

# Aislamiento y caracterización de microorganismos nativos y aprovechamiento del glicerol como única fuente de carbono

## Native microorganism isolation and characterization and use of glycerol as sole carbon source

Natalia Tarazona; Nathaly Ramírez; Paolo Moreno; Yajaira Combariza; Carolina Guzmán\*

Centro de Estudios e investigaciones Ambientales – CEIAM, Universidad Industrial de Santander (UIS), Carrera 27 calle 9, Bucaramanga, Colombia.

\*caguzlun@uis.edu.co

Fecha Recepción: 11 de febrero de 2011  
Fecha Aceptación: 15 de septiembre de 2011

---

### Resumen

El rápido incremento del consumo mundial de biodiésel ha generado un superávit de glicerol, correspondiente al 10% en peso del biocombustible producido. Siendo Colombia uno de los principales productores de biodiésel en Latinoamérica con 516000 ton/año, es necesario buscar usos alternativos para el exceso de glicerol generado. En esta investigación se aislaron microorganismos nativos presentes en el glicerol crudo proveniente de dos plantas Santandereanas (A y B) productoras de biodiésel y se evaluó su crecimiento en medio mineral utilizando glicerol USP (24 g/L) como única fuente de carbono. El crecimiento de los microorganismos se determinó por el método de peso seco y lecturas de absorbancia. La cantidad de glicerol consumido se determinó por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia-Detector de Índice de Refracción (HPLC-IRD). En la muestra A, se identificó un consorcio compuesto por bacterias Gram positivas y Gram negativas, y el hongo *Aspergillus fumigatus*. De la muestra B, se aisló *Bacillus circulans*. Dos de los microorganismos aislados utilizaron el glicerol como fuente de carbono.

**Palabras clave:** *biodiésel, glicerol, microorganismos nativos.*

### Abstract

The rapid increase in biofuels world consumption has generated a glycerol surplus of about to 10 wt% of the overall biodiesel. With Colombia as one of the principals Latin America biodiesel producer, with 516000 ton/year it is necessary to look for glycerol alternative uses. In this work native microorganisms present in raw glycerol (A and B) were isolated, from two Santander biodiesel plants, and their growth was followed in mineral culture using glycerol USP (24 g/L) as the sole carbon source. Microorganism's growth was measured by dry weight and absorbance measurements. Glycerol intake by the microorganisms was determined by High Performance Liquid Chromatography-Refracton Index Detector (HPLC-IRD). A consortium consisting of Gram-positive and Gram-negative bacteria and *Aspergillus fumigatus* fungus was identified in sample A. On the other hand, *Bacillus circulans* was isolated and identified from sample B. Two of the microorganisms isolated used the glycerol as carbon source.

**Keywords:** *biodiesel, glycerol, native microorganism.*

## Introducción

El biodiésel es en la actualidad el único biocombustible capaz de desplazar completamente su homólogo del petróleo, ya que es compatible con los motores diésel, tiene un proceso de producción simple, gran variedad de materias primas y ocurre a temperatura y presión moderada. Su principal subproducto es el glicerol, que corresponde aproximadamente al 10% en peso del biodiésel producido. A pesar de tener gran aplicación en la industria (elaboración de jabones, alimento para ganado, estiércol orgánico y biogás, entre otros), el glicerol generado a partir de biodiésel ha creado un superávit, que ha disminuido el precio a nivel mundial y causado que su costo de refinación sea económicamente inviable [1-3]. Siendo Colombia uno de los principales productores de biodiésel en Latinoamérica (producción a final de 2010: 516000 ton/año) [4], es necesario investigar formas alternativas para utilizar este glicerol mediante transformaciones químicas y microbiológicas [1, 2]. Las bioconversiones son favorables desde el punto de vista de pretratamiento de materia prima y condiciones de operación del proceso. El uso de microorganismos nativos ofrece una diversidad de rutas metabólicas, mayor adaptación durante las condiciones de fermentación y disminuye el uso de antibióticos en comparación con los microorganismos genéticamente modificados. Entre los microorganismos que fermentan el glicerol sobresalen los géneros *Clostridium*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus* y *Enterobacter* con la producción de metabolitos como 1,3 propanodiol, butanol, ácido cítrico, ácido láctico y polihidroxialcanoatos (metabolito generado a nivel intracelular). Estos compuestos son ampliamente utilizados en diferentes sectores industriales como: la producción de plásticos biodegradables, área textil, aditivos alimenticios, producción de biocombustibles, medicina y agricultura, entre otros campos [1, 2, 5]. Por lo anterior, se plantea la búsqueda de cepas nativas en el glicerol, residuo de la industria del biodiésel, que utilicen esta materia prima para la producción de sustancias de mayor valor agregado a nivel industrial.

