

INVESTIGACION

Optimización de la producción de biotensioactivos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1

Por M. Robert, E. Mercadé, C. Andrés, M. J. Espuny, M. A. Manresa* y J. Guinea.
Laboratorio de Microbiología. Facultad de Farmacia.
Avda. Diagonal s/n. 08028 Barcelona.

RESUMEN

Optimización de la producción de biotensioactivos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1.

En este trabajo se describen los resultados experimentales destinados a la optimización de la producción de biotensioactivos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 en un medio mineral con glucosa como fuente de carbono. Se han ensayado diversos componentes del medio de cultivo y condiciones de incubación, siendo la relación C/N, la concentración de hierro así como la temperatura de incubación, los parámetros fundamentales que han incrementado los valores de CMC⁻¹ como medida de la acumulación de tensioactivos.

PALABRAS-CLAVE: Biotensioactivo (producción) - *Pseudomonas aeruginosa* - Ramnolípido.

SUMMARY

Optimization of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1.

This work describes the experimental results carried out on the optimization of the fermentation media of *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 which produces surface active products when grown on glucose as carbon source. Several parameters of the media have been found to be critical for the production of biosurfactants by this strain. The C/N ratio, the iron concentration and the incubation temperature cause a high increase of the CMC⁻¹ values as a measure of surfactant production.

KEY-WORDS: Biosurfactant (production) - *Pseudomonas aeruginosa* - Rhamnolipid.

1. INTRODUCCION

Es un hecho conocido, que uno de los aspectos más interesantes de los sistemas biológicos es aquel que está relacionado con la capacidad sintetizadora de productos de elevado interés industrial. Estas nuevas perspectivas, resultantes de la observación detenida del comportamiento de los seres vivos, han conducido en los últimos años hacia la investigación y desarrollo de algunos modelos que han constituido las bases de las nuevas tecnologías.

La utilización de las técnicas basadas en la obtención de tensioactivos a partir de microorganismos

presenta un elevado interés en el campo aplicado. Históricamente, el principal impulsor que ha producido un desarrollo notable en el campo de los biotensioactivos ha sido la industria del petróleo, que ha orientado la producción microbiana de biotensioactivos hacia la recuperación terciaria del petróleo (1); además, en relación con esta industria, la utilización de biotensioactivos ha sido considerada del mayor interés a efectos de neutralizar accidentes ecológicos como las mareas negras y "oil spills" (2). En este campo concreto, las ventajas de los biotensioactivos son obvias porque actúan a la vez como dispersantes y emulsionantes, degradándose sin mayor dificultad.

En los últimos años se han vislumbrado nuevas áreas de aplicación para esta clase de productos al mismo tiempo que se han aislado nuevos e interesantes biotensioactivos producidos principalmente por microorganismos. En este sentido, han aparecido nuevas aplicaciones en el campo de los dispersantes y emulsionantes para la industria agrícola, la industria de la minería para la recuperación de metales, sin olvidar la industria papelera, de curtidos y alimentaria (3).

El futuro de los biotensioactivos y su competitividad se basa en su posible utilización frente a los de origen sintético con costos de mercado semejantes. Obviamente, en la producción microbiana de tensioactivos se deben considerar variables de partida tan importantes como el sustrato utilizado, que debe ser de bajo costo, la obtención de rendimientos medios elevados y el diseño de un proceso de aislamiento y separación del producto relativamente sencillo (2).

Pseudomonas aeruginosa 44T1 ha sido aislada en nuestro laboratorio a partir de una muestra de suelo (4). Esta cepa acumula ramnolípidos (5) que causan un descenso significativo de la tensión superficial a partir de distintas fuentes de carbono como la glucosa, parafinas o aceite de oliva (6).

En este trabajo se presentan los resultados del estudio de la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1, considerando el efecto de los componentes mediales y culturales en un medio mineral con glucosa como fuente de carbono, con objeto de establecer los parámetros más importantes que influyen sobre la acumulación de tensioactivos en la cepa estudiada. Este estudio está enmarcado en un proyecto más amplio de producción de tensioactivos con aplicación industrial.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Organismo y condiciones de cultivo.

