



## Screening surfactant producer native bacteria from Chiapas state using used oil cooking

### Selección de bacterias nativas del estado de Chiapas, productoras de biosurfactantes a partir de aceite usado de cocina

Gilberto Somoza-Coutiño<sup>1</sup>, Arnoldo Wong-Villarreal<sup>2</sup>, Cristina Blanco-González<sup>3</sup>, Gustavo Yañez-Ocampo<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Maestría en energías renovables <sup>2</sup>División Agroalimentaria, Universidad Tecnológica de la Selva, Ocosingo, Chiapas, México; <sup>3</sup>Ingeniería en Tecnología Ambiental, Universidad Politécnica de Chiapas; <sup>4</sup>Laboratorio de Edafología y Ambiente Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto Literario 100. C.P. 50000. Tel. (01-722) 2262300 Toluca México.

\* yanezg0206@gmail.com

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2016.1.2.57>

#### ABSTRACT

The used oil cooking was used as a carbon source for the generation of microbial biosurfactants, this products are tensioactives that can be applied for treatment of polluted environments with persistent organic compounds. The screening of nine strains of native bacteria strains from Chiapas state was made in agar selective medium of mineral salts medium and methylene blue by detecting of bacterial strains forming halo growth of methyl white. The bacterial strains selected were cultured in liquid medium with used oil cooking 2 % v/v as only carbon source in 125 mL Erlenmeyer flasks, cultivation was carried out at environment temperature with 120 rpm agitation for 144 h. Tensioactive properties were quantified during the experiment. The bacterial strains C and D, reduced surface tension to a minimum value of 27.0 mN/m and 27.4 mN/m respectively, while bacterial strains A, B and 83 had emulsion index values higher to 20%. It is concluded that native bacterial strains produce biosurfactants using as substrate used cooking oil and have the ability to produce it.

Key words: biosurfactant, native bacteria, used oil cooking.

#### RESUMEN

El aceite usado de cocina fue utilizado como fuente de carbono para la generación de biosurfactantes microbianos, estos productos son tensoactivos que pueden ser aplicados para el tratamiento de ambientes contaminados con compuestos orgánicos persistentes. Se realizó la selección de nueve cepas de bacterias nativas del Estado de Chiapas en agar con medio selectivo de sales minerales y azul de metileno, mediante la detección de cepas

bacterianas formadoras de halos de crecimiento de blanco de metilo. Las cepas bacterianas seleccionadas fueron crecidas en medio líquido con 2 % v/v de aceite usado de cocina como única fuente de carbono en matraces erlenmeyer de 125 mL, con una agitación de 120 rpm durante 144 horas a temperatura ambiente. Se determinaron las propiedades tensoactivas durante el experimento. La tensión superficial de las cepas C y D fue de 27.9 y 27.4 mN/m respectivamente y las cepas A, B y 83 presentaron valores de índice de emulsión mayores a 20 %. Se concluyó que las cepas bacterianas nativas producen biosurfactantes utilizando como sustrato el aceite usado de cocina y tienen la capacidad de producirlo.

Palabras clave: aceite usado, bacterias nativas, biosurfactante

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso de aceites de origen vegetal para freír alimentos es una de las formas más comunes para cocinar, el alimento se sumerge en aceite caliente o grasa a temperaturas elevadas (150-190 °C) (Alfadhil *et al.*, 2015; Bansal *et al.*, 2010). Al aumentar la temperatura para cocinar en el aceite, las reacciones químicas entre el aceite, componentes del alimento y aire, tales como hidrólisis, polimerización y oxidación térmica, producen un número considerable de compuestos nocivos como polímeros, cetonas y dioxinas, que cambian significativamente la calidad del aceite (Choe & Min, 2007). El aceite usado de cocina (AUC) es considerado un residuo, ya que causa la contaminación de aguas residuales urbanas, al verterse directamente a las alcantarillas sin un tratamiento previo, perjudica a los cuerpos de agua donde son descargados debido a que su tensión superficial impide la transferencia de oxígeno y luz, lo que interfiere en la flora y fauna y degrada el entorno; afecta al proceso de tratamiento biológico de aguas residuales y puede obstruir las alcantarillas en invierno, por las bajas temperaturas (Guihong *et al.*, 2015).