## Metodología

### Aislamiento de microorganismos nativos

Los microorganismos fueron aislados a partir de glicerol crudo (GA y GB) proveniente de dos empresas Santandereanas productoras de

biodiésel que utilizan aceite de palma como materia prima.

Las muestras se homogenizaron y diluyeron en solución peptonada 0,1 g/L y fueron sembradas por duplicado en medios de cultivo selectivos y no selectivos (agares: Recuento; Nutritivo; Man-Rogosa & Sharpe (MRS); Sulfito-Polimixina-Sulfadiazina (SPS); Papa Dextrosa Agar (PDA) y CZAPECK). Una vez obtenidos cultivos axénicos se realizó la identificación de las cepas por sus características macroscópicas, microscópicas, bioquímicas y mediante la aplicación de claves taxonómicas [6-9]. Como criterio de selección del microorganismo, se tuvo en cuenta su crecimiento a partir de la materia prima procesada y el no crecimiento en cultivos tomados del ambiente exterior.

### Condiciones de fermentación bacteriana

Se preparó un preinóculo de cada cultivo bacteriano en 100 mL de medio Luria Bertani Broth (LB) [10]. Composición (g/L): peptona 10; extracto de carne 3; y NaCl 5. Se llevó a agitación a 225 rpm a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 0,5 medida en espectrofotómetro a 540 nm (*Genesys 20. Thermo Spectronic, NY, USA*). El medio de fermentación utilizado fue el medio mineral Rennie, 1981 modificado por Salinas [11], compuesto por 24 g/L glicerol USP;  $K_2HPO_4$  1,5;  $KH_2PO_4$  1,5;  $(NH_4)NO_3$  2,0 –Reemplazado por  $(NH_4)_2SO_4$ ;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5; NaCl 1,0; 1 ml  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  16 mM + EDTA 18,6 mM. El ensayo de fermentación se realizó por duplicado, con una proporción de 5% v preinóculo/medio de sales, en un agitador orbital (Unimax 1010 – Heidolph, Germany) a 37°C durante 48h. La velocidad de agitación fue de 250 rpm durante las primeras 17h de fermentación y de 200 rpm después de las 17h hasta el final del proceso [10].

### Condiciones de fermentación fúngica

Se preparó una suspensión de esporas a partir del raspado superficial de un agar PDA y mediante diluciones decimales seriadas se ajustó un preinóculo con una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas/mL. La fermentación se llevó a cabo en el medio mineral descrito anteriormente en erlenmeyers de 250 mL de capacidad con una proporción de 7,4% v preinóculo/medio de sales [12]. El ensayo se realizó con una velocidad de agitación de 180 rpm a temperatura ambiente durante 4 días utilizando muestras destructivas.

Como control de calidad de los ensayos, se procesó en paralelo un medio de cultivo sin el microorganismo seleccionado, así como, una coloración de Gram del sobrenadante obtenido en cada tiempo de fermentación.

### Medición de biomasa

A tiempos establecidos de fermentación, se tomaron alícuotas para la cuantificación de la masa celular. La determinación en bacterias se realizó mediante la lectura de densidad óptica (540 nm) y en los hongos por peso seco [13].