Pseudomonas aeruginosa 44T1 se mantiene en agar inclinado TSA (BBL) mediante subcultivos quincenales a 4°C. El inóculo utilizado en las diversas experiencias, se prepara a partir de un subcultivo de 24 horas en medio TSA del cual se realiza una suspensión en Ringer 1/4 estéril, procediendo a un lavado de las células por centrifugación a 12.000 g durante 15 minutos en una centrífuga Kontron modelo Centricon H-41 y posterior resuspensión del pellet obtenido en Ringer 1/4 hasta obtener una absorbancia a 540 nm comprendida entre 0.200 y 0.300. El inóculo se añade al medio de cultivo al 1%.

El medio mineral inicial utilizado es el siguiente (g.l⁻¹): K₂HPO₄:1,0; KH₂PO₄:0,5; KCl:0,1; MgSO₄·7H₂O:0,5; CaCl₂:0,01; FeSO₄·7H₂O:0,01; extracto de levadura:0,1; NaNO₃:4,0; glucosa:20,0. Este medio se suplementa con la siguiente solución de oligoelementos: B (0,026%), Cu (0,05%), Mn (0,05%), Mo (0,06%), Zn (0,07%), a razón de 0,05 ml.l⁻¹.

Los cultivos se han llevado a cabo en matraces Erlenmeyer con muescas de 500 ml de capacidad conteniendo 50 ml de medio, incubados en agitación a 200 rpm a 30°C durante 44 horas.

2.2. Determinación del peso seco celular.

Las células se separan del caldo de cultivo mediante centrifugación a 12.000 g durante 15 minutos. El pellet obtenido se resuspende en agua procediendo a un lavado de las células por centrifugación en las mismas condiciones. El peso seco celular se determina tras desecación de las células a 105°C hasta peso constante y se expresa en g.l⁻¹.

2.3. Determinación de la tensión superficial y del pH.

La tensión superficial se ha determinado en un tensiómetro Fisher Mod. 20, según el método del anillo de Du Nöuy. El proceso seguido es el siguiente: 10 ml de caldo de cultivo libre de células se vierte en cápsulas de 50 x 30 mm y se deja en reposo durante 1 hora. Seguidamente se procede a la medición de la tensión superficial por duplicado, aplicando el anillo a la superficie del líquido. Los valores obtenidos se

corrigen utilizando los factores de corrección F, tabulados para tensiones superficiales.

El pH del sobrenadante del cultivo se ha determinado en un potenciómetro Radiometer pHmeter 28.

2.4. Determinación de la producción de tensioactivos.

La detección de los tensioactivos producidos, se ha llevado a cabo determinando la CMC⁻¹ (concentración micelar crítica relativa) como medida indirecta de la concentración de tensioactivos liberados al medio de cultivo.

La CMC⁻¹ se ha determinado midiendo la tensión superficial de distintas soluciones acuosas del caldo de cultivo libre de células. El cambio de pendiente de la curva de tensión superficial frente a las diluciones efectuadas, proporciona el valor de CMC⁻¹. El proceso seguido es el siguiente: se preparan diluciones del sobrenadante del caldo de cultivo a las siguientes concentraciones: 1:2, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200, determinando la tensión superficial de las mismas y se representan los valores de tensión superficial frente a soluciones acuosas.

3. RESULTADOS

3.1. Estudio de las fuentes de nitrógeno.

En la figura 1, se hallan representados los valores de tensión superficial y de crecimiento, expresado en peso seco en función de la fuente de nitrógeno en el medio mineral indicado con glucosa como fuente de carbono.

