

Efecto de la fuente nitrogenada sobre la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas sp*, empleando petróleo diésel 2 como sustrato

Effect of the nitrogenous source on the production of rhamnolipids by Pseudomonas sp, using diesel oil 2 as a substrate

OTINIANO GARCÍA, Nélica Milly¹; BENITES, Santiago M.²; ROBLES CASTILLO, Heber³

RESUMEN

Para evaluar el efecto de la fuente nitrogenada sobre la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas sp*, empleando petróleo diésel 2 como sustrato, se trabajó un diseño experimental, utilizando un cultivo puro de *Pseudomonas sp* aislado de lodos activos de la Planta de tratamiento de agua Covicorti-Trujillo. El sistema de evaluación estuvo constituido por cuatro biorreactores de tanque agitado alimentados de la siguiente manera: 0.98 Lt de Medio Mínimo de Davies, con petróleo diésel 2 al 5% como fuente de carbono, y como fuente de nitrógeno: urea, Nitrato de sodio, sulfato de amonio y extracto de levadura (control) respectivamente. En todos los casos la relación C/N fue de 10/100. A cada biorreactor se adicionó 20 mL de inóculo de *Pseudomonas sp* a una concentración aproximada de 9×10^8 cel/mL, y se dejó funcionar a temperatura ambiental $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 96 horas. Se observó que la mayor producción de ramnolípidos se obtiene en presencia de Sulfato de amonio como fuente nitrogenada (0.0593 mg%), seguido del Nitrato de sodio (0.04118 mg %). La menor producción se obtuvo en presencia de Urea (0.0260 mg%). La prueba de análisis de varianza indica que existe diferencia significativa entre la producción de ramnolípidos en las diferentes fuentes nitrogenadas en comparación con el extracto de levadura y entre ellas mismas ($p = 0.000$). Se concluye que la fuente nitrogenada afecta la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas sp*, y que la fuente de nitrógeno ideal para la producción de ramnolípidos es el sulfato de amonio, seguido del nitrato de sodio.

Palabras clave: Ramnolípidos, *Pseudomonas*, petróleo diésel 2.

ABSTRACT

To evaluate the effect of the nitrogen source on the production of rhamnolipids by *Pseudomonas sp* using diesel 2 oil as substrate, an experimental design was carried out using a pure *Pseudomonas sp* culture isolated from active sludge from the Covicorti-Trujillo Water Treatment Plant. The evaluation system consisted of four Stirred tank bioreactors fed as follows: 0.98 Lt Davies Minimum Medium, with diesel 2 at 5% as carbon source, and as a source of nitrogen: urea, sodium nitrate, Ammonium sulfate and yeast extract (control) respectively. In all cases the C / N ratio was 10/100. 20 mL of *Pseudomonas sp* inoculum was added to each bioreactor at a concentration of approximately 9×10^8 cells / mL), and allowed to run at room temperature $20 \pm 2^\circ\text{C}$ during 96 hours. It was observed that the higher production of rhamnolipids was obtained in the presence of ammonium sulphate as a nitrogen source (0.0593 mg %), followed by sodium nitrate (0.04118 mg %). The lowest production was obtained in the presence of urea (0.0260 mg %). The analysis of variance test indicates that there is a significant difference between the production of rhamnolipids in the different nitrogen sources compared to the yeast extract and among themselves ($p = 0.000$). It was concluded that the nitrogen source affects the production of rhamnolipids by *Pseudomonas sp*, and that the ideal nitrogen source for the production of rhamnolipids is ammonium sulfate, followed by sodium nitrate.

Key words: Rhamnolipids, *Pseudomonas*, diesel 2 oil.

¹ Directora de Investigación de la Universidad César Vallejo

² Vicerrector de Investigación de la Universidad César Vallejo

³ Docente de la Universidad Nacional de Trujillo

INTRODUCCIÓN

Los biosurfactantes son sintetizados por los microorganismos cuando crecen en presencia de fuentes de carbono parcialmente soluble o insoluble en agua, de esta manera, están obligados a sintetizar moléculas con propiedades tensioactivas que favorecen la biodegradación de los sustratos. En la presente investigación se empleó petróleo diésel 2 como fuente de carbono ya que por ser un producto de la refinación del crudo, tiene composición más simple, y el contenido de azufre es menor, lo que facilita el seguimiento de la degradación y por ende la producción de biosurfactantes por el microorganismo¹.

