

# PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS BIOSURFACTANTES SINTETIZADOS POR *BACILLUS SUBTILIS*

Gabriela C. Sarti, Silvia S. Miyazaki

Area de Agroalimentos. Departamento de Biología, Aplicada y Alimentos. Av. San Martín 4453, 1417. Buenos Aires. Argentina. karibu@agro.uba.ar

## Introducción:

Los biosurfactantes son moléculas anfipáticas producidas por una gran variedad de microorganismos como bacterias, hongos filamentosos y levaduras (Kosaric 2001) las cuales modifican las condiciones imperantes en la interfase.

Las ventajas que poseen los biosurfactantes, cuando se los comparan con los surfactantes sintéticos se deben a que son ecológicamente más amigables con el ambiente debido a su baja toxicidad, su naturaleza biodegradable y la producción de los mismos puede realizarse utilizando fuentes de carbono renovables.

El rol de los biosurfactantes está extensamente aceptado en el consumo de sustratos insolubles en agua como los hidrocarburos, dispersando derrames petroleros.

Otro rol es su propiedad antibiótica (Ron y Rosenberg 2001), ya que su estructura química los capacita para actuar como fuertes desestabilizantes de membranas biológicas, inhibiendo el desarrollo de bacterias y hongos fitopatógenos del suelo. Las aplicaciones potenciales de los biosurfactantes incluyen la emulsificación, humectación, formación de espumas, separación de fases, las cuales pueden ser utilizadas en la industria alimentaria, petroquímica, cosmética y farmacéutica.

El objetivo de este trabajo fue estudiar en *Bacillus* las propiedades fisicoquímicas de los metabolitos con actividad biosurfactante.

## Materiales y métodos:

*Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Bacillus subtilis var natto* fueron crecidas en un medio mínimo salino, cuya fuente carbonada fue glicerol 1%, sin agitación a 30°C, durante 120h. La fuente nitrogenada consistió en diferentes aminoácidos: ácido L-glutámico, ácido aspártico, lisina y triptófano 55mM.

La capacidad biosurfactante de los sobrenadantes se determinó por el método del colapsamiento de la gota (Tugrul y Cansunar 2005).

Índice de emulsificación de 24h: Se mezclaron los sobrenadantes y los diferentes hidrocarburos (Cooper y Goldenberg 1987). Mezcla de reacción: diferentes tiempos de exposición a 100°C, pH, concentración de sales (sulfato de magnesio y cloruro de sodio). Actividad hemolítica en placas con agar sangre bovina.

Tratamiento estadístico: Se evaluó en términos de porcentajes aritméticos y desviaciones estándar, 3 repeticiones, Microcal Origin Software. Version 6.

## Resultados:

Evaluación cualitativa de la producción de biosurfactantes: El “test de colapso de la gota”, determinó la presencia de biosurfactantes en las dos cepas en estudio.

## Índice de emulsificación

Tabla1. Índice de emulsificación de 24h con diferentes hidrocarburos y aceites de origen vegetal.

Hidrocarburos	I.E <sub>24</sub> (%) <i>B. subtilis</i> ATCC 6633	I.E <sub>24</sub> (%) <i>B. subtilis</i> var <i>natto</i>
Queroseno	48,9 ± 1,5	8,0 ± 0,2
Biodiesel	49,1 ± 2,3	19,6 ± 2,1
Hexano	44,7 ± 1,5	0
Octano	51,3 ± 0,8	0
Tolueno	48,6 ± 0,9	0
Aceite oliva	0	0
Aceite maíz	0	0
Aceite girasol	0	0

Tabla 2 y 3. Variación del índice de emulsificación del sobrenadante de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 durante diferentes tiempos de exposición a 100°C y valores de pH

Tabla 2

Tiempo (minutos)	I.E <sub>24</sub> (%)
0	39,7 ± 8,4
20	43,6 ± 6,3
40	59,1 ± 0,7
60	59,2 ± 0,9
80	0
100	0
120	0