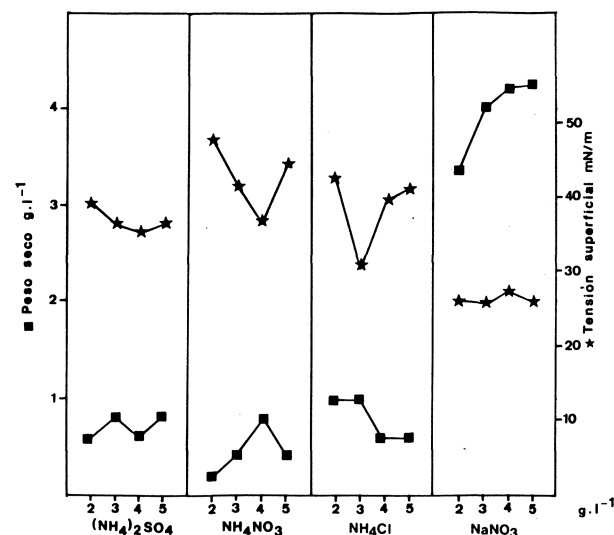


Figura 1

Valores correspondientes al estudio de la influencia de diversas fuentes de nitrógeno sobre la producción de biotensioactivos.

Como fuentes de nitrógeno, se han ensayado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NH_4Cl y NaNO_3 a las concentraciones de 2, 3, 4 y 5 g.l^{-1} , respectivamente.

Puede observarse una importante disminución de los valores de tensión superficial con un crecimiento elevado en los medios con NaNO_3 como fuente de nitrógeno. Con las restantes fuentes de nitrógeno no se han observado disminuciones apreciables de la tensión superficial, presentando en todos los casos un crecimiento muy escaso.

3.2. Crecimiento y producción de tensioactivos.

La cinética de producción de tensioactivos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 en el medio inicial se representa en la Figura 2. A partir de las 24 horas de incubación y durante un período de tiempo correlativo, se observa un aumento de la acumulación de tensioactivos en relación al crecimiento celular.

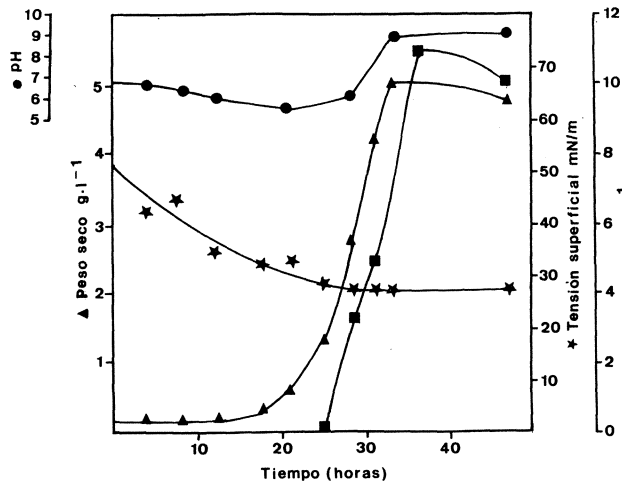


Figura 2

Cinética de crecimiento y producción de biotensioactivos.

La tensión superficial del caldo de cultivo, descendiendo paulatinamente, manteniéndose valores de 28 mNm a partir de las 24 horas de incubación, momento a partir del cual se detecta una acumulación notable de tensioactivos en el medio de cultivo, poniéndose de manifiesto por el incremento de la CMC^{-1} consiguiéndose a las 33 horas un valor de 11, es en este momento cuando se alcanza la fase estacionaria del crecimiento.

El pH del medio, descendiendo ligeramente hasta valores de 6 a las 20 horas de incubación. A partir de este momento, el pH aumenta a medida que incrementa el crecimiento bacteriano alcanzando un valor final de 9 a las 44 horas de incubación.

3.3. Estudio de la influencia de la concentración inicial de fosfatos.

La figura 3, muestra la influencia de la concentra-

ción inicial de fosfatos sobre el crecimiento y la producción. El estudio se ha realizado utilizando diversas concentraciones de K_2HPO_4 y KH_2PO_4 , manteniendo la proporción inicial.

