et al.*, (2014). Se agregó agua destilada estéril a una placa Petri y posteriormente se añadió aceite vegetal para formar una capa fina sobre la superficie del agua (**Figura 14**).

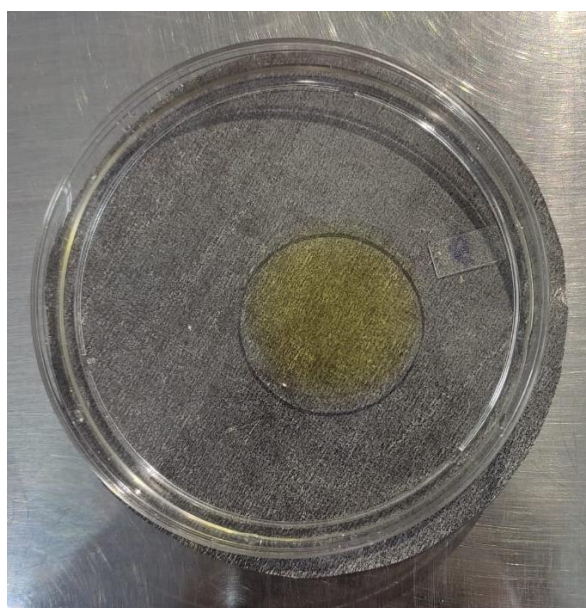


Figura 14. Capa de aceite sobre agua destilada en placa Petri para la prueba de dispersión de aceite (Fuente: Elaboración propia).

Luego, se depositó cuidadosamente el sobrenadante de cultivo bacteriano libre de células (fuente de biosurfactantes) sobre la capa de aceite, este procedimiento se realizó para cada muestra de potencial biosurfactante, además del testigo y el blanco, que sirvió como control negativo. Además, se realizaron repeticiones del experimento para corroborar los resultados.

La presencia de actividad biosurfactante se manifiesta como un halo claro en la capa de aceite alrededor del punto donde se depositó la muestra. Esta técnica es particularmente útil para la selección inicial de cepas productoras de biosurfactantes, ya que permite evaluar rápidamente un gran número de muestras.

Además, este método puede ser utilizado para monitorear la producción de biosurfactantes durante el crecimiento bacteriano, lo que facilita la optimización de las condiciones de cultivo para maximizar la producción de estos compuestos.

VI. Resultados y discusión

En la siguiente sección se exhiben los resultados obtenidos empleando la metodología antes expuesta:

6.1. Activación de la cepa bacteriana

Mediante la siembra por estrías se reactivó la cepa conservada, este método garantizó colonias separadas bien delimitadas en la superficie del medio de cultivo, facilitando el análisis morfológico de los microorganismos.

Macroscópicamente se determinó que las colonias son pequeñas a medianas, presentaban una morfología circular y parecen tener formas irregulares en algunas áreas, son de un color blanquecino, son opacas, los márgenes de las colonias son irregulares y ondulados, asimismo, las colonias parecen tener una elevación baja, es decir, son planas a ligeramente convexas, por último, las colonias tienen una textura lisa y húmeda, lo que indica que podrían ser mucoides.

Esta caracterización coincide con lo reportado por Delgado *et al.*, (2019), quienes aislaron de una muestra de leche fresca de una quesera artesanal y caracterizaron la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, donde describen la apariencia de la cepa como colonias medianas con superficie umbilicada, opacas y mucoides, de forma irregular y bordes ondulados (**Figura 15B**).

Por otro lado, no se observó presencia de contaminación en la placa, como se muestra en la **Figura 15A**, pues en la placa no se encontraba otra morfología que no fuese la típica de *Pseudomonas aeruginosa*, garantizando un cultivo puro para iniciar los experimentos.

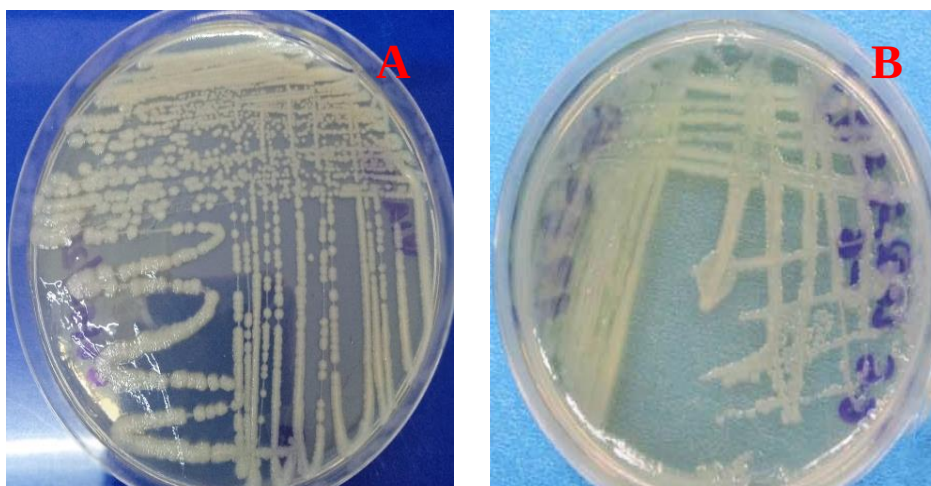


Figura 15. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en placas de agar LB (Fuente: Elaboración propia).

6.2. Verificación de la pureza de la cepa bacteriana

Dado que tanto los cinco repiques de *Pseudomonas aeruginosa* QIA-02 y los cinco repiques de la cepa QIA-13 macroscópicamente presentaban las características morfológicas propias de esta bacteria, se realizó la tinción de Gram a todas las muestras (**Anexo 3**).

A nivel microscópico, se observó una morfología bacilar en cada una de las muestras analizadas, así como una reacción Gram negativa, Pinazo Butron (2020) indica que este tipo de características corresponden al tipo de *Pseudomonas aeruginosa*.

De la misma manera, Rabelo y Márquez (2022), reportan los mismos resultados además destacan la importancia de la morfología y la pureza en la selección de cepas bacterianas para estudios experimentales, pues es esencial para la validez y reproducibilidad de los resultados.

Al no observar otra morfología que no fuera la esperada o una reacción positiva a la tinción de Gram, se corroboró la pureza las muestras, sin embargo, se observó que una de las muestras de las placas de la cepa QIA-13 presentaba una mejor definición y claridad en la visualización microscópica (**Figura 16**), esta muestra mostró menos irregularidades y errores en la tinción y las células bacterianas estaban distribuidas de manera uniforme, por lo que se seleccionó para los ensayos subsiguientes.



Figura 16. Resultado de tinción de Gram de *Pseudomonas aeruginosa* (Fuente: Elaboración propia).

6.3. Curva de calibración (UFC/mL vs Abs)

Siguiendo la metodología descrita en el acápite **5.3** se construyeron, a través de diluciones seriadas, curvas de concentración de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) en función de la absorbancia para cada tratamiento, lo que facilitará estimaciones rápidas de la concentración bacteriana en futuros experimentos.

La curva de calibración para cada una de las condiciones de cultivo en estudio se obtuvo agrupando datos de absorbancia y UFC/mL para todo el proceso cinético durante las 23 horas, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores de absorbancias a 600 nm y valores de UFC/mL a partir de los cuales se construyen las curvas de calibración (Fuente: Elaboración propia).

		Testigo		Aceite		Glicerol		Diesel	
	Tiempo	Abs	UFC/mL	Abs	UFC/mL	Abs	UFC/mL	Abs	UFC/mL
t0	0	0.327	1.00E+09	0.610	2.00E+09	0.438	2.62E+09	0.264	1.20E+08
t1	0.5	0.377	3.99E+09	0.618	2.13E+10	0.444	2.84E+09	0.313	3.38E+08
t2	1	0.397	5.00E+09	0.642	7.00E+10	0.478	4.46E+09	0.365	8.62E+08
t3	1.5	0.409	4.58E+09	0.743	6.55E+10	0.500	5.87E+09	0.374	1.00E+09
t4	2	0.514	1.80E+10	0.763	3.70E+11	0.529	8.27E+09	0.408	1.70E+09
t5	2.5	0.654	1.30E+10	0.918	2.38E+11	0.584	1.51E+10	0.529	8.27E+09
t6	3	0.820	2.64E+10	1.119	7.93E+11	0.648	2.85E+10	0.734	6.08E+10
t7	4	0.851	3.80E+10	1.184	1.16E+12	0.919	2.39E+11	0.857	1.56E+11
t8	5	1.058	7.10E+10	1.349	2.32E+12	1.156	9.67E+11	0.887	1.93E+11
t9	6	1.265	1.20E+11	1.486	2.60E+12	1.291	1.90E+12	0.965	3.22E+11
t10	7	1.326	2.00E+11	1.506	4.20E+12	1.409	3.23E+12	1.052	5.45E+11
t11	23	1.468	4.18E+11	1.576	6.39E+12	1.458	3.98E+12	1.405	3.17E+12

Las curvas de calibración para las diferentes condiciones de cultivo se muestran a continuación:

- **Medio basal**

La **Figura 17** muestra la curva de calibración de *P. aeruginosa* en medio LB donde se observa una relación exponencial entre la absorbancia y la concentración celular. Iniciando con 0.327 Abs correspondiente a 1.00E+09 UFC/mL, a medida que la absorbancia aumenta, se aprecia un incremento cada vez más pronunciado en la concentración de células, especialmente a partir de una absorbancia de 1.058, alcanzando una concentración máxima de células viables a una absorbancia de 1.468, es decir 4.18E+11 UFC/mL.