Cuando la fuente de carbono es un sustrato insoluble como un hidrocarburo, estos facilitan su difusión a la célula produciendo biosurfactantes hidrofóbicos que cambian la estructura de su membrana celular, o bien, generan biosurfactantes extracelulares que emulsifican el medio². Es importante señalar que para el microorganismo productor de surfactante, el medio de cultivo (fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, elementos traza (Mg, Fe, Mn, etc.) y las condiciones de crecimiento (temperatura, aireación, pH, etc.) determinan la cantidad y estructura del biosurfactante a nivel laboratorio³.

Pseudomonas, es uno de los géneros bacterianos que produce bioemulsificantes y biosurfactantes que disminuyen la tensión superficial entre el petróleo y el medio acuoso facilitando el acceso microbiano a la fuente de carbono insoluble para su degradación también poseen actividades de peroxidasa y oxigenasa, que permiten la oxidación de algunas fracciones del petróleo. Esta oxidación cambia las propiedades de los compuestos haciéndolos susceptibles a ataques secundarios y facilitando su conversión a bióxido de carbono y agua⁴. Estas moléculas tensoactivas glicolípídicas (ramnolipidos) tienen potenciales aplicaciones biotecnológicas, y son producidas por *P. aeruginosa* en forma concertada con los diferentes rasgos asociados con la virulencia. La ruta biosintética de los ramnolipidos demuestra que tiene vínculos con numerosos productos metabólicos bacterianos tales como alginato, lipopolisacárido, polihidroxicanoatos, y 4-hidroxi-2-alkylquinolines (HAQs)⁵.

Como la producción de ramnolipidos está ligada a las vías biosintéticas, es posible que tanto la fuente carbonada como la fuente nitrogenada tengan algún efecto sobre la producción de estos compuestos. Considerando que dentro de los procesos de biorremediación de ambientes contaminados con petróleo, se considera el proceso de bioaugmentación o bioincremento que consiste en agregar bacterias con capacidad biodegradante a las que se les agregan sustancias nutritivas para propiciar su crecimiento (bioestimulación), adicionando además fertilizantes fosforados y nitrogenados como una

manera de otorgar aceptores de electrones y nutrientes, entre los cuales se encuentra la urea, y los nitratos, y compuestos fosforados, de allí que nace la inquietud de conocer cómo es que los compuestos nitrogenados influyen en la capacidad de producción de biosurfactantes por estas bacterias.

A nivel internacional se han llevado a cabo muchas investigaciones en el campo de la producción de biosurfactantes, como la realizada por Guo-liang y Yue-ting⁶, quienes evaluaron la biodegradación potencial de petróleo crudo desarrollando un proceso fermentativo con una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* que produjo 15,4 g / L de ramnolipidos cuando se cultivó en un medio mineral basal utilizando glicerol como única fuente de carbono. Estos investigadores también reportaron que Los ramnolipidos, son eficaces biotensioactivos, que estimulan la biodegradación de hidrocarburos, pues cuando se usó 1 g / L de glicerol o 0,22 g / L ramnolípido se facilitó la biodegradación de petróleo crudo. En ambas situaciones, más de 58% de petróleo crudo fue degradado y convertido además en biomasa celular y ramnolipidos. Estos resultados sugieren que *Pseudomonas aeruginosa* podría degradar la mayoría de petróleo crudo con adición directa o indirecta de ramnolípido.

Por otro lado, Mawgoud et al⁷, aislaron ramnolipidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* cepa BS20 en kerosene, diésel y aceite de motor; exponiéndolos a 100° C durante 1 hora y con una salinidad hasta el 6% de NaCl, Estos ramnolipidos mostraron su máxima actividad superficial en solución acuosa a pH > 4, y la máxima solubilidad a pH 7-7.5 en acetato de etilo, llegando a disminuir la tensión superficial del agua a 30 mN / m.