Aproximadamente se generan 4.1 Kg de AUC por persona cada año a nivel mundial (Patil, 2012), considerando que la población mundial es de alrededor de 7 billones, significa que se generan 29 millones de toneladas de aceite usado de cocina por año (Ganesh *et al.*, 2015). Según datos de la SEMARNAT 2012 en México el 21.4% de los residuos peligrosos generados reportados al Patrón de Generadores de RP por tipo, 2004-2011, corresponde a aceites gastados. Por lo anterior, el AUC es considerado un problema ambiental, es necesario buscar opciones de tratamiento y así minimizar el impacto que tiene sobre el ambiente.

Una alternativa es su reutilización como materia prima o fuente de carbono para la producción biotecnológica de biosurfactantes que son moléculas anfifílicas que contienen grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, reducen la tensión superficial entre dos fases con diferentes polaridades, forman emulsificaciones y tienen una gran variedad de aplicaciones en la agricultura, biorremediación, petroquímica, farmacia, cosméticos, detergentes e industria de los alimentos (Gudiña *et al.*, 2014), ya que tienen estabilidad a condiciones extremas de pH, temperatura, salinidad y son biodegradables (Amaral *et al.*, 2010). Existen diversos tipos de bacterias, hongos y levaduras que producen biosurfactantes (Konishi *et al.*, 2015).

La producción a gran escala aún está limitada debido a los precios altos de producción, el medio de cultivo usado llega a alcanzar hasta un 50% de los costos (Gudiña *et al.*, 2014). Por lo que se busca optimizar estos costos de producción, optando el uso de residuos como fuente de carbono (Coutinho *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2007).

Adicionalmente, es importante reconocer y explorar la biodiversidad de la microflora nativa del Estado de Chiapas en virtud de su riqueza genética, así como de productos naturales derivados de la actividad microbiana, por esta razón se optó por utilizar un cepario de microorganismos nativos productores de biosurfactantes (Vázquez-Vázquez, 2014). El presente trabajo tiene por objetivo seleccionar bacterias nativas del estado de Chiapas, productoras de biosurfactantes a partir del aceite usado de cocina.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Materiales**

Se utilizó aceite usado de cocina como única fuente de carbono para el cultivo de las bacterias, el cual fue proporcionado por la cafetería de la Universidad Politécnica de Chiapas.

Se experimentó con nueve cepas bacterianas nativas del Estado de Chiapas, cuatro de ellas (A,B,C,D) fueron proporcionadas por el cepario del laboratorio de Ingeniería en Tecnología Ambiental aisladas de un proceso de digestión anaerobia y las otras cinco (101,89,98,97,83) fueron proporcionadas del cepario del Dr. Arnoldo Wong Villarreal de la División Agroalimentaria de la Universidad Tecnológica de la Selva, Ocosingo, Chiapas.

Los medios de cultivo utilizados son de la marca DIBICO; los reactivos utilizados fueron  $K_2HPO_4$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $MgSO_4$  de la marca GOLDEN BELL,  $Na_2HPO_4$  y  $NaNO_3$  de la marca FERMONT; y Azul de metileno de LABESSA.

### **2.2. Reactivación de cepas**

Se preparó medio PY sólido el cual consta de: peptona de caseína 5g/L, extracto de levadura 3g/L,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.1g/L y agar bacteriológico 18g/L. El medio se hirvió durante 5 minutos y posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C a una presión de 1.5 Kg/cm<sup>2</sup>, se vació en cajas petri y se incubó durante 24 horas. Las cepas fueron sembradas por estriado en el medio PY sólido y se incubaron durante 24 horas.