Tabla 3

pH	I.E <sub>24</sub> (%)
1	9,5 ± 1,2
2	35,6 ± 2,3
3	40,6 ± 0,6
4	47,1 ± 1,7
5	40,2 ± 0,4
6	33,0 ± 0,2
7	22,0 ± 0,9
8	13,3 ± 4,1
9	17,1 ± 2,6
10	16,4 ± 1,2
11	12,6 ± 0,4

Tabla 4. Variación del índice de emulsificación del sobrenadante de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 con diferentes concentraciones de sales

mM sal	I.E <sub>24</sub> (%) MgSO <sub>4</sub>	I.E <sub>24</sub> (%) NaCl
0	44,9 ± 1,6	44,9 ± 1,6
10	48,3 ± 2,1	36,3 ± 2,1
20	7,3 ± 0,7	47,2 ± 2,7
30	7,7 ± 0,2	43,8 ± 0,7
40	10,8 ± 0,8	48 ± 0,6

Tabla 5. Estabilidad temporal del biosurfactante de *Bacillus subtilis* ATCC6633

Tiempo (días)	E.I <sub>24</sub> (%)
4	44,9 ± 3,1
6	44,9 ± 0,8
8	33,2 ± 0,9
10	28,0 ± 2,3
12	18,7 ± 3,7
14	10,2 ± 0,5
16	5,2 ± 0,3
18	0

Poder desestabilizante de membranas biológicas: Ambos *Bacillus* mostraron halos de hemólisis sobre placas de agar sangre (48h a 30°C).

#### Conclusiones y discusión:

Ambos *Bacillus* analizados son productores de metabolitos biosurfactantes, sin embargo los ensayos de I.E<sub>24</sub> sobre diferentes hidrocarburos mostraron una mayor actividad en el caso de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, por tal motivo se seleccionó esta cepa para estudios posteriores.

Los metabolitos son capaces de formar emulsiones estables (agua en aceite) con los hidrocarburos sintéticos testeados y biodiesel, no así con los aceites de origen vegetal. Los estudios de estabilidad mostraron que los metabolitos biosurfactantes producidos por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 son termoestables hasta 60 minutos a 100°C, a pH ácidos (debajo de 6). Nuestros resultados se contraponen con los hallados por Nitschke y Pastore (2006), quienes encuentran metabolitos con propiedades biosurfactantes en *Bacillus subtilis* termoestables a 100°C por más de 120 minutos y a valores de pH alcalinos. Estos resultados sugieren que existen una amplia gama de compuestos con actividad biosurfactantes en este género bacteriano.

La adición de cationes divalentes como el magnesio no tiene el mismo efecto que el reportado por Sifour *et al.* (2005), debido a que este catión no estabilizaría la molécula de biosurfactantes para su actividad.

En nuestro trabajo la bacteria acumuló los biosurfactantes en ausencia de hidrocarburos y la única fuente utilizada como fuente carbonada fue glicerol, esto sugiere que los metabolitos sintetizados estarían involucrados en otras funciones, como ser la desestabilización de membranas biológicas.

#### Referencias:

- Cooper D. y Goldenberg B. (1987). Surface active agents from two *Bacillus* species. Applied and Environmental Microbiology. 53, 224-229.
- Kosaric N. (2001). Biosurfactants and their application for soil bioremediation. Food. Technology and Biotechnology.39, 295-304.
- Nitschke M. y Pastore A. (2006). Production of a surfactant from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. Bioresource Biotechnology. 97, 336-341.
- Ron E.Z. y Rosenberg E. (2001). Minireview: natural roles of biosurfactants. Environmental. Microbiology. 3, 229-236.
- Sifour M., Haddar H. y Aziz G.(2005). Production of Biosurfactants from two *Bacillus* species. Egyptian Journal of Aquatic Research.31,142-148.
- Tugrul T. y Cansunar E. (2005). Detecting surfactante-producing microorganisms by the drop-collapse test. World Journal of Microbiology and Biotechnology.21, 851-853.