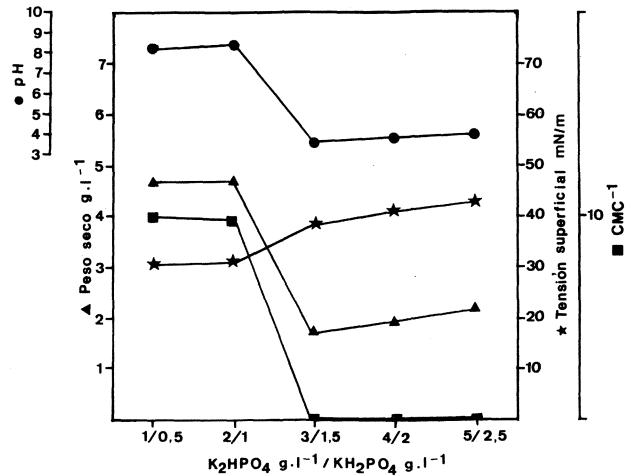


Figura 3

Efecto de la concentración inicial de K_2HPO_4 y KH_2PO_4 sobre la producción de biotensioactivos.

Para las concentraciones de 1 y 0.5 g.l^{-1} y 2 y 1g.l^{-1} de K_2HPO_4 y KH_2PO_4 respectivamente, se ha detectado un óptimo crecimiento y producción, sin diferencias apreciables entre ambas concentraciones y análogas a las del medio inicial ($\text{CMC}^{-1}=10$). Sin embargo, concentraciones superiores, producen una inhibición del crecimiento observándose una acumulación muy escasa de tensioactivos en el medio.

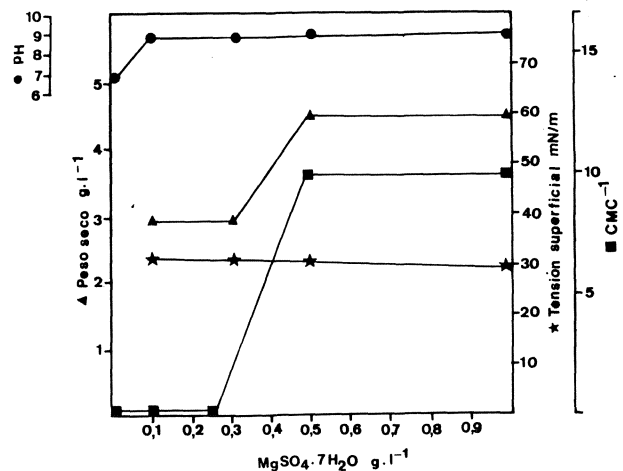


Figura 4

Efecto de la concentración inicial de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sobre la producción de biotensioactivos.

3.4. Estudio de la influencia de la concentración inicial de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

Los resultados obtenidos para distintas proporciones de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ que se expresan en la Figura 4, han mostrado que concentraciones de dicha sal inferiores a los 0.5 g.l^{-1} presentan un menor crecimiento bacteriano apreciándose una inhibición total en la acumulación de tensioactivos. A partir de 0.5 g.l^{-1} , se ha detectado una producción de tensioactivos análoga a la del medio inicial ($CMC^{-1}=10$), si bien concentraciones superiores ensayadas no se han traducido en una mayor acumulación de los mismos.

3.5. Estudio de la influencia de la relación C/N.

Los resultados obtenidos para el estudio de distintas relaciones C/N (carbono-nitrógeno), se muestran en la Figura 5. Ha podido constatarse que a menor relación C/N se aprecia mayor crecimiento bacteriano. Sin embargo, el valor máximo para la producción de tensioactivos, se ha obtenido a una relación C/N de 20 que representa un incremento de 5 veces la producción inicial. Esta máxima producción se corresponde a una biomasa de 4.45 g.l^{-1} y una CMC^{-1} de 50.

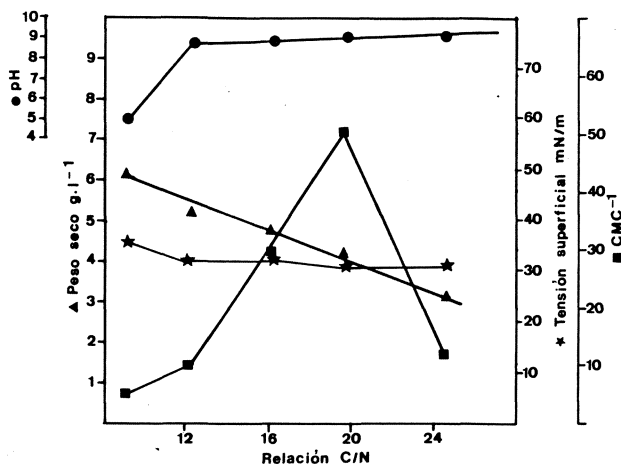


Figura 5

Efecto de la relación C/N sobre la producción de biotensioactivos.