### **2.3. Selección de cepas productoras de biosurfactante**

Se preparó medio sólido de sales minerales y azul de metileno (MSM+AM+AUC) de composición:  $K_2HPO_4$  0.7g/L,  $Na_2HPO_4$  0.9g/L,  $NaNO_3$  2g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.4g/L,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.2g/L, azul de metileno 0.005 g/L, agar bacteriológico 15g/L y se agregó aceite usado de cocina a tres concentraciones 2%, 6% y 10% (v/v). El medio más el residuo se hirvió durante 5 minutos y se esterilizó en autoclave a 121°C a una presión de 1.5 Kg/cm<sup>2</sup>, se vació en cajas petri hasta solidificar y se incubó durante 24 horas. La siembra fue realizada por picadura y las cajas fueron incubadas durante 24 horas y se evaluó la presencia de halos de crecimiento.

### **2.4. Producción de Inoculo**

Para la producción del inóculo de las cepas que mostraron halo de crecimiento, estas fueron sembradas en medio PY líquido en tubos de ensaye con 10 mL de medio, la siembra se realizó por duplicado más un control negativo y se mantuvieron en agitación a 120 rpm, a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente el medio fue centrifugado a 15,000 x g a 4°C por 15 minutos para separar la biomasa, el precipitado se lavó 2 veces con una solución salina de NaCl al 2% y se dejó a una densidad óptica 0.1 de ABS a una longitud de onda de 600 nm. usando un Espectrofotómetro VE-5000V a 600nm  $\lambda$ .

### **2.5. Cinéticas de crecimiento bacteriano**

La cinética se realizó en matraces erlenmeyer de 125 mL con 80 mL de medio de sales minerales descrito previamente (ver apartado 2.3) sin agar bacteriológico y sin azul de metileno. Se añadió aceite usado de cocina a una concentración inicial de 2% (v/v), los matraces fueron inoculados con 0.8 mL de inóculo; los ensayos se realizaron por duplicado y se mantuvieron a 120 rpm, a temperatura ambiente durante 96 horas. El blanco consistió en medio de cultivo sin biomasa.

Durante la cinética se colectaron 8 mL de muestra a 0, 48, 96, 144 horas y se cuantificaron tensión superficial, índice de emulsificación y crecimiento celular. Las muestras fueron centrifugadas a 15,000 x g a 4°C por 15 minutos, el sobrenadante obtenido fue utilizado para determinar tensión superficial e índice de emulsión, el precipitado fue utilizado para determinar el crecimiento celular por peso seco.

### **2.6. Tensión superficial**

Las mediciones de tensión superficial se realizaron con un tensiómetro Easy Dine KRÜSS K20, mediante el método de Wilhelmy Plate, el cual consiste en la medición de la tensión superficial entre un líquido y un sólido, midiendo la fuerza que actúa sobre una placa vertical sumergida.

## 2.7. Índice de Emulsión (IE<sub>24</sub>)

Para la cuantificación del índice de emulsión se colectaron 2 mL del sobrenadante libre de células y se añadieron 2 mL de diésel. La mezcla se agitó en un vórtex durante un minuto y se dejó en reposo 24 horas. Para calcular IE<sub>24</sub>, se midió la altura de la emulsión formada y la altura total de la mezcla y se utilizó la siguiente fórmula:

$$IE_{24} = \left( \frac{HE}{HT} \right) * 100$$

Dónde: IE<sub>24</sub>: Índice de Emulsión, HE: Altura de la emulsión y HT: Altura total de la emulsión

## 2.8. Determinación de crecimiento celular

El crecimiento celular fue cuantificado por peso seco, mediante la metodología establecida por la Norma Técnica Mexicana NMX-AA-034-SCFI-2001 para la determinación de sólidos totales en agua residual. Esta metodología es usada para determinar la cantidad de materia orgánica en una muestra, mediante su evaporación a 105°C.

Para esta determinación se utilizó el precipitado resultante de la centrifugación previamente descrita (ver 3.5 Cinética de crecimiento bacteriano), se agitó en un vórtex y el contenido se vació en capsulas de porcelana a peso constante y se mantuvieron en la estufa a 105°C durante 24 horas. Y se utilizó la siguiente fórmula:

$$PS = ((G_1 - G) * 1000) / V$$

Donde: PS: peso seco expresado en g/L, G<sub>1</sub>: peso de la cápsula con la muestra después de la evaporación, G: peso de la cápsula vacía (g) a peso constante y V: Volumen de la muestra en mL.