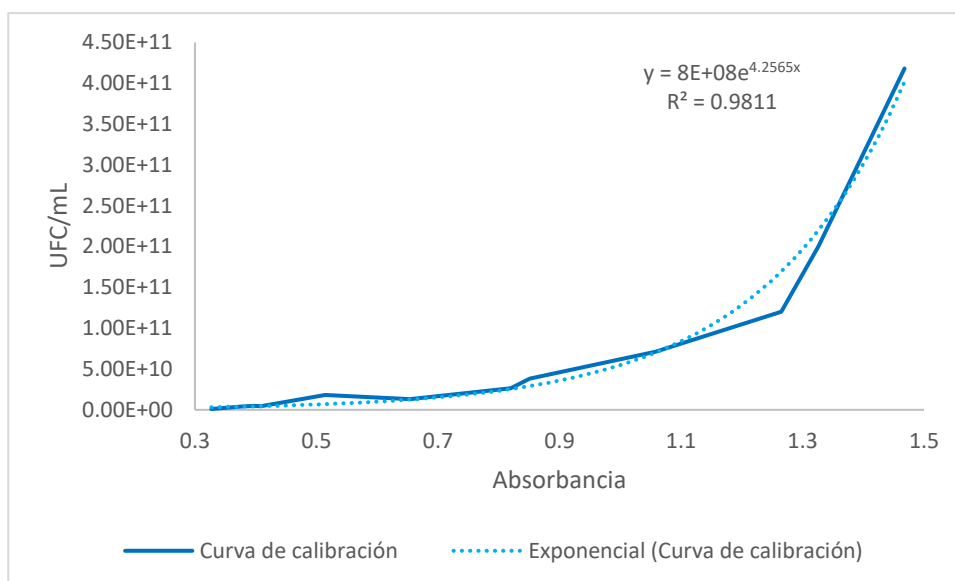


Figura 17. Curva de calibración para *P. aeruginosa* en medio LB

- **Aceite de oliva**

Por otro lado, al examinar la **Figura 18**, se evidencia un cambio en el patrón de crecimiento. En este caso, la relación entre absorbancia y UFC/mL es un modelo potencial, iniciando con una absorbancia de 0.610 correspondiente a $2.00E+09$ UFC/mL. En comparación con el medio LB, el aceite de oliva permite alcanzar concentraciones celulares más altas, llegando hasta $6.39E+12$ UFC/mL a una absorbancia de 1.576.

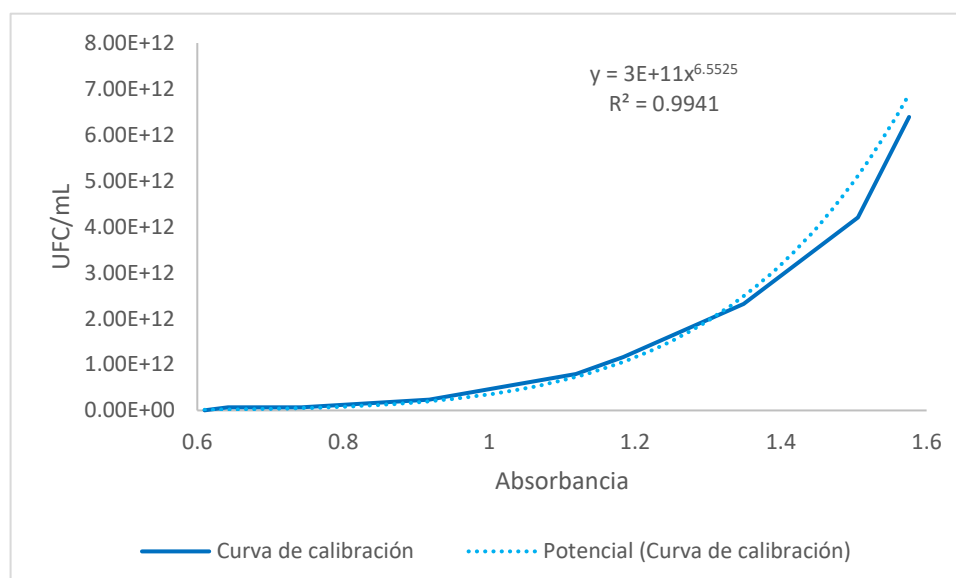


Figura 18. Curva de calibración para *P. aeruginosa* suplementada con aceite de oliva

- **Glicerol**

En cuanto a la curva de calibración presentada en la **Figura 19**, se observa también un crecimiento potencial. Iniciando con una absorbancia de 0.438 correspondiente a 2.62E+09 UFC/mL, sin embargo, se puede apreciar que el aumento en la concentración celular se vuelve más pronunciado a partir de una absorbancia de aproximadamente 1.156, alcanzando concentraciones de 9.67E+11 UFC/mL.

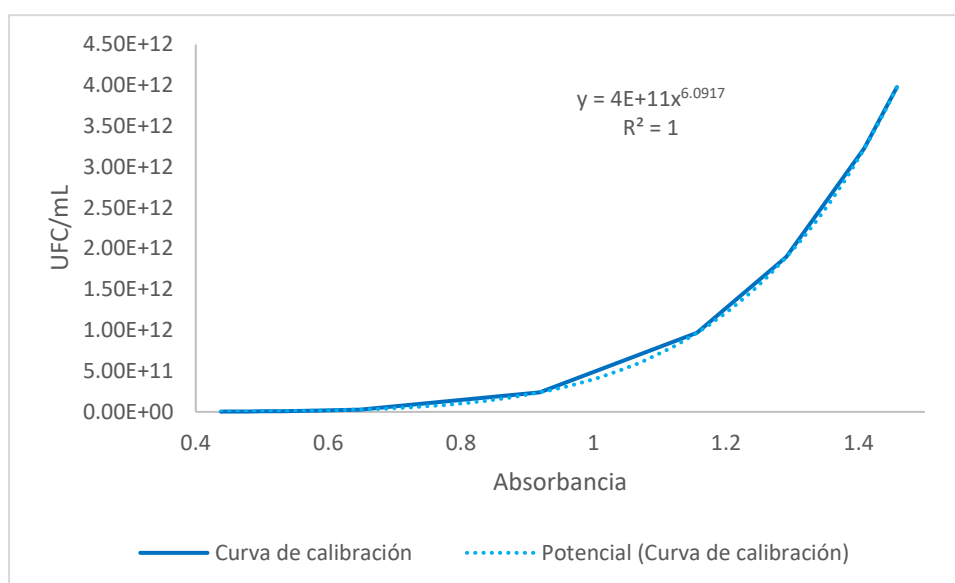


Figura 19. Curva de calibración para *P. aeruginosa* suplementada con glicerol

- **Diésel**

Finalmente, al analizar la **Figura 20** se observa nuevamente un crecimiento potencial, esta curva muestra el aumento en la concentración celular a altas absorbancias (de 1.20E+08 UFC/mL a 0.264 Abs hasta 3.17E+12 a 1.405 Abs).

Esta relación es particularmente útil para el monitoreo en tiempo real del crecimiento bacteriano sin necesidad de realizar conteos de UFC/mL frecuentes, lo que puede ahorrar tiempo y recursos en futuras investigaciones.

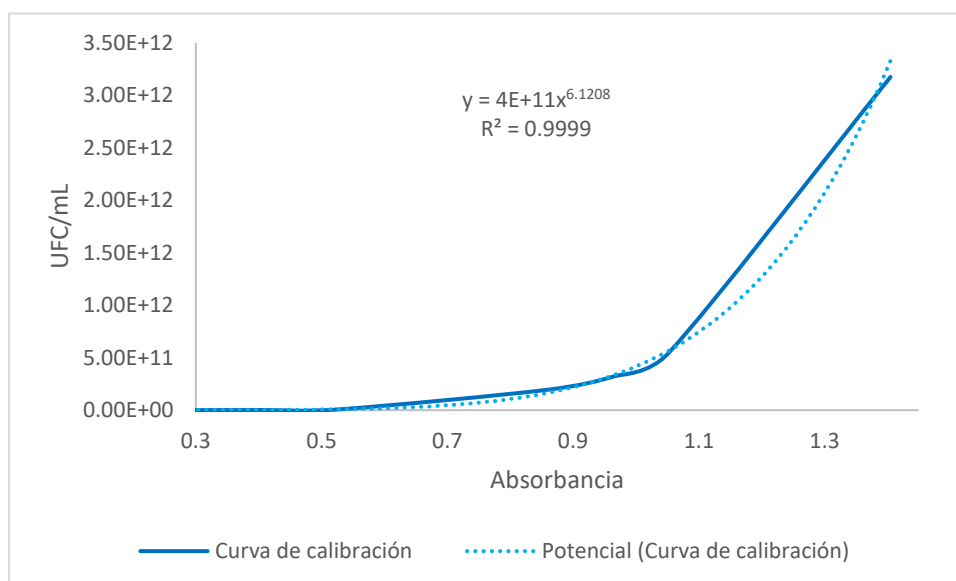


Figura 20. Curva de calibración para *P. aeruginosa* suplementada con diésel

6.4. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en diferentes fuentes de carbono adicionales

La realización de dos monitoreos de crecimiento, uno basal y otro con las fuentes de carbono adicionales, permitió evaluar el efecto específico de la adición de estos sustratos en el cultivo de *P. aeruginosa*, el cual se explica a continuación:

- **Medio basal**

Analizando la **Figura 21** podemos observar que la curva de crecimiento de *P. aeruginosa* en caldo LB mostró el patrón típico de crecimiento bacteriano con una fase de latencia de aproximadamente 2 horas. A partir de las 2.5 horas, se observa un incremento rápido en la concentración de biomasa, indicando el inicio de la fase exponencial, la cual duró aproximadamente 5 horas, la tabla de datos se puede observar en el **Anexo 7**. La fase estacionaria se alcanzó tras unas 7 horas de incubación y la concentración máxima fue de **4.18E+11 UFC/mL** a las 23 horas.

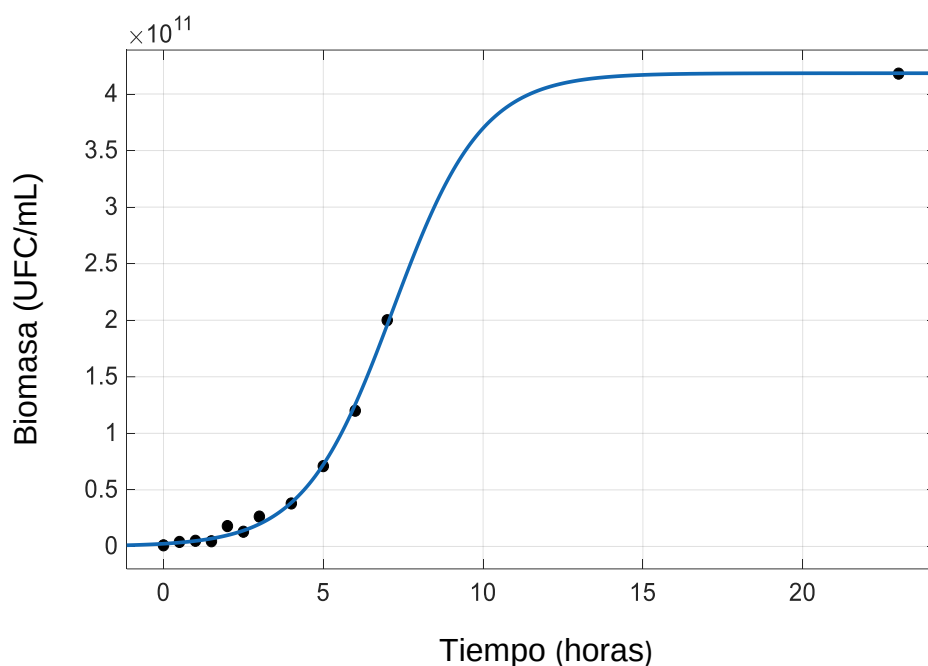


Figura 21. Curva de concentración UFC/mL para *P. aeruginosa* en medio LB

En términos de parámetros de crecimiento, el medio basal mostró una biomasa máxima de **4.18E+11 UFC/mL**. La tasa de crecimiento específica fue de **0.7187 h⁻¹**, resultando en un tiempo de duplicación de **1.391 horas**. El tiempo para alcanzar la tasa máxima de crecimiento fue de **7.177 horas**. Estos parámetros sugieren que, aunque el crecimiento es sostenible en el medio basal, está limitado en comparación con los medios suplementados. El medio basal sirvió como una referencia importante para evaluar el impacto de los diferentes suplementos en el crecimiento bacteriano.