Leite et al⁸, evaluaron la producción de biosurfactantes, con énfasis en ramnolipidos, y la degradación del aceite diésel en 18 cepas de bacterias aisladas de suelo vertedero de desechos contaminados por el petróleo. Entre las bacterias estudiadas, se encontró: bacilos gram positivos que forman endosporas (39%), bacilos Gram positivos sin endosporas (17%), y los bacilos gramnegativos (44%). Los métodos utilizados para probar para la producción biosurfactante fueron: difusión de aceite, emulsión, y la actividad hemolítica. Todas las cepas mostraron la capacidad para dispersar el aceite diésel, mientras que el 77% y el 44% de las cepas mostraron hemólisis y emulsificación de aceite diésel, respectivamente. La mayor producción de ramnolipidos fue 565,7 mg / L observado en medio mineral que contiene aceite de oliva (pH 8). Con respecto a la capacidad para degradar el aceite diésel, se observó que 7 cepas fueron positivas en la reducción del colorante 2,6-diclorofenol-indofenol (2,6-DCPIP), mientras que

16 tenían el gen alcano mono-oxigenasa (AlkB), y los productores de ramnolípidos fueron positivos en ambas pruebas.

Como se puede ver, existe mucho interés en la producción de biosurfactantes y se han ensayado varios sustratos como como fuente carbonada, inclusive, en Trujillo, Salvatierra y col⁹, evaluaron la influencia del pH en la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* degradadora de residuos de aceite lubricante, encontraron que la mayor producción de ramnolípidos ocurrió a pH 7 (0,0763mg%), mientras que a pH 8,0 se obtuvo la menor producción (0,0301mg%).

La determinación de la fuente de nitrógeno es esencial para el proceso de producción de ramnolípidos pues estos se producen por acción metabólica en presencia de compuestos como el petróleo y otras sustancias aceitosas, como se sabe, el nitrógeno está íntimamente ligado al metabolismo de los microorganismos, como lo demostraron algunas investigaciones realizadas en hongos, en lo que por cada 100 unidades de carbono degradadas fueron necesarias 3 a 4 unidades de nitrógeno. De las diversas formas de nitrógeno encontradas en la naturaleza, los microorganismos asimilan más fácilmente el amonio, sin embargo, los microorganismos que poseen enzimas nitrato y nitrito reductasas

presentan la capacidad de asimilar respectivamente nitrato o nitrito y amonio respectivamente¹⁰.

La finalidad del presente estudio es evaluar el efecto de la fuente nitrogenada sobre la Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas* sp utilizando petróleo diésel 2 como sustrato, con miras a obtener una fuente de nitrógeno ideal para que estas bacterias desarrollen su máximo potencial de producción y a la vez permitan establecer procesos de biorremediación menos costosos, que favorezcan considerablemente la economía, de modo que se hace indispensable procurar otras fuentes de N que disminuyan los costos de producción, siendo las más recomendables las fuentes inorgánicas, que además de ser más baratas son muy utilizadas en procesos industriales.

Se planteó como objetivo general: Evaluar el efecto de la fuente nitrogenada sobre la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas* sp empleando petróleo diésel 2 como sustrato; y como objetivos específicos; Evaluar la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas* sp con cada una de las fuentes nitrogenadas, Identificar la fuente nitrogenada ideal para la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas* sp, empleando petróleo diésel 2 como sustrato.

MATERIAL Y MÉTODO

Se trabajó un diseño experimental con post prueba únicamente y grupo control.

Material biológico:

Se emplearon cultivos puros de *Pseudomonas* sp, aislados de lodos activos de la Planta de tratamiento de aguas Covicorti – Trujillo. El cultivo fue inoculado en placas con Agar Soya Tripticasa e incubado a temperatura ambiental $20 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo se cosecharon las células con Solución salina Fisiológica estéril, preparando diluciones similares al tubo N° 3 del Nefelómetro de Mac Farland (9×10^8 cel/mL).