# 3. RESULTADOS

## 3.1. Selección de cepas bacterianas productoras de biosurfactantes en medio sólido MSM+AM+AUC

Las nueve cepas bacterianas fueron cultivadas en medio sólido MSM+AM+AUC con 24-72 horas de incubación. Se observó la presencia o formación de halo de crecimiento en el medio sólido. Las cepas que presentaron halo a las 24 horas fueron las cepas A, B, C, D, 101, 98, 89 y 83 (tabla 1), ésta evidencia indica de forma indirecta la presencia cualitativa de biosurfactante en el medio. Es destacable que las cepas A, B, C y D, demostraron el crecimiento y formación de halo desde 2% hasta 10% de AUC. Sin embargo, las ocho cepas fueron seleccionadas para su cultivo en medio líquido a una concentración de 2% v/v. Algunas cepas presentaron halo indicador a las 72 horas, pero se descartaron para tratamientos posteriores y otras indicaron tener la capacidad metabólica para utilizar el

residuo como fuente de carbono y crecer en presencia del mismo sin producir biosurfactante.

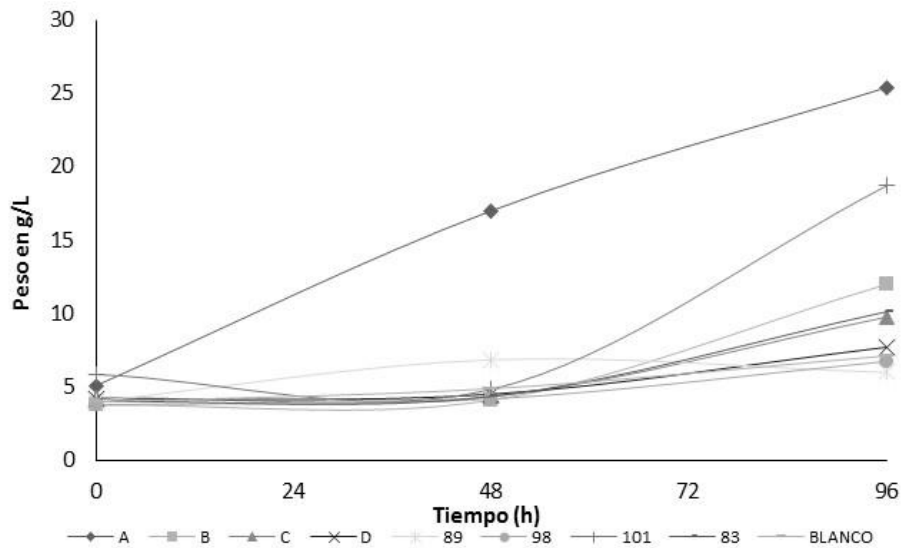
**Tabla 1.** Evidencia de presencia de biosurfactante por formación de halo en medio MSM+AM+AUC.

Cepa	MSM+AM+AUC		
	AUC 2%	AUC 6%	AUC 10%
<b>A</b>	xx	xx	xx
<b>B</b>	xx	x	x
<b>C</b>	xx	xx	xx
<b>D</b>	xx	xx	xx
<b>101</b>	xx	Δ	-
<b>98</b>	x	Δ	-
<b>97</b>	Δ	-	-
<b>89</b>	xx	-	-
<b>83</b>	xx	Δ	-

xx 24 horas de incubación con crecimiento y halo abundante  
x 72 horas de incubación con crecimiento y halo  
Δ Presenta crecimiento sin halo  
- No hay crecimiento