- **Medio suplementado con aceite de oliva**

Analizando la **Figura 22**, podemos identificar que la fase de latencia abarca de las 0 horas hasta las 1.5 horas, esta fase refleja el periodo de adaptación de la bacteria al nuevo medio. La fase exponencial se extiende de las 2 horas hasta las 7 horas, y luego el crecimiento empieza a desacelerar hasta llegar a la fase estacionaria de las 7 a las 23 horas, alcanzando una biomasa máxima de **6.39E+12 UFC/mL**.

De esta manera, si analizamos el rendimiento de biomasa en ambos medios, podemos notar que: el medio basal tuvo un incremento de **1.00E+09** a

2.00E+11 UFC/mL en 7 horas y el aceite de oliva un incremento de **2.00E+09** a **4.20+12 UFC/mL** en el mismo periodo de tiempo. Esto representaría un rendimiento de hasta 20 veces mayor para el aceite de oliva en comparación con el medio basal, lo que indicaría su eficacia como fuente de carbono adicional.

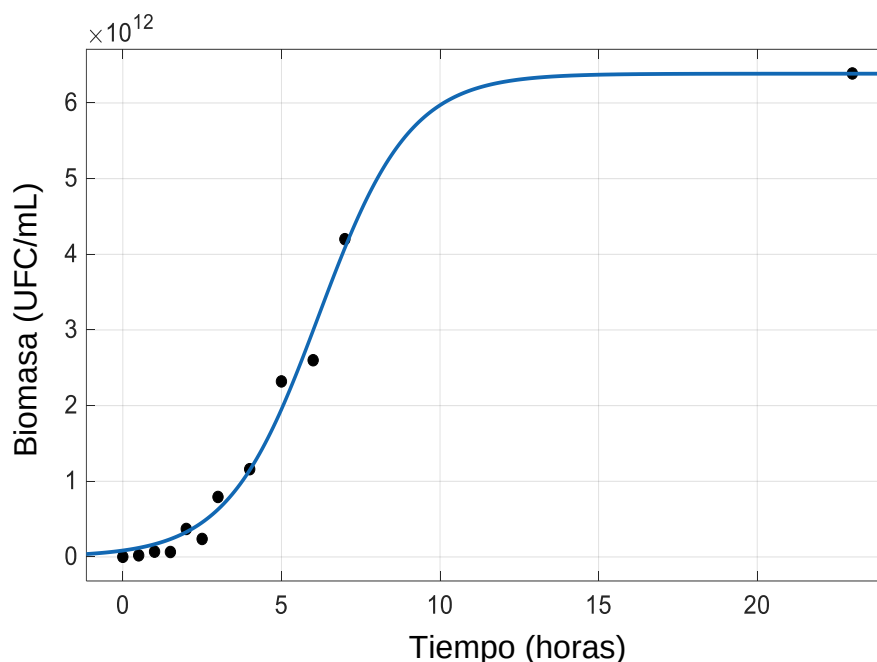


Figura 22. Curva de concentración para *P. aeruginosa* suplementada con aceite de oliva

Por otro lado, analizando los parámetros obtenidos de la función logística explicada en la sección **3.4.1**, la concentración de biomasa máxima (X_{max}) en el medio basal fue de **4.18E+11 UFC/mL** en comparación al medio suplementado con aceite de oliva que fue de **6.39E+12 UFC/mL**, esto indica que el medio suplementado con aceite de oliva permitió alcanzar una población bacteriana más alta que el medio basal. Esta fuente de carbono probablemente aportó nutrientes adicionales que favorecieron un mayor crecimiento.

Asimismo, la tasa de crecimiento específica (μ_{max}) fue de **0.7187 h⁻¹** para el medio basal, mientras que en el medio suplementado con aceite de oliva fue de **0.697 h⁻¹**, lo que indica que la tasa de crecimiento máxima fue ligeramente menor en el medio con aceite de oliva. Sin embargo, al expresar estas tasas en términos de duplicaciones por hora, el medio con aceite de oliva mostró un

tiempo superior. Esto sugiere que, aunque la tasa de crecimiento específica es ligeramente inferior, la población bacteriana en el medio con aceite de oliva puede alcanzar niveles más altos de biomasa en un período de tiempo mayor.

Además, el período durante el cual el crecimiento es más rápido (t_{exp}) fue de **7.177** horas en el medio basal y de **6.179** horas en el medio con aceite de oliva. Esto indica que, a pesar de que el medio con aceite de oliva permite un crecimiento más elevado, la duración de la fase exponencial fue más corta en este medio.

- **Medio suplementado con glicerol**

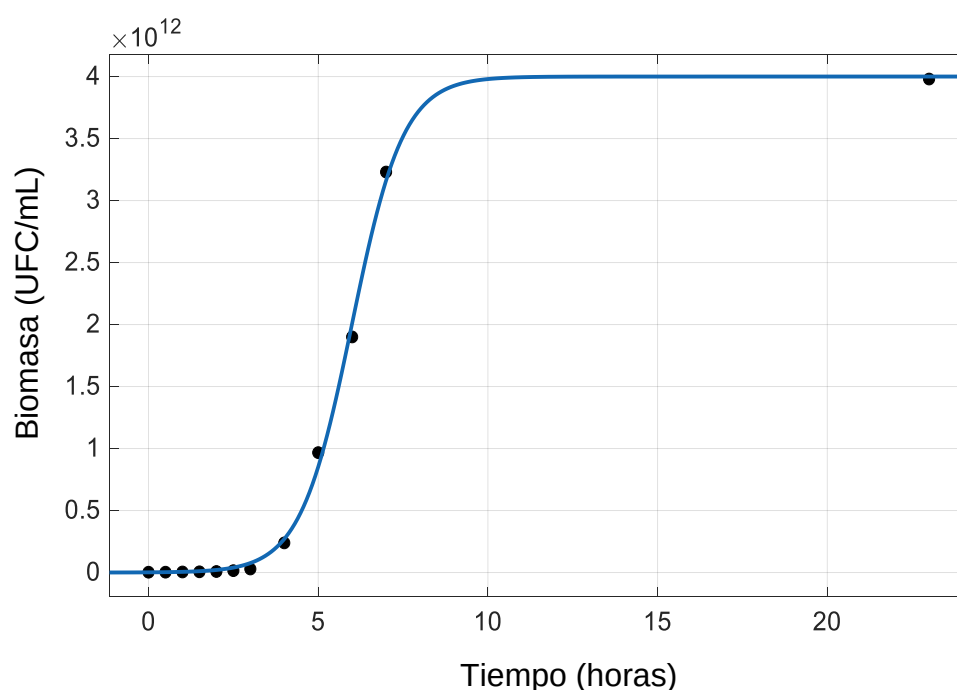


Figura 23. Curva de concentración para *P. aeruginosa* suplementada con glicerol

La **Figura 23** nos muestra el crecimiento de *P. aeruginosa* en un medio suplementado con glicerol, donde podemos identificar la fase de latencia la cual tuvo una duración de 3 horas, pues el crecimiento es lento en reproducción. A partir de las 3 horas se observa un quiebre en la gráfica, esto representa el inicio de la fase exponencial de crecimiento, donde hay un incremento rápido de biomasa (de 2.82×10^{10} a 3.23×10^{12}) hasta las 7 horas. A partir de las 7 horas podemos notar una desaceleración en el crecimiento hasta

alcanzar la fase estacionaria, que se extiende de las 7 hasta las 23 horas, con una concentración final máxima de **3.98E+12 UFC/mL**.

Figueroa (2021) realizó pruebas de detección de producción de biosurfactantes utilizando glicerol (3% v/v) como fuente de carbono, con lo cual logró cuantificar **11.33E+08 UFC/mL** a un tiempo de **7.96 h**. Haciendo uso del **Anexo 7** y la **Figura 19** podemos notar que el resultado obtenido en nuestro estudio para el glicerol (**3.23E+12 UFC/mL** a las 7 horas) es considerablemente mayor aun cuando se utilizó una concentración menor del sustrato (2% v/v), esto puede deberse a la disponibilidad extra de nutrientes en el medio LB a diferencia del medio mínimo mineral utilizado en el estudio de Figueroa (2021), además de la concentración de biomasa inicial utilizada en cada estudio.

Por otra parte, el medio suplementado con glicerol mostró resultados interesantes en términos de crecimiento bacteriano. La concentración de biomasa máxima alcanzada fue de **4.00E+12 UFC/mL**, la cual es superior al medio basal (**4.18E+11 UFC/mL**) y al medio con diésel (**3.17E+12 UFC/mL**), aunque ligeramente inferior al medio con aceite de oliva (**6.39E+12 UFC/mL**). Esto sugiere que el glicerol proporciona condiciones favorables para el crecimiento bacteriano, permitiendo alcanzar una población considerablemente alta.

Si hablamos de los parámetros obtenidos de la gráfica, la tasa de crecimiento específica en este medio fue notablemente superior a todos los demás, con un valor de **1.317 h⁻¹**. Esta tasa de crecimiento elevada se refleja en el tiempo de duplicación más corto entre todos los medios estudiados, siendo de apenas **0.759 horas**. Estos datos indican que las bacterias se reprodujeron más rápidamente en presencia de glicerol, sugiriendo que este sustrato es fácilmente metabolizable por la población bacteriana.