### Medición del consumo de glicerol

Luego de centrifugar cada muestra, fue filtrado el sobrenadante (membranas de diámetro de poro: 0,45 µm de polivinil difluoruro, Millipore, Bedford, MA, USA) para ser analizado por cromatografía líquida de alto rendimiento – HPLC (*Agilent Technologies 1100, Sigma Aldrich. USA*), con detector de índice de refracción. Se utilizó una columna de intercambio catiónico Supelcogel C610-H a 40°C, utilizando como fase móvil ácido sulfúrico 6mM con un flujo 0,8 ml/min. El procesamiento de los datos

se realizó a través del sistema de datos *Agilent ChemStation* [14]. Los análisis cromatográficos fueron desarrollados por Ángela Vásquez Cardeño (Joven Investigador Colciencias, 2009).

## Resultados y discusión

Las muestras recolectadas de dos plantas industriales, presentan un pH alcalino (GA: 9,5) y ácido (GB: 6,0) asociado con el tipo de catalizador y los tratamientos desarrollados. Por otra parte, contienen un porcentaje de jabones de 7,5 y 2,9, respectivamente.

### Aislamiento de microorganismos nativos

Una vez realizada la caracterización fenotípica de los microorganismos, fueron identificados los géneros *Bacillus* y *Aspergillus*. Estos corresponden a bacterias Gram positivas esporuladas y hongos filamentosos hialinos, respectivamente. Además se encontró un consorcio microbiano compuesto por bacterias Gram positivas y Gram Negativas. Las características de los microorganismos encontrados se describen en las Tablas 1 y 2.

**Tabla 1.** Identificación y caracterización de microorganismos en la muestra GA.

AGAR	CARACTERÍSTICAS		MICROORGANISMO
	MACROSCÓPICAS	MICROSCÓPICAS	
Recuento	Colonias redondeadas blanquecinas amarillas de diferente tamaño.	Bacterias Gram positivas y Gram negativas de difícil separación.	Consortio Bacteriano
SPS	No se observó crecimiento microbiano	No aplica	No aplica
MRS	No se observó crecimiento microbiano	No aplica	No aplica
PDA	Colonias aterciopeladas de color verde, reverso incoloro a amarillo.	Hifas hialinas y lisas, cabezas conidiales uniseriadas y columnares, vesícula piriforme, fiálides en la mitad o dos tercios de la vesícula. Conidios globosos, ligeramente rugosos	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Czapek	Colonias de color verde azulado, micelio blanco, reverso marrón rojizo, textura aterciopelada, plana o con surcos radiales		

SPS; agar Sulfito-Polimixina-Sulfadiazina; MRS: agar Man-Rogosa & Sharpe; PDA: agar Papa Dextrosa.

*B. circulans* se caracteriza por la producción de enzimas como la α-amilasa y la β-glucanasa, así como, la síntesis de compuestos utilizados en medicina (butirosinas). Adicionalmente, produce metabolitos intracelulares tipo polihidroxicanoatos [15]. En cuanto a *Aspergillus fumigatus* se ha descrito su capacidad de producir metabolitos secundarios como antibióticos, proteasas y se ha demostrado su capacidad de remover metales

pesados de muestras de la industria minera.

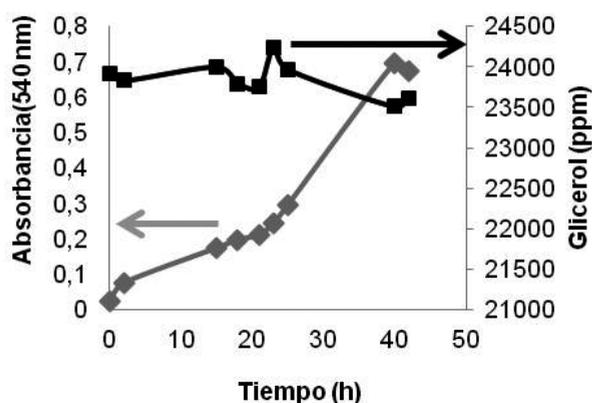
### Resultados de la fermentación

En el análisis de los cromatogramas realizados, aparece un único pico, el cual coincide con el tiempo de retención del patrón de glicerol. En las Figuras 1, 2 y 3 se observa la utilización de glicerol como fuente de carbono por parte de los microorganismos identificados.