Sistemas de evaluación:

Estuvieron constituidos por cuatro biorreactores, los cuales una vez ensamblados y debidamente esterilizados se alimentaron de la siguiente manera: 0.98 Lt de Medio Mínimo de Davies, con

petróleo diésel 2 al 5% como fuente de carbono, y como fuente de nitrógeno: urea, Nitrato de sodio, sulfato de amonio y extracto de levadura (control) respectivamente. En todos los casos la relación C/N fue de 10/100^{11,12}, luego a cada biorreactor se adicionó 20 mL de inóculo de *Pseudomonas* sp. Los cuatro biorreactores operaron a temperatura ambiental $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 96 horas. Cada experimento se realizó por triplicado.

Evaluación de la producción de ramnolípidos:

Los ramnolípidos están compuesto básicamente por moléculas de ramnosa, por lo que en cada muestra se determinó la presencia de ramnosa mediante el ensayo de Orcinol¹³. La concentración de ramnolípidos se determinó considerando que 1mg de ramnosa corresponde a 2.25 mg de ramnolípidos¹⁴.

RESULTADOS

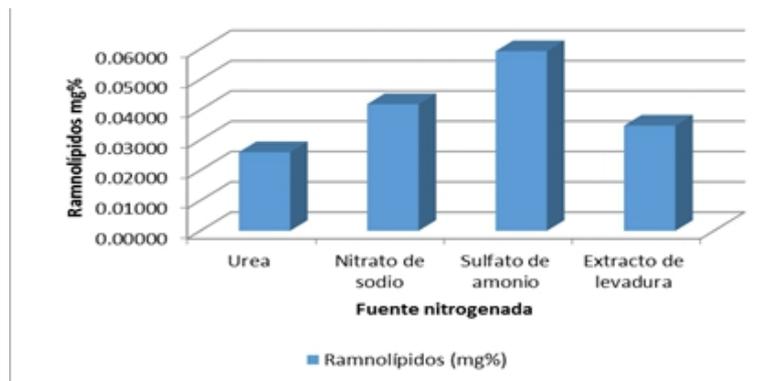


Figura 1: Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas* sp, en diferentes fuentes nitrogenadas, utilizando petróleo diésel 2 como sustrato.

Tabla 1. Análisis de varianza para evaluar el efecto de la fuente nitrogenada sobre la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas* sp., utilizando petróleo diésel 2 como sustrato.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Inter-grupos	18013719,583	3	6004573,194	1079,005	,000
Intra-grupos	44519,333	8	5564,917		
TOTAL	18058238,917	11			

Tabla 2. Pruebas posthoc para determinar la mejor fuente nitrogenada para la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas* sp, utilizando petróleo diésel 2 como sustrato.

Estadístico de prueba	FUENTE NITROGENADA	N	RAMNOLÍPIDOS			
			Subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	4
HSD de Tukey ^a	Urea	3	2596,3333			
	Extracto de levadura	3		3474,0000		
	Nitrato de sodio	3			4183,3333	
	Sulfato de amonio	3				5932,0000
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000
Scheffé ^a	Urea	3	2596,3333			
	Extracto de levadura	3		3474,0000		
	Nitrato de sodio	3			4183,3333	
	Sulfato de amonio	3				5932,0000
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

DISCUSIÓN

La determinación de la fuente de nitrógeno es esencial para el proceso de producción de biosurfactantes, pues el nitrógeno está íntimamente ligado al metabolismo de los microorganismos, ya que proporciona el elemento necesario para la producción de aminoácidos y enzimas, por lo que muchas veces se incorporan a los procesos de biodegradación de hidrocarburos bajo la forma de fertilizantes de uso agrícola como urea o sulfato de amonio¹⁵.