### 3.2. Cinética de crecimiento en medio líquido con AUC al 2% v/v

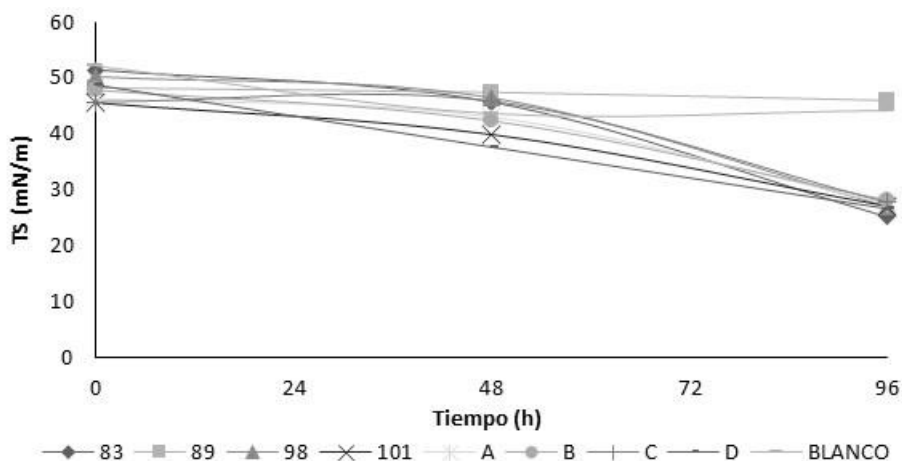
Las ocho cepas seleccionadas anteriormente, fueron cultivadas en medio líquido de sales minerales más aceite usado de cocina al 2% como única fuente de carbono. La figura 1. muestra la cinética de crecimiento de las cepas utilizando aceite usado de cocina como fuente de carbono. La fase exponencial se alcanzó entre las 40-60 horas de cultivo. El crecimiento de las cepas indica que el AUC es utilizado para la formación de biomasa, por lo que el siguiente parámetro a monitorear fue la tensión superficial como indicador de la producción de biosurfactante.



**Fig. 1.** Crecimiento celular expresado en g/L de las cepas seleccionadas cultivadas en medio de sales minerales más AUC al 2% como fuente de carbono.

### 3.3. Comportamiento de la tensión superficial

Durante la cinética de crecimiento, se evaluó la tensión superficial ya que los biosurfactantes son capaces de reducir la tensión superficial. La figura 2 muestra los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento con aceite usado de cocina al 2% como única fuente de carbono. Se observó que las cepas reducen la tensión superficial, a excepción de la cepa 89 que no demostró reducir la tensión comparada con las otras cepas que redujeron la tensión superficial del medio de entre 45-54 mN/m hasta valores de 29-25 mN/m a las 96 horas. Todas las cepas presentaron un comportamiento similar en la reducción de la tensión superficial en el medio adicionado con aceite usado de cocina al 2% como única fuente de carbono.



**Fig. 2.** Comportamiento de la tensión superficial de las cepas bacterianas en el medio de cultivo con AUC 2% como única fuente de carbono.

### 3.4. Índice de Emulsión (IE<sub>24</sub>)

El índice de emulsión fue cuantificado al final de la cinética (96 h). En la tabla 3.2 se reportan los valores obtenidos. Los valores de IE<sub>24</sub> mayores al 20% representan emulsiones estables durante 24 horas, esto significa que las cepas bacterianas A, B y 83 producen biosurfactantes con propiedades tensoactivas y emulsificantes que potencialmente podrían ser aplicados a nivel industrial, ambiental.

**Tabla 2.** Índice de emulsión (IE<sub>24</sub>) de las cepas cultivadas en aceite usado de cocina 2% como fuente de carbono.

Cepa bacteriana	%IE <sub>24</sub>
A	37.45
B	57.65
C	11.5
D	10
89	0
83	20.35
98	2.5
101	16.65
BLANCO	0

## 4. DISCUSIONES

Se observó halo de crecimiento en el medio MSM+AM+AUC, éste halo se debe a la reacción dada entre el biosurfactante que tiene carga negativa y el calcio contenido en el medio el cual tiene carga positiva y produce un precipitado conocido como blanco de metilo el cual indicó la producción de biosurfactante. Las cepas que presentaron producción de biosurfactante a las 24 horas fueron las cepas A, B, C, D, 101, 89 y 83 las cuales fueron seleccionadas para su cultivo en medio líquido a la concentración del 2%. En el trabajo de Ibrahim *et al.* (2013) se empleó con éxito este mismo medio de cultivo para asilar cepas bacterianas del suelo contaminado con petróleo y seleccionaron a aquellas que formaron halos de crecimiento en el medio de cultivo.