Además, el tiempo en el que ocurre la tasa máxima de crecimiento para el medio con glicerol fue el más corto de todos, con **5.992 horas**. Esto implica que las bacterias alcanzaron su fase de crecimiento exponencial más rápidamente en este medio, lo que podría indicar una adaptación más rápida al glicerol como fuente de carbono.

Los resultados obtenidos indican que el glicerol no solo favorece un crecimiento bacteriano significativo y acelerado, sino que también facilita una adaptación más efectiva en comparación con los otros medios evaluados. A pesar de que la biomasa final observada no alcanzó los niveles más altos, la eficiencia del crecimiento, medida en términos de velocidad y capacidad de adaptación, fue notablemente superior cuando se utilizó glicerol como suplemento. Sin embargo, un rápido crecimiento no necesariamente se traduce en una mayor producción de biosurfactantes, esto es interesante porque autores como Barrionuevo (2017) reportan que el uso de sustratos solubles en agua, como el glicerol, resulta en una producción menor de biosurfactantes en comparación con el uso de sustratos no solubles en agua, como los n-alcanos y otros tipos de hidrocarburos.

No obstante, tiempos de crecimiento más cortos pueden llevar a una fase estacionaria más temprana, donde típicamente ocurre la mayor acumulación de biosurfactantes, como se ha venido explicando, y esto podría permitir ciclos de producción más rápidos en aplicaciones industriales. La clave estaría en complementar los datos de crecimiento con mediciones directas de la producción de tensioactivos para así desarrollar estrategias de producción eficientes.

- **Medio suplementado con diésel**

La **Figura 24**, muestra que existe un cambio lento de crecimiento de las 0 a las 2.5 horas, lo cual representa la fase de latencia de la bacteria. A partir de las 3 horas hay un incremento rápido, lo que identificamos como la fase exponencial (de **6.08E+10** a **5.45E+11**). A las 7 horas es el inicio de la fase estacionaria que se prolonga hasta las 23 horas, alcanzando un valor máximo de biomasa de **3.17E+12 UFC/mL**.

Abdulsalam *et al.* (2017) lograron una concentración celular de **3.3E+08 UFC/mL** a las 144 horas utilizando un medio mineral suplementado con 2% de diésel. En comparación, en este estudio se obtuvo **3.38E+08 UFC/mL** a la 1 hora, estos resultados muestran que se alcanzó una concentración ligeramente mayor en un tiempo menor. La concentración de biomasa máxima (**3.17E+12 UFC/mL**) fue superior al medio basal pero inferior a los medios con

aceite de oliva y glicerol. Esto indica que el diésel también favoreció el crecimiento bacteriano, aunque en menor medida que los otros suplementos.

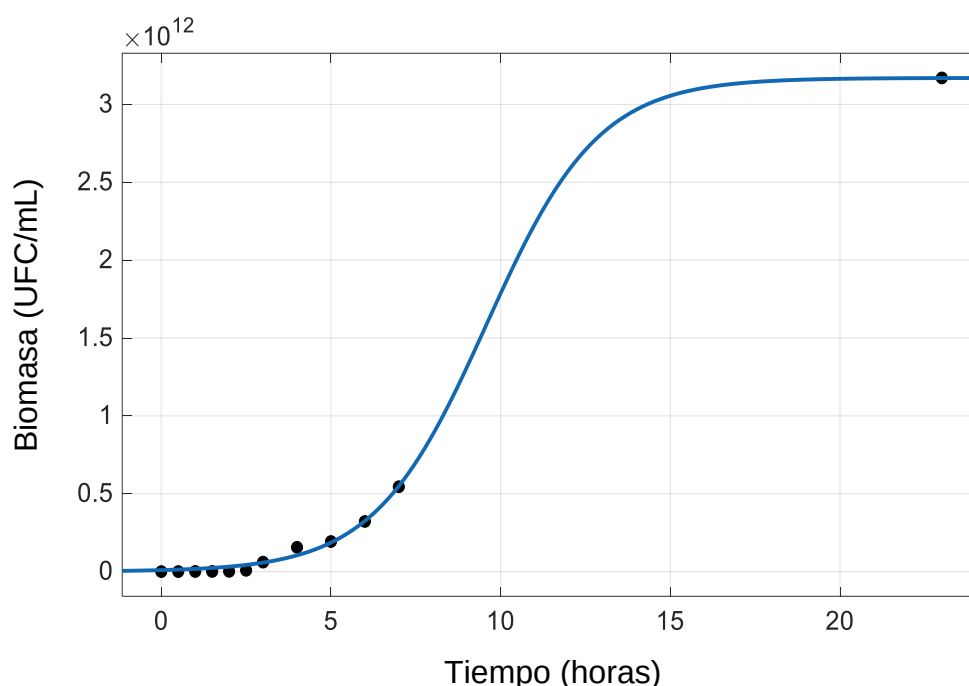


Figura 24. Curva de concentración para *P. aeruginosa* suplementada con diésel

La tasa de crecimiento específica en el medio con diésel (**0.6059 h^{-1}**) fue la más baja, resultando en el tiempo de duplicación más largo (**1.650 horas**). Esto sugiere que, aunque el diésel permite un crecimiento considerable, el proceso es más lento en comparación con los otros medios. El tiempo de la tasa máxima de crecimiento para el medio con diésel fue el más largo (**9.579 horas**), indicando una fase de adaptación más prolongada antes de alcanzar el crecimiento exponencial máximo.

Finalmente, analizando las 4 curvas de crecimiento presentadas y comparando el crecimiento de *P. aeruginosa* en los diferentes medios podemos notar que el medio LB suplementado con las fuentes de carbono adicionales estimuló el crecimiento bacteriano más allá de los nutrientes disponibles en el medio LB. La fase de latencia redujo en todos los casos, siendo más notable en el medio suplementado con aceite de oliva, lo que sugiere una rápida adaptación por parte de *P. aeruginosa* a este sustrato.

Asimismo, el aceite de oliva mostró la fase exponencial más pronunciada, seguida por el glicerol y diésel, el medio basal tuvo la fase exponencial más lenta. Estos resultados evidencian la capacidad de *P. aeruginosa* para utilizar estos compuestos como fuentes suplementarias de carbono y energía. La mayor tasa de crecimiento alcanzada con el aceite de oliva como fuente de carbono adicional sugiere que *P. aeruginosa* puede metabolizar eficientemente los ácidos grasos presentes en este sustrato. Esto podría estar relacionado con la producción de lipasas y otras enzimas que facilitan la degradación de lípidos complejos (Uscátegui *et al.*, 2012).

Acuña (2019) reporta resultados similares a los obtenidos en este estudio. En su investigación, se observó la máxima producción de biosurfactante utilizando medio LB con aceite de oliva como fuente de carbono adicional, sin embargo, el tiempo de incubación fue de 4 días, con las mismas condiciones de agitación (220 rpm) y temperatura (30°). Además, llevó a cabo un ensayo en el que utilizó glicerol como fuente de carbono en un medio diferente (MMS). Los resultados indicaron que la cantidad de biosurfactante producida en este medio fue inferior en comparación con la obtenida en medio LB utilizando la misma fuente de carbono. Esto sugiere que el tipo de medio de cultivo puede tener impacto significativo en la producción de biosurfactantes, incluso cuando se utilizan las mismas fuentes de carbono.

Asimismo, Osorio (2018) experimentó con la adición de aceite de cocina al medio mínimo de sales, incubando la mezcla en un shaker durante 4 días. Sin embargo, su estudio concluyó que es más eficiente cultivar en caldo LB con aceite durante 48 horas, en lugar de utilizar el medio mínimo de sales.

De esta manera, la versatilidad metabólica de *P. aeruginosa* para degradar y asimilar hidrocarburos y aceites se corrobora con estos hallazgos. Esta capacidad es particularmente relevante en el contexto de la producción de biosurfactantes, ya que sugiere que la bacteria puede adaptarse a una variedad de sustratos, incluyendo subproductos industriales como el glicerol o contaminantes como el diésel, lo cual es ventajoso para la optimización de procesos de producción industrial más económicos y sostenibles.

6.5. Obtención de metabolito con potencial biosurfactante

La obtención de un sobrenadante libre de células es un paso crucial en la investigación de metabolitos extracelulares, como los biosurfactantes, producidos por microorganismos (Figueroa, 2021). Este proceso permitió, por una parte, separar los compuestos de interés, y por la otra, eliminar la interferencia de las células bacterianas en los análisis posteriores (**Figura 25**).

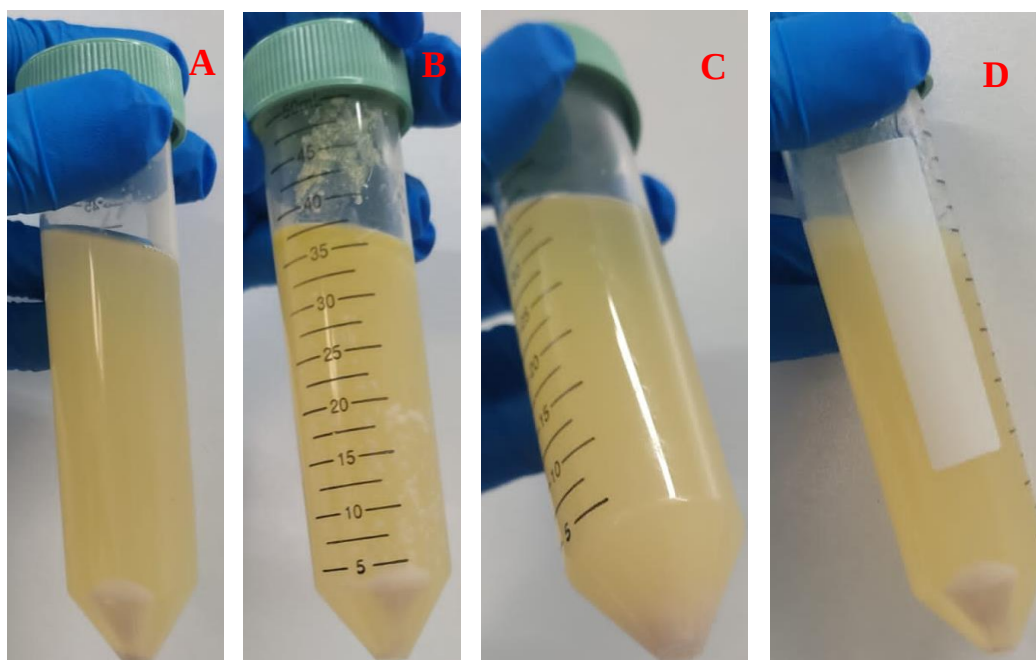


Figura 25. Resultado de la centrifugación de los medios de cultivo. A) El cultivo en medio LB sin suplementar; B) El cultivo en medio LB suplementado con aceite de oliva; C) El cultivo en medio LB suplementado con glicerol; D) El cultivo en medio LB suplementado (Fuente: Elaboración propia)

Puede observarse en la figura la clara separación entre el sobrenadante y los restos celulares precipitados. Se centrifugaron aproximadamente 35 mL de sobrenadante con potencial biosurfactante de cada muestra y se recuperaron alrededor de 33 mL de sobrenadante mediante decantación. Utilizando la fórmula explicada en el acápite 5.4., este resultado presenta un rendimiento de aproximadamente el 95% de sobrenadante con potencial biosurfactante, lo cual es un indicador positivo de la eficacia del proceso de separación. Industrialmente, estos resultados son prometedores, pues este porcentaje de recuperación sugiere que el proceso de obtención es altamente eficiente y podría ser económicamente viable a gran escala.