3.6. Estudio de la influencia del extracto de levadura.

El extracto de levadura, ha mostrado un efecto inhibitorio en relación a la producción de tensioactivos por la cepa estudiada. En la Tabla I se expresan los resultados obtenidos para el estudio de la influencia del extracto de levadura. Puede observarse que a partir de 0.25 g.l^{-1} , la producción de tensioactivos detecta-

da, es nula. A una concentración de 0.1 g.l^{-1} , la producción corresponde a la del medio inicial y en ausencia de extracto de levadura, la acumulación de tensioactivos incrementa hasta 3 veces el valor del inicial.

Tabla I

Valores correspondientes al estudio de la concentración inicial de extracto de levadura sobre la producción de biotensioactivos.

Concentración Extracto de levadura (g.l^{-1})	CMC^{-1}	Peso seco (g.l^{-1})	pH	Tensión superficial mN/m
0	30	5.3	8.9	29.4
0.1	10	5.1	9.0	29.8
0.25	--	1.6	3.2	33.0
0.5	--	3.0	3.2	33.8
1	--	4.3	3.6	33.1

3.7. Estudio de la influencia de la concentración de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$.

Los resultados señalados en la Figura 6, expresan la influencia del efecto de la concentración del $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ en el medio, cultivado en ausencia de extracto de levadura. En ausencia de dicho ión, se ha detectado un escaso crecimiento sin acumulación concomitante de tensioactivos. A partir de concentraciones superiores a 1 mg.l^{-1} de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, la biomasa celular no se ve afectada. Sin embargo, una concentración de 10 mg.l^{-1} en el medio, presenta una máxima acumulación de tensioactivos proporcionando un valor de CMC^{-1} de 30. Concentraciones superiores e inferiores de dicho catión, inhiben la liberación de tensioactivos.

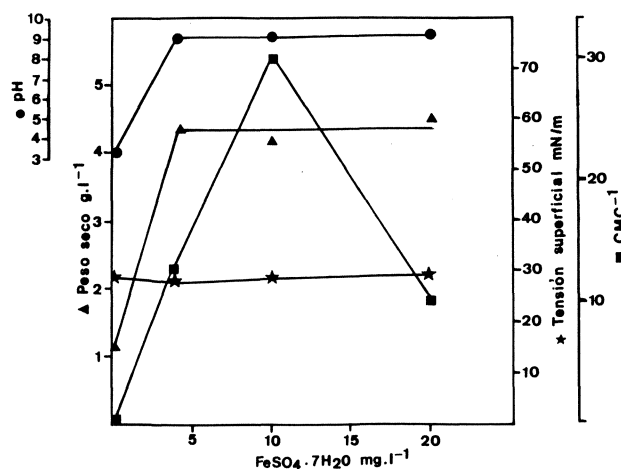
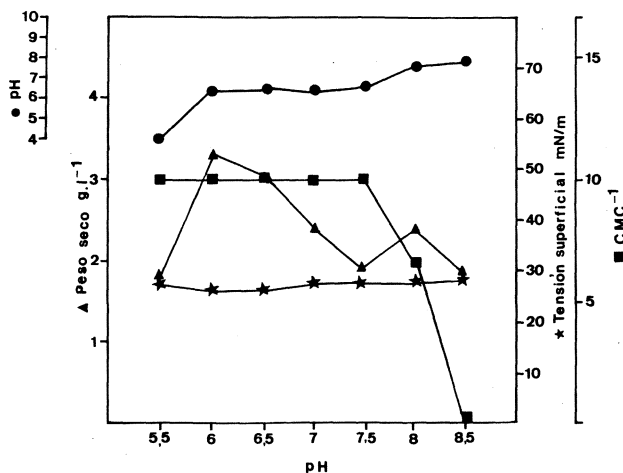


Figura 6

Efecto de la concentración inicial de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ sobre la producción de biotensioactivos.