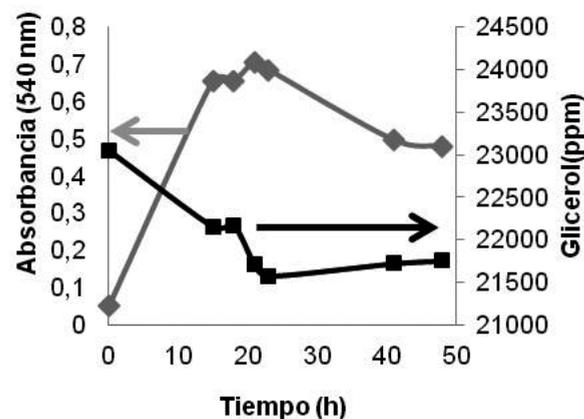
**Tabla 2.** Identificación y caracterización de microorganismos en la muestra GB.

AGAR	CARACTERÍSTICAS			MICROORGANISMO
	MACROSCÓPICAS	MICROSCÓPICAS	BIOQUÍMICAS	
Recuento	Colonias circulares grandes, cremosas, elevadas y de bordes regulares.	Bacilos Gram positivos cortos con endosporas en forma de barra	Catalasa y oxidasa positivo. Aerobio facultativo, no mótil. Hidroliza el almidón. Produce ácido pero no gas a partir de lactosa, glucosa, sacarosa, maltosa, manitol y arabinosa, pero no de xilosa. Reduce NO <sub>3</sub> a NO <sub>2</sub> . Crece en NaCl 6,5%, y a 50°C. No utiliza el citrato como única fuente de carbono. Voges-Proskauer negativo.	<i>B. circulans</i>
SPS	No se observó crecimiento microbiano	No aplica	No aplica	No aplica
MRS				
PDA				
Czapek				

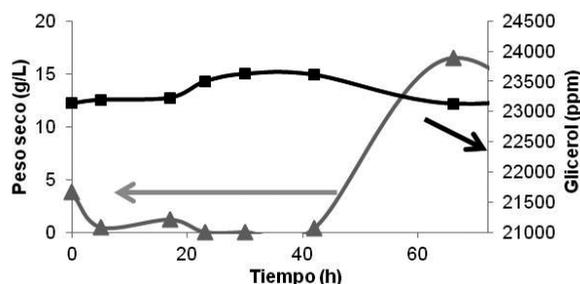
SPS; agar Sulfito-Polimixina-Sulfadiazina; MRS: agar Man-Rogosa & Sharpe; PDA: agar Papa Dextrosa.



**Figura 1.** Crecimiento y consumo de glicerol USP por el consorcio bacteriano.



**Figura 2.** Crecimiento y consumo de glicerol USP por *Bacillus circulans*.



**Figura 3.** Crecimiento y consumo de glicerol USP por *Aspergillus fumigatus*.

En las Figuras 1 y 2 se observa un crecimiento exponencial de estas bacterias a diferentes tiempos de incubación. Sin embargo, el consumo de sustrato de *Bacillus circulans* fue significativamente mayor (1295 ppm), que el presentado por el consorcio bacteriano (294,5 ppm).

En el caso del hongo, se observa un crecimiento significativo a partir de las 40 h de fermentación. A pesar de haberse demostrado en estudios previos su capacidad fermentativa en presencia de glicerol y almidón [16], la utilización del glicerol por parte de *Aspergillus fumigatus* fue menor (5,1 ppm) comparado con *Bacillus circulans*.

Las concentraciones de glicerol superiores a la inicial, pueden estar relacionadas con la variabilidad del método de cuantificación del sustrato, así como, una posible coelución con un metabolito producido por el microorganismo.