De la misma manera, la biomasa precipitada es un subproducto valioso que podría tener aplicaciones en diversas industrias, por ejemplo, como aditivo en alimentos para animales o como materia prima para la producción de biocombustibles. La implementación de estrategias de aprovechamiento de esta biomasa, podría mejorar significativamente la sostenibilidad y rentabilidad del proceso a escala industrial. Esto no solo maximizaría el valor extraído de cada lote de producción, sino que también alinearía el proceso con los principios de la bioeconomía y la producción sostenible.

6.6. Método de dispersión de aceite

Al realizar esta prueba se pudo concluir que, *P. aeruginosa* produce activamente moléculas biosurfactantes durante las condiciones de crecimiento establecidas en el estudio.

- **Medio basal**

La **Figura 26** muestra la formación de un halo pequeño de aproximadamente 1.5 cm, lo que indica una producción basal de BS en el medio LB. Este resultado es indicativo de que *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de utilizar las fuentes de carbono presentes en el medio LB, como extracto de levadura y triptona, para apoyar no solo su crecimiento, sino también la síntesis de biosurfactantes, aunque a niveles relativamente bajos.



Figura 26. Dispersión del aceite utilizando sobrenadante con potencial biosurfactante obtenido del cultivo en LB (Fuente: Elaboración propia).

Este comportamiento no es del todo inesperado. El medio LB, siendo rico en nutrientes, proporciona suficientes elementos básicos para que la bacteria mantenga una producción basal de BS sin la necesidad de fuentes de carbono adicionales, sin embargo, al comparar estos resultados con los obtenidos en los cultivos suplementados se observa una clara mejora en la producción de BS, evidenciada por un halo de mayor tamaño. Esto valida la hipótesis de que la adición de dichas fuentes potencia la producción de biosurfactante.

- **Medio suplementado con aceite de oliva**

La **Figura 27** muestra el halo más grande y definido, de aproximadamente 3 cm, sugiriendo la mayor producción de biosurfactantes. Este resultado destaca la eficiencia del aceite de oliva como fuente de carbono adicional para potenciar la producción de BS por *Pseudomonas aeruginosa*. Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos por Acuña (2019), quien también reportó un halo prominente al utilizar biosurfactante extraído de un sobrenadante libre de células derivado de un cultivo en medio LB suplementado con aceite de oliva para la prueba de dispersión de aceite.

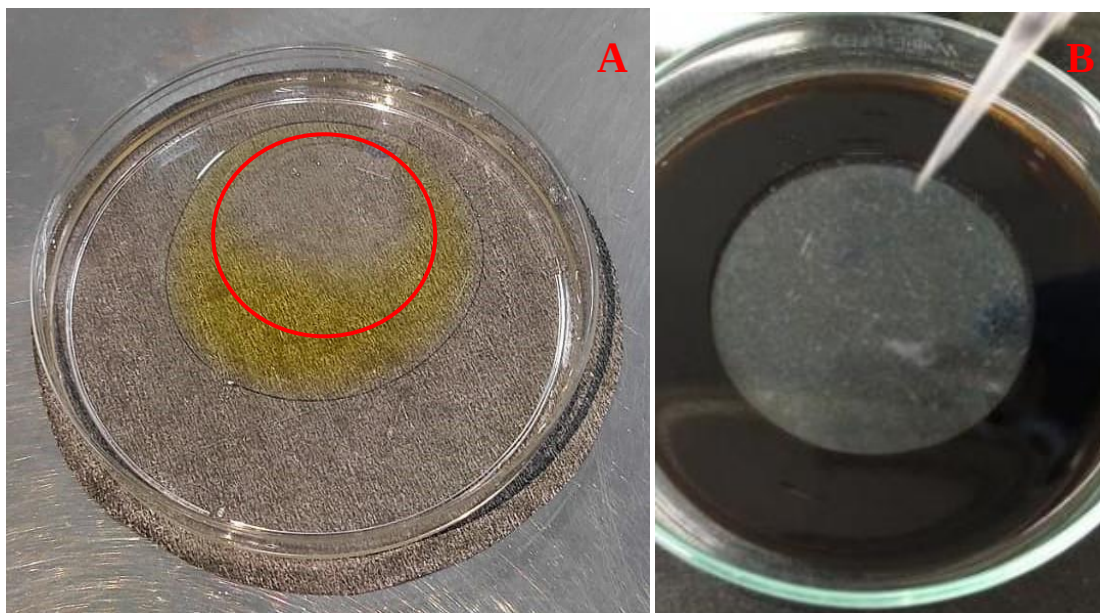


Figura 27. Dispersión del aceite utilizando un cultivo en LB suplementado con aceite de oliva (Fuente A: Elaboración propia; B: Acuña, 2019).

Sin embargo, es notable que en el estudio de Acuña (2019) se observó un halo aún mayor que el reportado en esta investigación. Esta diferencia puede atribuirse a varios factores, como la edad del cultivo utilizado por Acuña, que tenía 4 días, en comparación con el tiempo de cultivo más corto empleado en el presente estudio. Ugaz-Hoyos *et al.*, (2020) reportan que la producción de biosurfactantes tiende a incrementarse durante la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, una etapa donde la acumulación de productos secundarios como los biosurfactantes es más pronunciada; los autores reportan valores de diámetro de halo de dispersión mayores en los cultivos que tenían 5 días.

- **Medio suplementado con glicerol**

La **Figura 28** presenta los resultados de la prueba de dispersión de aceite utilizando el sobrenadante obtenido de un cultivo en medio LB suplementado con glicerol. En esta figura, se observa un halo de dispersión intermedio de aproximadamente 1.5 cm, lo que indicaría una producción positiva de BS en este medio. Los resultados positivos de la dispersión del aceite coinciden con los alcanzados por Guatemala y Barrera (2018), quienes también utilizaron un medio suplementado con glicerol para este ensayo.

No obstante, el halo observado en este estudio es más pequeño en comparación. Esto puede deberse a la concentración de glicerol utilizada, la cual fue del 2%, mientras que Guatemala y Barrera utilizaron el 3%, lo que pudo haber incrementado la producción de BS. Además, en dicho estudio, se empleó un medio de cultivo más complejo (PPGAS) y se realizó una extracción del biosurfactante, lo que permitió concentrar los ramnolípidos y obtener un halo de dispersión más grande.

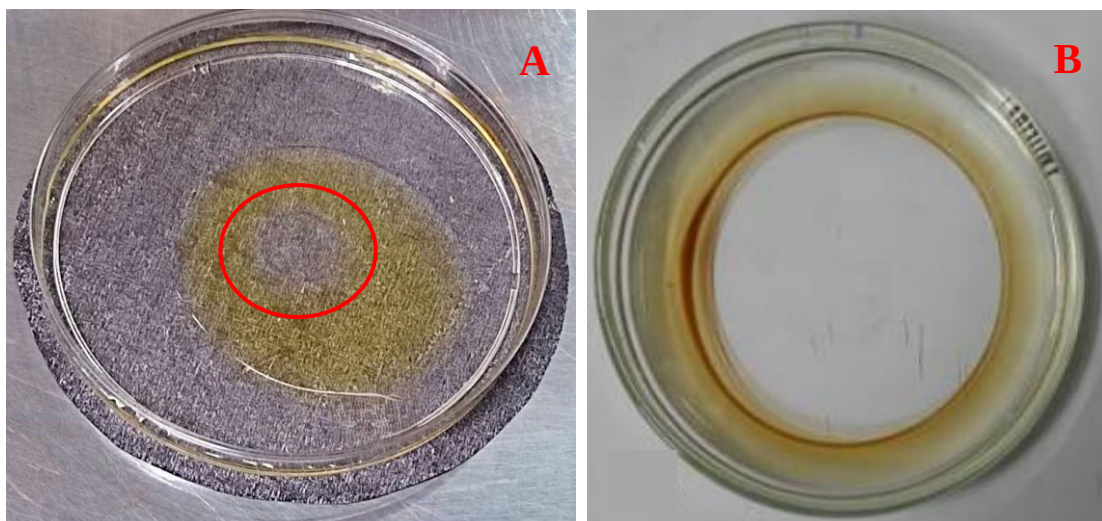


Figura 28. Dispersión del aceite utilizando un cultivo suplementado con glicerol (Fuente A: Elaboración propia; B: Guatemala y Barrera, 2018).

Por otro lado, en este estudio, el halo es menor al observado en el medio suplementado con aceite de oliva e igual al del medio basal, este resultado indica que, bajo las condiciones experimentales empleadas, el glicerol es una fuente de carbono que induce la producción de biosurfactantes en *Pseudomonas aeruginosa*, aunque no es la mejor en comparación con otros suplementos.

- **Medio suplementado con diésel**

La **Figura 29** evidencia que, al someter el sobrenadante obtenido del cultivo suplementado con diésel al ensayo de dispersión de aceite, se observó un halo de aproximadamente 2 cm, lo que sugiere que el diésel también estimula la producción de BS, aunque en menor medida que el aceite de oliva. Por lo tanto, la capacidad de *Pseudomonas aeruginosa* para sintetizar biosurfactantes en presencia de diésel no solo indica su habilidad para utilizar estos compuestos como fuente de carbono, sino también su potencial para participar en procesos de remediación ambiental. Los biosurfactantes producidos pueden mejorar la efectividad de los tratamientos de biorremediación al facilitar la movilización y biodegradación de los hidrocarburos, contribuyendo así a la limpieza de ambientes contaminados de manera más eficiente.