Figura 7

Efecto del pH inicial sobre la producción de biotensioactivos.



3.8. Estudio de la influencia del pH inicial.

En la Figura 7, se muestran los resultados obtenidos al ensayar distintos pH iniciales. Puede apreciarse que si bien se ha detectado un crecimiento variable para los distintos pH iniciales ensayados, la producción se mantiene óptima a pH comprendidos entre 5.5 y 7.5. Valores superiores de pH, inhiben marcadamente la producción, siendo esta nula a partir de pH básicos superiores a 8.5.

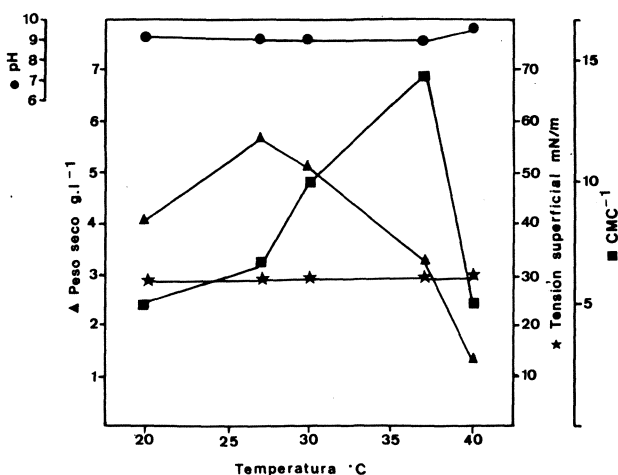


Figura 8

Efecto de la temperatura de incubación sobre la producción de biotensioactivos.

3.9. Estudio de la influencia de la temperatura de incubación.

Los resultados obtenidos en el análisis de la influencia de este parámetro, respecto a la máxima

producción de biotensioactivos, se representan en la Figura 8. El rango de temperaturas estudiadas, se sitúa entre los 20°C y los 40°C. A este respecto, se ha comprobado que la temperatura de máxima acumulación de tensioactivos, es independiente de la temperatura óptima de crecimiento alcanzada por el microorganismo. En efecto, la máxima acumulación de biotensioactivos hallada, corresponde a la temperatura de 37°C. En cambio, la temperatura óptima de crecimiento se presenta a los 27°C. El crecimiento bacteriano expresado en peso seco, disminuye ligeramente a una temperatura de incubación de 30°C para hacerse claramente inferior (3.25 g.l⁻¹) a los 37°C.

4. DISCUSION

A lo largo de los últimos años han sido numerosas las referencias relacionadas con el aislamiento y caracterización de sustancias con actividad superficial producidas por microorganismos (7). Las ventajas de este tipo de compuestos son obvias ya que son activos a concentraciones muy bajas y en su mayoría son compuestos biodegradables. Sin embargo, la principal limitación de la utilización de los biotensioactivos frente a los de origen sintético, se basa en su elevado costo de producción, debido al proceso fermentativo que implican. En este sentido, los esfuerzos investigadores actuales se centran en el incremento y optimización de la producción de tensioactivos de probado interés industrial como los glicolípidos o sustancias de origen polisacárido, ya que en última instancia cabe considerar que la producción de biotensioactivos puede asociarse al potencial aprovechamiento de subproductos naturales, como fuentes de carbono y energía sin un coste excesivo (8).

Pseudomonas aeruginosa 44T1, aislada en nuestro laboratorio a partir de una muestra de suelo, es una nueva cepa productora de ramnolípidos, con elevada actividad superficial, a partir de diversos sustratos hidrofóbicos e hidrofílicos (9).