En la presente investigación, se emplearon dos fuentes nitrogenadas inorgánicas (sulfato de amonio y nitrato de sodio) y dos fuentes orgánicas como el extracto de levadura (control) y la urea; se empleó el extracto de levadura, como control, puesto que es el ingrediente que se emplea en los medios de cultivo convencionales, ya que estimula el crecimiento por ser una buena fuente de aminoácidos, vitaminas, y otros nutrientes, las fuentes inorgánicas se emplearon porque son usadas como nutrientes cuando se llevan a cabo procesos de biodegradación de compuestos de petróleo.

Como se puede observar en la figura 1, el mayor porcentaje de ramnolípidos se obtiene cuando se emplea sulfato de amonio como fuente nitrogenada (0.0593 mg%), seguido de la producción en Nitrato de sodio (0.0418 mg%), observándose la menor producción en presencia de urea (0.0260 mg%). La mayor producción en presencia de sulfato de amonio se explica porque el sulfato de amonio es muy fácil de asimilar por los microorganismos, favoreciendo su metabolismo y crecimiento, sin embargo, ante la ausencia de una fuente carbonada disponible se ven obligados a segregar ramnolípidos para emulsificar el petróleo y formar micelas más fáciles de asimilar¹⁶. Por otro lado la producción de ramnolípidos en presencia de Nitrato de sodio se debe a que *Pseudomonas*, también posee enzimas nitrato y nitrito reductasas que le otorgan la capacidad de asimilar respectivamente nitrato o nitrito, reduciéndolos a nitrito y amonio respectivamente¹⁷.

Teniendo en cuenta que la producción de biosurfactantes está íntimamente ligada a la degradación de petróleo y derivados, los resultados obtenidos en el presente trabajo, no están muy alejados de los obtenidos en otras investigaciones,

así Barraza¹⁸, sostiene que la biodegradación de petróleo crudo y gasolina en sistemas terrestres y marinos se acelera por adición de nitrógeno y fósforo en forma de urea, fosfato y sales de amonio. Los resultados obtenidos, coinciden con los reportados por Robert et al¹⁹, quienes observaron una importante disminución de los valores de tensión superficial con un crecimiento elevado en los medios con NaNO₃ como fuente de nitrógeno. También observaron que en ausencia de extracto de levadura, la acumulación de tensioactivos incrementa hasta tres veces el valor inicial mostrando un efecto inhibitor en relación a la producción de tensioactivos, lo que coincide con lo hallado en la presente investigación ya que al emplear extracto de levadura se obtuvo menor cantidad de ramnolípidos que cuando se empleó sulfato de amonio y Nitrato de sodio (0.0347 mg%), lo que podría explicarse porque el extracto de levadura también tiene carbono en su composición química, por lo que los microorganismos al tener una fuente de carbono más fácil de asimilar, no tienen mucha necesidad de producir ramnolípidos para asimilar el petróleo diésel 2.

En la tabla 1, se muestran los resultados del análisis de varianza para evaluar la producción de ramnolípidos en diferentes fuentes nitrogenadas, se encontró que existe diferencia significativa en los promedios de producción de ramnolípidos en las tres fuentes nitrogenadas comparando con el extracto de levadura, y entre ellas mismas ($p = 0.000$), en el análisis posthoc se corroboran estas diferencias, encontrándose que el sulfato de amonio y el Nitrato de sodio son las fuentes nitrogenadas en donde se obtiene la mayor producción de ramnolípidos (Tabla 2).

Como se sabe, la disponibilidad de N y P limita la degradación microbiana de hidrocarburos. De esta manera, el ajuste de estas proporciones mediante la adición de nutrientes en forma de fertilizantes oleofílicos incluyendo urea parafinada, octoato férrico, MgNH₄ PO en soporte de parafina y óxido 2etilhexildipolietileno fosfato estimularán la biodegradación²⁰.