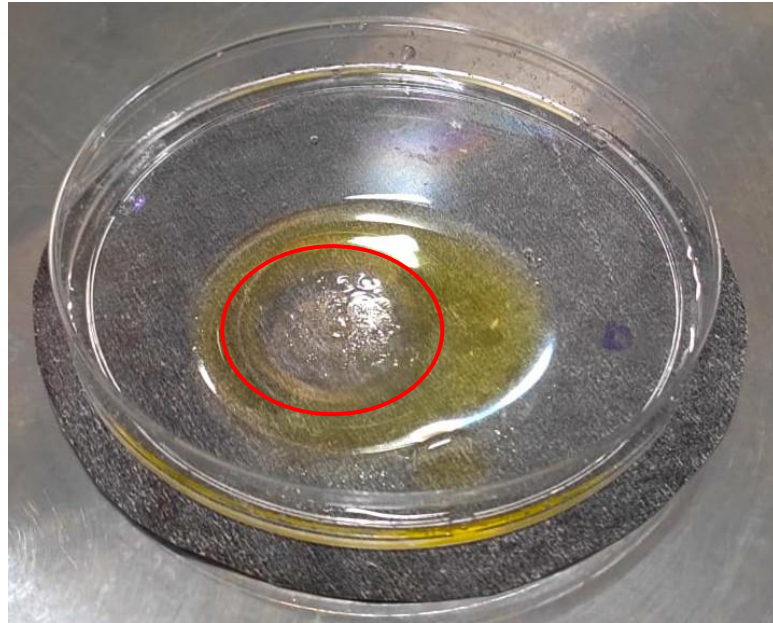


Figura 29. Dispersión del aceite utilizando sobrenadante con potencial biosurfactante obtenido del cultivo en LB suplementado con diésel (Fuente: Elaboración propia).

Los resultados de las 4 pruebas de dispersión de aceite se compararon con un control negativo (medio de cultivo no inoculado), como se muestra en la **Figura 30**. También podrían hacerse controles positivos (usando un surfactante sintético conocido) para complementar los resultados de esta prueba, pero no se contaba con los recursos para la adquisición.

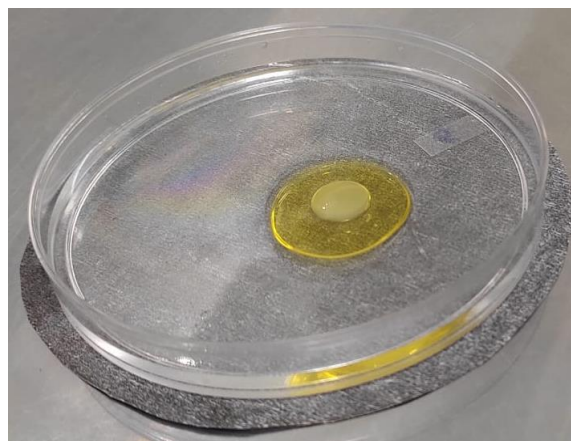


Figura 30. Control negativo para la prueba de dispersión de aceite (Fuente: Elaboración propia)

La formación de ese halo transparente por desplazamiento del aceite indicó actividad biosurfactante en todos los sobrenadantes bacterianos. Estudios previos como el de Morikawa *et al.* (2000), demuestran que el área del halo es proporcional a la concentración de biosurfactantes. Sin embargo, en este ensayo no se realizó una cuantificación. El objetivo era confirmar cualitativamente la presencia de moléculas con propiedades surfactantes en el medio extracelular de *P. aeruginosa* después del crecimiento en condiciones favorables para la producción de biosurfactantes.

En resumen, los resultados de la prueba de dispersión de aceite muestran que el medio LB por sí solo permite la producción de biosurfactantes, pero la suplementación con diferentes fuentes de carbono optimiza esa producción. El aceite de oliva demostró ser el suplemento más eficaz, seguido por el diésel y el glicerol. Esto sugiere que, aunque el medio basal puede soportar la producción de biosurfactantes, la selección de una fuente de carbono adecuada puede mejorar significativamente la eficacia del proceso. Estos hallazgos proporcionan una base para la optimización de la producción de biosurfactantes en aplicaciones industriales y medioambientales, destacando la importancia de ajustar las condiciones de cultivo para maximizar el rendimiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

Finalmente, basándonos en el tipo de investigación realizada y los resultados obtenidos, tanto las mediciones de crecimiento como las del halo de dispersión de aceite proporcionan evidencia para comprobar nuestra hipótesis. En cuanto al crecimiento bacteriano, las curvas de crecimiento obtenidas para los diferentes medios de cultivos (testigo, aceite de oliva, glicerol y diésel) muestran variaciones significativas en términos de la tasa de crecimiento y la concentración máxima. Estas diferencias indican claramente que las distintas fuentes de carbono afectan el crecimiento de *P. aeruginosa* de manera diferencial.

Por otro lado, las variaciones observadas en el tamaño del halo entre los diferentes medios de cultivo sugieren que la fuente de carbono influye en la capacidad de la bacteria en estudio para producir biosurfactantes. Ambas observaciones respaldan nuestra hipótesis alternativa (H_1) de que cultivar *P.*

aeruginosa con diferentes fuentes de carbono afecta significativamente su crecimiento y la capacidad biosurfactante de los metabolitos obtenidos.

Además, los resultados parecen apoyar nuestra hipótesis positiva (H_+), ya que algunas fuentes de carbono (como el aceite de oliva o glicerol) parecen incrementar tanto el crecimiento como la producción de biosurfactantes en comparación con otras fuentes.

VII. Conclusiones

La elaboración de este estudio y el análisis de los resultados han llevado a formular las siguientes conclusiones:

Los resultados obtenidos mostraron que todas las fuentes de carbono adicionales (aceite de oliva, glicerol y diésel) estimularon un mayor crecimiento bacteriano en comparación con el medio basal (LB). De este modo, el aceite de oliva proporcionó el crecimiento más rápido alcanzando una absorbancia máxima de **1.576** y la mayor densidad celular final (**6.39E+12 UFC/mL**), seguido por el glicerol (**1.458 Abs** y **3.98E+12 UFC/mL**) y el diésel (**1.405 Abs** y **3.17E+12 UFC/mL**). Por otro lado, las curvas de crecimiento mostraron una reducción en la fase de latencia y un aumento en la tasa de crecimiento exponencial para los medios suplementados.

El análisis de los parámetros de crecimiento reveló información adicional valiosa. El medio con glicerol mostró la tasa de crecimiento específica ($\mu_{m\acute{a}x}$) más alta, de **1.317 h⁻¹**, y el tiempo de duplicación más corto, de **0.759 horas**, indicando una rápida adaptación de las bacterias a este sustrato. Por otro lado, el diésel presentó la tasa de crecimiento más baja ($\mu_{m\acute{a}x}$ de **0.6059 h⁻¹**) y el tiempo más largo para alcanzar la tasa máxima de crecimiento (**9.579 horas**), sugiriendo una adaptación más prolongada a este sustrato complejo.

En la obtención del metabolito con potencial biosurfactante, se logró un rendimiento del **95%** en la recuperación del sobrenadante libre de células mediante centrifugación y decantación. Este alto rendimiento sugiere que el proceso de obtención es eficiente y potencialmente escalable a nivel industrial.

Se detectó actividad biosurfactante en todos los medios de cultivo, incluido el medio basal LB. El sobrenadante del cultivo suplementado con aceite de oliva mostró la mayor actividad biosurfactante, evidenciando el halo más grande y definido en la prueba de dispersión de aceite. Los cultivos suplementados con glicerol y diésel también mostraron una actividad biosurfactante mejorada en comparación con el medio basal, aunque menor que la del aceite de oliva.

Estos resultados confirman que *Pseudomonas aeruginosa* tiene la capacidad de producir biosurfactantes y que cultivarla con diferentes fuentes de carbono

adicionales afectan significativamente su crecimiento y, potencialmente a la producción de biosurfactantes. La elección del sustrato puede optimizarse dependiendo del objetivo específico: el glicerol podría ser preferible para una producción rápida de biomasa, mientras que el aceite de oliva sería la opción más adecuada para alcanzar una mayor biomasa final y potencialmente una mayor producción de biosurfactante.

Por lo tanto, este estudio no solo contribuye al avance del conocimiento en la producción de estos metabolitos de interés biotecnológico como una estrategia hacia la sostenibilidad, sino que también proporciona bases para el desarrollo de estrategias para la optimización de las condiciones de cultivo en procesos de fermentación. Además, fortalece el compromiso de la universidad con la investigación y desarrollo de tecnologías amigables con el medio ambiente, sentando las bases para futuras investigaciones en la optimización de la producción de biosurfactantes.

VIII. Recomendaciones

Al presentar los resultados de esta investigación, no solo se abren nuevas oportunidades, sino que también emergen nuevas preguntas que deben ser abordadas. En este contexto, se proponen las siguientes recomendaciones:

1. Realizar la purificación del biosurfactante del sobrenadante libre de células, permitiendo el estudio cuantitativo de estos, para determinar la concentración exacta de biosurfactantes producidos en cada condición de cultivo.
2. Implementar pruebas complementarias como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPCL, por sus siglas en inglés) o la cromatografía líquida de alto rendimiento (UPLC) para caracterizar la estructura y composición de los biosurfactantes producidos.
3. Evaluar la producción de biosurfactante a diferentes tiempos de cultivo, especialmente durante la fase estacionaria tardía y la fase de muerte celular, donde la producción de metabolitos secundarios podría ser mayor.
4. Realizar un análisis costo-beneficio considerando que, si bien el aceite de oliva mostró mejores resultados, también es la fuente de carbono más costosa. Esto daría la pauta a investigar la posibilidad de utilizar sustratos de bajo costo o residuos industriales como fuentes de carbono para la producción de biosurfactantes, mejorando así la sostenibilidad del proceso.