La tensión superficial es una prueba que de manera indirecta indica la producción de biosurfactantes. En este trabajo, la mayoría de las cepas produjo biosurfactantes, ya que redujeron la tensión superficial desde 54-45 mN/m hasta valores de 29-25 mN/m a las 96 horas a excepción de la cepa 89 que no demostró reducir la tensión, por lo tanto no produce biosurfactante. En el estudio de Rocha *et al.*, 2013, la tensión superficial del medio de cultivo se redujo hasta 27.7 mN/m utilizando *Pseudomonas cepacia* en aceite de soya y licor de maíz como fuente de carbono.

Otra de las propiedades de los biosurfactantes es la capacidad de formar emulsiones, las cuales se forman entre una fase hidrofóbica y una fase acuosa. Con la prueba del índice de



emulsión se demostró que las cepas A, B y 83 son capaces de formar emulsiones estables a las 24 horas en un medio diésel/agua. (Vázquez-Vázquez, 2014).

Con base en los resultados obtenidos para tensión superficial e índice de emulsión, las cepas bacterianas nativas del Estado de Chiapas pueden ser potencialmente aprovechadas para la producción de biosurfactantes microbianos y su posterior uso en procesos industriales y ambientales.

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACYT por el financiamiento número 177487.

## **CONFLICTO DE INTERESES**

Los autores del presente artículo declaran que no existen conflictos de interés alguno.

## **REFERENCIAS**

Alfadhl Y., Samsuzana A., & Fakhrul Z. 2015. Capacitive sensor probe to assess frying oil degradation. *Information Processing in Agriculture*. 2(2):142-148.

Amaral P., Coelho M., Marrucho I. & Coutinho, J. 2010. Biosurfactants from Yeasts: Characteristics, production and application. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 672:236-249.

Bansal G., Barlow P., Joshi P., Lo H. & Chung Y. 2010. Review of rapid tests available for measuring the quality changes in frying oils and comparison with standard methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 50(6):503–514.

Choe E., & Min D. 2007. Chemistry of deep-fat. *Journal of Food Science*. 72(5):77–86.

Coutinho J., Silva P., Moraes P., Monteiro A., Barcelos J., Siqueira E. & Santos V. 2013. Demulsifying properties of extracellular products and cells of *Pseudomonas aeruginosa* MSJ isolated from petroleum contaminated soil. *Bioresource Technology*. 128(12):646-654.

Ganesh I., Parag R. & Aniruddha B. 2015. Improved synthesis of sophorolipids from waste cooking oil using fed batch approach in the presence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal*. 263(1):479-487.

Gudiña E., Rodríguez A., Alvez E., Domingues M., Teixeira J. & Rodríguez L. 2014. Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. *Bioresource Technology*. 177(1):87-93.

Guihong L., Qiang F., Yongqiang L., Chao C., Guixiang L., Yu L. & Xiaobo Y. 2015. Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4. *Biochemical Engineering Journal*. 101(1):44-54.

Ibrahim M., Ijah U., Manga S., Bilbis L. & Umar S. 2013. Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 81(1):28-34.

Konishi M., Yoshida Y. & Horiuchi J. 2015. Efficient production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* using a corncob hydrolysate medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 119(3): 317-322.

Patil P. 2012. Biodiesel production from waste cooking oil using sulfuric acid and microwave irradiation processes. *Journal of Environmental Protection* (03):107–113.

Rocha e Silva M., Rufino R., Luna J., Santos V. & Sarubbo L. 2013. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 3(2): 32-139.

Vázquez-Vázquez P. 2014. Evaluación de cepas bacterianas potencialmente productoras de biosurfactantes a partir de residuos agroindustriales. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica de Chiapas. Pp. 84.

Zhu Y., Gan J., Zhang G., Yao B., Zhu W. & Meng Q. 2007. Reuse of waste frying oil for production of rhamnolipids using *Pseudomonas aeruginosa* zju.u1M. *Journal of Zhejiang University Science*. 8(9):1514-1520.