El comportamiento metabólico de *Bacillus circulans* relacionado con el consumo de

glicerol en el tiempo, permite su inclusión en estudios posteriores utilizando glicerol crudo. La optimización del proceso de fermentación permitirá obtener metabolitos útiles para la industria con alto valor agregado.

## Conclusiones

A pesar de las impurezas propias de las muestras de glicerol crudo producto de la industria del biodiésel, fue posible aislar un consorcio bacteriano, y las especies *Bacillus circulans* y *Aspergillus fumigatus* como microorganismos nativos. Dos de estos microorganismos tuvieron la capacidad de aprovechar de forma eficiente este subproducto como única fuente de carbono, sobresaliendo el consumo de 1295 ppm por *Bacillus circulans*.

## Agradecimientos

Las autoras agradecen a la Dirección de Investigación y Extensión de la Facultad de Salud (DIEF, UIS); Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE, UIS); Gobernación de Santander; Neomundo por la financiación dada a esta investigación y a los estudiantes de pregrado: Carolina Becerra, Laura Vergel, Yeimmy Rodríguez, Leidy Rojas, Juan Fernando Cancino y Javier Gómez, por su trabajo y entrega al proyecto.

## Referencias

- [1] Johnson D, Taconi K. The Glycerin Glut: Options for the Value-Added Conversion of Crude Glycerol Resulting from Biodiésel Production. *Environ. Prog.* 2007;26:338-48.
- [2] Da Silva GP; Mack M; Contiero J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.* 2009;27:30-9.
- [3] Gonzalez R, Yazdani SS. Anaerobic fermentation of Glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology.* 2007;18:213-9.
- [4] Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia. Plantas productoras de Biodiésel. Fedebiocombustibles, Disponible en: <http://www.fedebiocombustibles.com/v2/nota-web-id-271.htm>. Acceso el 6 de agosto 2011.
- [5] Asad-ur-Rehman, Wijesekara RGS, Nomura N, Sato S, Matsumura M. Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiésel for growth and 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum*. *J. Chem. Technol. Biot.* 2008;83:1072-80.
- [6] Claus D, Berkeley R. *Bergey's manual of systematic bacteriology 1986*. Estados Unidos de América: Williams and Wilkins; 1986:1105–39.
- [7] Slepecky RA, Hemphill HE. The Genus *Bacillus*-Nonmedical. En: *Prokaryotes*. Dworkin. Springer Science Business Media LLC, USA: 2006;530–62.
- [8] Carrillo L. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta. Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia.htm> Acceso el 6 de Agosto 2011.
- [9] Thom C, Raper K. *A Manual of the Aspergilli*. Estados Unidos de America: The Williams and Wilkins Company; 1945: p. 10-30, 148-154.
- [10] Ji XJ, Huang H, Du J, Zhu JG, Ren LJ, Hu N, et al. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy. *Bioresour. Technol.* 2009;100:3410-4.
- [11] Salinas-Martínez A, De los Santos-Córdova M, Soto-Cruz O, Delgado E, Pérez-Andrade H, Háud-Marroquín LA, et al. Development of a bioremediation process by biostimulation of native microbial consortium through the heap leaching technique. *Environ. Manag.* 2008;88:115-9.
- [12] Cruz Martínez LC. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto (trabajo de grado). Colombia: Pontificia Universidad Javeriana; 2007.
- [13] Standard Methods. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 20th ed. Washington, D.C.: American Public Health Association; 2001.
- [14] González Pajuelo M, Meynial Salles I, Mendes F, Andrade JC, Vasconcelos Soucaille P. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. *Metabolic Engineering.* 2005;7:329-36.
- [15] Zeigler DR, Perkins JB. *The Genus Bacillus. Practical handbook of Microbiology*. 2 ed. Taylor & Francis Group, LLC; 2009:24.
- [16] Rodríguez Y. Búsqueda de microorganismos nativos presentes en el glicerol crudo, subproducto de la transesterificación de aceite de palma, capaces de utilizar el glicerol como fuente de carbono (trabajo de grado). Bucaramanga, Colombia: Universidad Industrial de Santander; 2010.