IX. Referencias

- Abdulsalam, O. A., Tijjani, M. B., Aliyu, M. S., Garba, I., y Wada-Kura, A. (2017). Comparative Studies on the Biosurfactant Production Capacity of *Bacillus Subtilis* and *Pseudomonas Aeruginosa* Using Engine Oil and Diesel Respectively as Substrate. *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences*, 24(2), 102. <https://doi.org/10.4314/njbass.v24i2.14>
- Acosta Ovallos, A. K. (2019). *Evaluación de técnicas de conservación para microorganismos de importancia en microbiología industrial en el Cepario de la Universidad de Santander*. Universidad de Santander. <https://repositorio.udes.edu.co/handle/001/3756>
- Acuña Narváez, D. P. (2019). *Optimización en la producción de biosurfactante bacteriano en efluente de trampa de grasas de cocina*. <http://hdl.handle.net/1992/45363>
- Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., y Arasu, M. V. (2020). Enhanced production of biosurfactant from bacillus subtilis strain al-dhabi-130 under solid-state fermentation using date molasses from saudi arabia for bioremediation of crude-oil-contaminated soils. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(22), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijerph17228446>
- Ardila Téllez, A. (2019). *Análisis y evaluación de la producción de biosurfactante por una Klebsiella pneumoniae aislada de una trampa de grasas*. <http://hdl.handle.net/1992/45461>
- Barrionuevo, R. M. (2017). *Producción de biosurfactantes bacterianos para su uso en procesos de biotratamiento de efluentes industriales con contenido en metales* [Universidad de Buenos Aires]. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6463_Barrionuevo
- Becerra, L., y Horna, M. (2016). Isolation of biosurfactant producing microorganisms and lipases from wastewaters from slaughterhouses and soils contaminated with hydrocarbons. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 23–31. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.01.03>

- Caycedo Lozano, L., Ramírez, L. C. C., y Suárez, D. M. T. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19, 49–94.
<https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/1770>
- Delgado Silva, H. D., Fonseca Cruz, E. J., y Páramo Aguilera, L. A. (2019). *BIOPROSPECCIÓN MICROBIANA DIRIGIDA A IDENTIFICAR MICROBIOLÓGICA Y MOLECULARMENTE MICROORGANISMOS DE UTILIDAD AGRÍCOLA E*. <http://ribuni.uni.edu.ni/3621/1/94271.pdf>
- El-Sheshtawy, H. S., y Doheim, M. M. (2014). Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity. *Egyptian Journal of Petroleum*, 23(1), 1–6.
<https://doi.org/10.1016/J.EJPE.2014.02.001>
- Enerdata. (2024). *Consumo Mundial de Productos Derivados del Petróleo. Energía y Clima Mundial - Anuario Estadístico 2024*.
<https://datos.enerdata.net/productos-petroliferos/estadisticas-consumo-mundial-petroleo-consumo-domestico.html>
- Figueroa Sanz, M. F. (2021). *Producción de biosurfactantes para su uso potencial en la eliminación de metales pesados*.
<http://hdl.handle.net/20.500.12984/7081>
- Gibson, B., Wilson, D. J., Feil, E., y Eyre-Walker, A. (2018). The distribution of bacterial doubling times in the wild. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1880). <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0789>
- Guatemala Hernández, C., y Barrera Cortés, J. (2018). Efecto de la fuente de carbono en la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Latinoamericana El Ambiente y Las Ciencias*, 9(21), ISSN 1226–1237.
- Guzmán Ruvalcaba, A. (2019). *Evaluación de un biosurfactante sobre la recuperación de aceite crudo en un medio poroso* [Instituto Politécnico Nacional].
<https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/7131358>

- Hernández Forte, I., y Nápoles García, M. C. (2018). Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento de un aislado de rizobio. *Cultivos Tropicales*, 39, 87–90. ISSN 1819-4087.
- Herrera Alonso, M. D., y Sieza Alvarado, J. M. (2021). *Escalado (Banco de Laboratorio) del Bioproceso de Producción de un Bioinsecticida a Base de Bacillus subtilis (LS6-11G)*. Universidad Politécnica de Nicaragua. <http://repositorio.unp.edu.ni/id/eprint/471>
- Jamal, P., Wan Nawawi, W. M. F., Nawawi, W., y Alam, M. (2012). Optimum Medium Components for Biosurfactant Production by *Klebsiella pneumoniae* WMF02 Utilizing Sludge Palm Oil as a Substrate. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6. ISSN 1991-8178
- Ji, F., lu, li, Ma, S., Wang, J., y Bao, Y. (2016). Production of rhamnolipids with a high specificity by *Pseudomonas aeruginosa* M408 isolated from petroleum-contaminated soil using olive oil as sole carbon source. *Annals of Microbiology*, 66. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1203-9>
- Lenis Sanin, Y. Y., Restrepo Betancur, L. F., Olivera Angel, M., y Tarazona Morales, A. M. (2009). Efecto de la osmolaridad, sobre el diámetro y la calidad de oocitos bovinos madurados in vitro. *Revista Lasallista de Investigación*, 6(1), 58–66. ISSN 1794-4449.
- López-Jácome, L. E., Hernández Durán, M., Colin, C., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., y Cendejas, R. (2013). *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología*. 3, 10–18. ISSN 2007-6452
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Martinko, J. M., y Stahl, D. (2006). *Brock biology of microorganisms* (13th ed.). Pearson Education.
- Malik, M. A. (2022). *Separación del precipitado*. LibreTexts. <https://espanol.libretexts.org/@go/page/76297>
- Méndez Úbeda, J. (2018). *Desarrollo a nivel de Laboratorio de un bioplaguicida a bas de Bacillus subitillis, para el control de hongos fitopatógenos en cultivos de interés agrícola*. <http://repositorio.unan.edu.ni/id/eprint/9098>

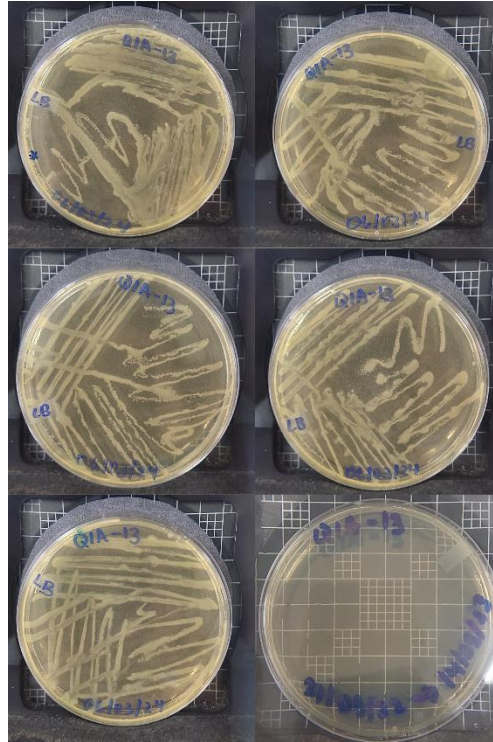
- Morikawa, M., Hirata, Y., y Imanaka, T. (2000). A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488(3), 211–218. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(00\)00124-4](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00124-4)
- Mounira, A., y Abdelhadi, G. (2015). Assessment of four different methods for selecting biosurfactant producing extremely halophilic bacteria. 14(21), 1764–1772. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.14611>
- Mulligan, C., y Gibbs, B. (2004). Types, production and applications of biosurfactants. In *Proceedings-Indian National Science Academy Part B* 70(1), 31–56).
- Najafpour, G. D. (2007). CHAPTER 5 - Growth Kinetics. In G. D. Najafpour (Ed.), *Biochemical Engineering and Biotechnology* (pp. 81–141). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-044452845-2/50005-7>
- O'Connor, J. (2019). *DESCIFRANDO EL CONTENIDO MICROBIANO DE BIOINSUMOS COMERCIALES PARA EL DISEÑO DE UN CONSORCIO CON POTENCIAL BIOFERTILIZANTE*. Universidad Nacional de Ingeniería. <http://repositorio.unan.edu.ni/id/eprint/12693>
- Osorio Ravelo, M. D. P. (2018). Evaluación de biosurfactante extraído de *Pseudomona aeruginosa*. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Páramo, L. (2018). Caracterización de comunidades microbianas con potencial biotecnológico para la prevención del deterioro estructural. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.24283.26405>
- Pinazo Butron, B. S. (2020). *CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE Pseudomonas aeruginosa FRENTE AL POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD*. <https://doi.org/10.26788/riepg.v9i3.2027>
- Pinu, F. R., y Villas-Boas, S. G. (2017). Extracellular microbial metabolomics: The state of the art. *Metabolites*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/metabo7030043>
- Pla, M. L., Oltra, S., Esteban, M. D., Andreu, S., & Palop, A. (2015). Comparison of Primary Models to Predict Microbial Growth by the Plate Count and

- Absorbance Methods. *BioMed Research International*, 2015.
<https://doi.org/10.1155/2015/365025>
- Pornsunthorntawee, O., Arttaweeporn, N., Paisanjit, S., Somboonthanate, P., Abe, M., Rujiravanit, R., y Chavadej, S. (2008). Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. *Biochemical Engineering Journal*, 42(2), 172–179.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.06.016>
- Putri, M., & Hertadi, R. (2015). Effect of Glycerol as Carbon Source for Biosurfactant Production by Halophilic Bacteria *Pseudomonas Stutzeri* BK-AB12. *Procedia Chemistry*, 16, 321–327.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.059>
- Rabelo Florez, R. A., y Márquez Gómez, M. A. (2022). Bacterias Gram negativas biodegradadoras de hidrocarburos. *Revista de Ciencias*, 24(2), e9935. <https://doi.org/10.25100/rc.v24i2.9935>
- Rivera Alonso, K. A., Villegas Ruiz, J. A., y Moreno Aragón, L. A. (2021). *Escalado del Proceso de Producción de un Biofertilizante a Base de un Consorcio Bacteriano*. [Universidad Nacional Politécnica].
<https://repositorio.unp.edu.ni/id/eprint/473>
- Sanz Cervera, S. A. (2011). *Prácticas de Microbiología* (Segunda ed, Issue 1). Universidad de la Rioja. <https://dialnet.unirioja.es/download/libro/100835.pdf>
- Sharma, A., Soni, J., Kaur, G., y Kaur, J. (2014). A Study on biosurfactant production in *Lactobacillus* and *Bacillus* sp. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(11), 723–733. ISSN: 2319-7706
- Sriram, R. (2020, February 20). *Kolabtree Blog*.
<https://www.kolabtree.com/blog/es/biosurfactantes-produccion-y-aplicaciones/>