CONCLUSIONES

- La fuente nitrogenada afecta la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas* sp, obteniéndose la mayor producción al emplear sulfato de amonio (0.0593 mg%) y Nitrato de sodio (0.0418,mg%).
- Existe diferencia significativa en la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas* sp, cuando se emplea como

- fuentes nitrogenadas extracto de levadura (control) y otras fuentes como sulfato de amonio, nitrato de sodio y urea ($p = 0.00$)
- El Sulfato de amonio es la fuente de nitrógeno ideal para la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas* sp.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Calvin H, Loehr R, Nyer E, Pitrowski M, Thomas M, Spain J, et al. Innovate Site Remediation Technology. Biorremediation. Ed. William Anderson. American Academy of Environmental Engineers. 1995.
2. Fristche W, Hofrichter M. Aerobic degradation of recalcitrant organic compounds by microorganisms. In: Hans-Joachim and Minter J. Environmental Biotechnology.
3. Boudoir y Maier, 2003). Cortes-Camargo S, Barragán Huerta B. Producción de biosurfactantes por microorganismos halófilos. REV. Sistemas ambientales, VOL 6, N° 1, 2013 P 18
4. Chiguala V. Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando petróleo crudo y petróleo diésel 2 como fuente carbonada en el rango de pH 6.5 a 7.5. Tesis para obtener el título de Biólogo Microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo; 2009.
5. Soberon-Chávez G, Lpepine F, DézielE. Production of rhamnolipids by *pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol Biotechnol. 2005 Oct; 68(6):718-25.
6. Guo-liang Z, Yue-ting W, Xin-Ping Q and Meng Q. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of ramnolípidos. Institute of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou. Journal of Zhejiang University Science. 2005.6B (8):725-730. Japan.
7. Mawgoud A, M, Aboulwafa_ and Hassouna N. Characterization of Rhamnolipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Isolate Bs20. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy. Appl Biochem Biotechnol. 2008.19(5): 617-629. U.S.A.
8. Leite G, Figueroa J, Almeida T, Valoes J, Marques W, Duarte M, Gorlach-Lira K. Production of rhamnolipids and diesel oil degradation by bacteria isolated from soil contaminated by petroleum. Biotechnol Prog.2016 Mar; 32(2):262-70. doi: 10.1002/btpr.2208. Epub 2015 Dec 8.
9. Salvatierra, R; G, Prado y V, Chiguala. 2007. Influencia del pH en la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* degradadora de residuos de aceite lubricante. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
10. Putzke J, Putzke M. Reino dos fungos. Vol 2. Edit EDUNISC. 2002.
11. Caldas L, Solórzano J. Degradación de hidrocarbonetos por *Aspergillus niger* e *Penicillium coryophilum*. Inic. Científica. Química. UFRJ. 2004.
12. Environmental protection Agency (EPA). Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.4225. Seedling Emergence, Tier II.EPA 712-C-96-363. 1996.
13. Sylđatk C; S. Lang; Matulovic, U and F. Wagner. 2005. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas species DSM*.
14. Beal, R and W. Bettz. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiology; 27(3): 819-839. U.S.A. 2000.
15. Ercoli E, Galvez J, Di Paola M, Cantero J, Videla S, Medaura M, et al. Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo. Laboratorio de bioprocesos. Facultad de Ingeniería. Universidad de Cuyo, Mendoza. Argentina. 2001
16. Chávez G,Lpepine F, DézielE. Production of rhamnolipids by *pseudomonas aeruginosa*. (Appl Microbiol Biotechnol. 2005 Oct; 68(6):718-25.
17. Soberón G. *Pseudomonas aeruginosa*. Instituto de Biotecnología. Universidad Autónoma de México. En: Martínez E & Romero JC (eds), Microbios en línea. 2002.
18. Barraza R. Degradación de biodiesel y diversidad bacteriana en suelos arenosos de una zona industrial (Guayanilla, Puerto Rico). Tesis de Maestro en Ciencias. Universidad de Puerto Rico. Reciento universitario de Mayagüez. 2005.
19. Robert M, Mercadé A, Espuny M, Manresa M, GuineaJ. Optimización de la producción de biotensioactivos por *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Investigación 1991. 42 (1): 1-7.
20. Margesin R, Schinner F. Bioremediation (Natural attenuation and Biostimulation) of diesel oil contaminated soil in an alpine glacier skiing area. Institute of Microbiology. University of Innsbruck, Austria. 2000.