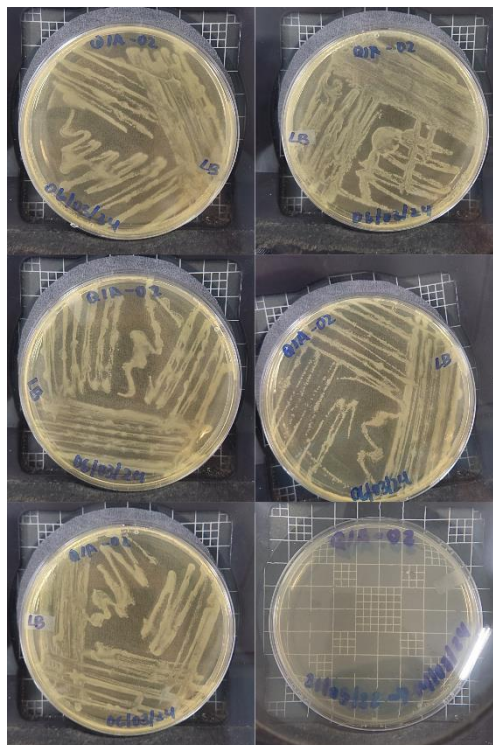
- Ugaz-Hoyos, J., Vega-Cruz, H., Iglesias-Osores, S., y Carreño-Farfan, C. (2020). *Biosurfactantes en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*. <http://dx.doi.org/10.1590/SciELOPreprints.642>
- Uscátegui, Y., Jiménez-Junca, C., Suárez, C., y Prieto-Correa, E. (2012). EVALUACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS A PARTIR DE UNA *Pseudomona aeruginosa* AISLADA DEL FRUTO DE PALMA AFRICANA (*Elaeis guineensis*). *VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA*, 19(3), 280–286. ISSN 0121-4004
- Wachenheim, D. E., Patterson, J. A., & Ladisch, M. R. (2003). Analysis of the logistic function model: derivation and applications specific to batch cultured microorganisms. *Bioresource Technology*, 86(2), 157–164. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00149-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00149-9)
- Walter, V., Syldatk, C., y Hausmann, R. (2000). *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Landes Bioscience. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5974/>
- Weng Alemán, Z., Díaz Rosa, O. E., y Álvarez Molina, I. (2005). Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 43(3), 2–5. ISSN 1561-3003

X. Anexos

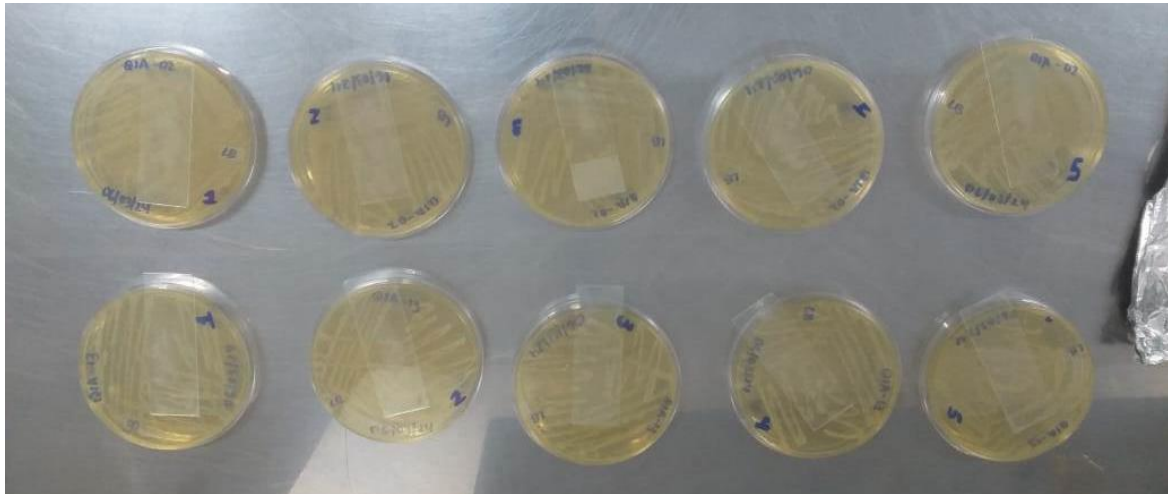
Anexo 1. Repiques de colonia cepa QIA-13 y control negativo



Anexo 2. Repiques de colonias cepa QIA-02 y control negativo



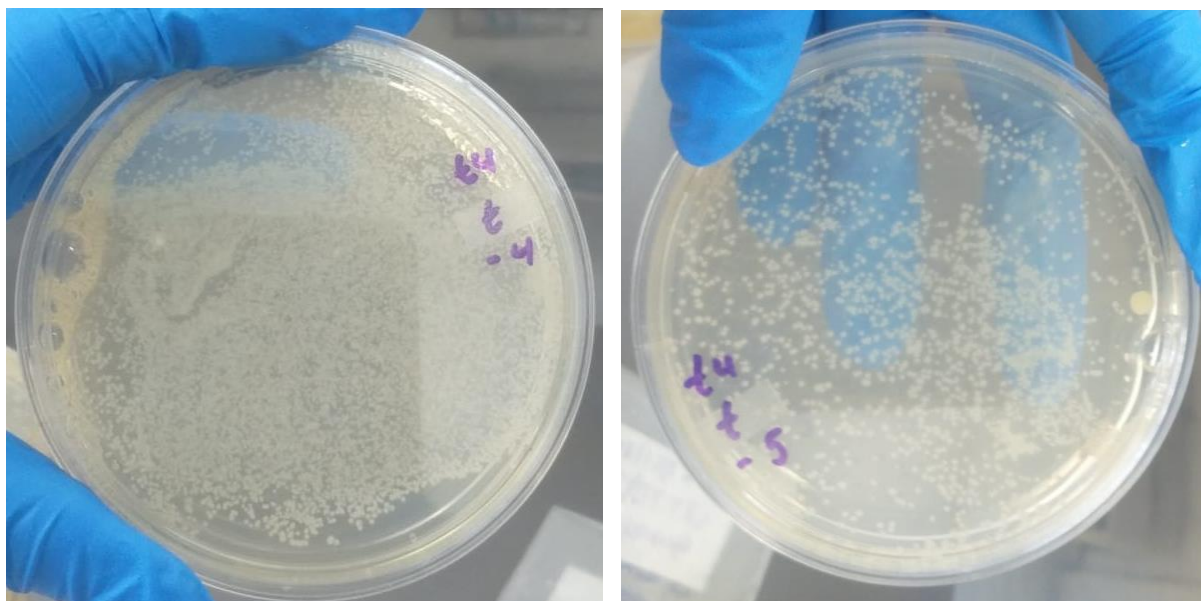
Anexo 3. Frotis a partir de los repiques de QIA-02 y QIA-13



Anexo 4. Formulación Caldo LB (Miller)



Anexo 5. Crecimiento bacteriano en diluciones 10^{-4} y 10^{-5}



Anexo 6. Resultados de absorbancia para cada condición de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*

		Absorbancia			
	Tiempo (h)	Testigo	Aceite	Glicerol	Diésel
t0	0	0.327	0.610	0.438	0.264
t1	0.5	0.377	0.618	0.444	0.313
t2	1	0.397	0.642	0.478	0.365
t3	1.5	0.409	0.743	0.500	0.374
t4	2	0.514	0.763	0.529	0.408
t5	2.5	0.654	0.918	0.584	0.529
t6	3	0.820	1.119	0.648	0.887
t7	4	0.851	1.184	0.919	0.734
t8	5	1.058	1.349	1.156	0.857
t9	6	1.265	1.486	1.291	0.965
t10	7	1.326	1.506	1.409	1.052
t11	23	1.468	1.576	1.458	1.405

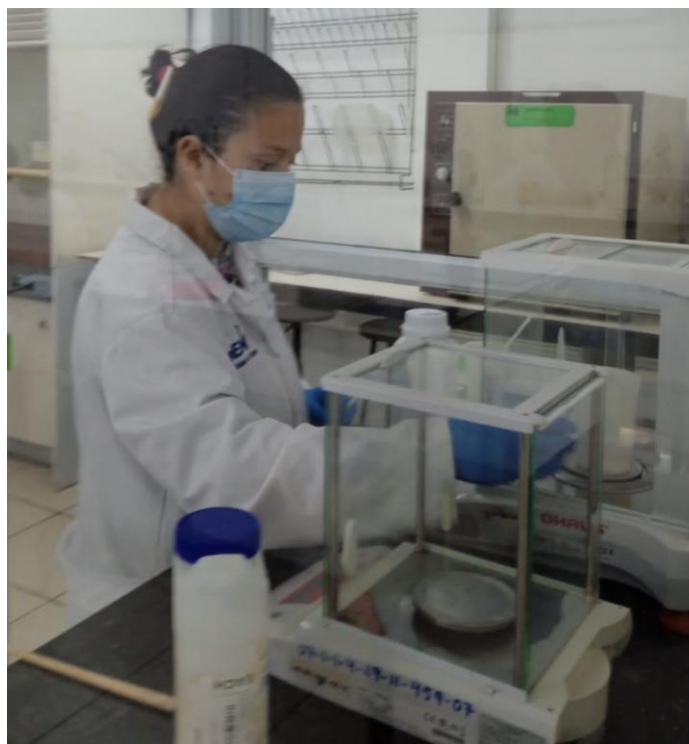
Anexo 7. Número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL) en Diferentes Medios a lo Largo del Tiempo

UFC/mL					
	Tiempo (h)	Testigo	Aceite	Glicerol	Diésel
t0	0	1.00E+09	2.00E+09	2.62E+09	1.20E+08
t1	0.5	3.99E+09	2.13E+10	2.84E+09	3.38E+08
t2	1	5.00E+09	7.00E+10	4.46E+09	8.62E+08
t3	1.5	4.58E+09	6.55E+10	5.87E+09	1.00E+09
t4	2	1.80E+10	3.70E+11	8.27E+09	1.70E+09
t5	2.5	1.30E+10	2.38E+11	1.51E+10	8.27E+09
t6	3	2.64E+10	7.93E+11	2.85E+10	6.08E+10
t7	4	3.80E+10	1.16E+12	2.39E+11	1.56E+11
t8	5	7.10E+10	2.32E+12	9.67E+11	1.93E+11
t9	6	1.20E+11	2.60E+12	1.90E+12	3.22E+11
t10	7	2.00E+11	4.20E+12	3.23E+12	5.45E+11
t11	23	4.18E+11	6.39E+12	3.98E+12	3.17E+12

Anexo 8. Resultados de los parámetros de crecimiento a partir de la función logística en MATLAB

Medio	$X_{\max}$ (UFC/mL)	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	$t_{\exp}$ (h)	Tiempo de duplicación (h)
Basal	4.18E+11	0.7187	7.177	1.391
Aceite de oliva	6.39E+12	0.697	6.179	1.435
Glicerol	4.00E+12	1.317	5.992	0.759
Diesel	3.17E+12	0.6059	9.579	1.650

Anexo 9. Pesado de medios de cultivo



Anexo 10. Placas utilizadas en el recuento de UFC