En el marco del estudio del proceso fermentativo de producción por dicha cepa, se ha procedido a la determinación de los principales componentes que inciden sobre la producción de tensioactivos. Con este objetivo, se ha establecido un medio inicial con glucosa como fuente de carbono, estudiando la producción de tensioactivos en función de los componentes del medio de cultivo y otras variables culturales como el pH del medio y la temperatura de incubación.

En la literatura especializada se describen numerosos ejemplos en los que la naturaleza de la fuente de nitrógeno ejerce un papel definitivo sobre la acumulación de tensioactivos en el medio (10). La fuente de nitrógeno que se ha establecido para el estudio de la acumulación de tensioactivos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1, ha sido el nitrato sódico. Tal como muestran los resultados, el nitrato sódico permite la

acumulación de tensioactivos en el medio mientras que las restantes fuentes de nitrógeno no permiten un óptimo desarrollo y producción.

En este sentido, es interesante destacar que debido al perfil metabólico de la cepa que puede utilizar los nitratos como aceptor terminal de electrones para la respiración, cabe considerar la utilización de la fuente de nitrógeno para este fin. Este comportamiento puede evitarse con una fuerte aireación de los cultivos que inhiban el mecanismo de respiración aneróbica (11).

La cinética de acumulación de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1, presenta un perfil característico de un metabolito parcialmente asociado al crecimiento bacteriano. La acumulación de ramnolípidos se inicia durante la etapa exponencial de crecimiento, siendo ésta máxima al inicio de la fase estacionaria (12), (13). Este comportamiento, podría permitir la utilización de sistemas de cultivo continuo, ajustando la velocidad de crecimiento al punto de máxima velocidad de acumulación, para incrementar el rendimiento de producción.

En base a los resultados obtenidos en relación a la optimización del proceso, cabe destacar que los parámetros básicos que han dado lugar a un incremento significativo en la producción de biotensioactivos, han correspondido a la relación C/N (referida al nitrato sódico), la concentración de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y la temperatura de incubación.

En muchos procesos fermentativos, la relación C/N es un parámetro muy sensible y que afecta notablemente la acumulación de metabolitos en el medio. El mecanismo de regulación por nitrógeno no está totalmente esclarecido. Relaciones de C/N elevadas (es decir niveles bajos de nitrógeno en el medio) limitan el crecimiento bacteriano y canalizan el metabolismo celular hacia la producción de metabolitos. Por el contrario, un exceso de la fuente nitrogenada polariza el sustrato hacia la biosíntesis de material celular, limitando relativamente la acumulación de productos. Los resultados obtenidos en nuestros trabajos, han mostrado que el valor óptimo para la acumulación de tensioactivos en el medio, corresponde a una relación C/N de 20 (NaNO_3 2,5 g.l⁻¹) proporcionando un incremento de hasta 5 veces la producción inicial.

Se ha descrito que el hierro muestra un notable efecto en la acumulación de algunos metabolitos en especies del género *Pseudomonas* (14). En nuestras investigaciones, se ha demostrado que una concentración ajustada de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ influye considerablemente en la acumulación de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. A este respecto, concentraciones de 10 mg⁻¹ de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ han proporcionado un rendimiento máximo sobre la producción de los mismos. Nuestros resultados no son extrapolables a los señalados por Guerra-Santos et al. (15) en estudios realizados en cultivo continuo. Sin embargo,

puede constatar que la adición de hierro al medio de cultivo incrementa el rendimiento de producción de algunos tensioactivos como el lipopéptido sintetizado por *Bacillus subtilis* (16).

La temperatura de incubación, ha mostrado un efecto importante en todas las investigaciones efectuadas sobre la producción de tensioactivos en diversas especies bacterianas (10). El estudio de la influencia de la temperatura en la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 se ha establecido en un rango de temperaturas comprendido entre los 20°C y 40°C. La máxima producción de tensioactivos, se alcanza a una temperatura de 37°C aunque la temperatura óptima para el crecimiento es de 27°C. Este comportamiento se justifica debido a que a temperaturas óptimas de crecimiento existe una menor disponibilidad de ciertos precursores para la síntesis de metabolitos celulares. En cambio, a temperaturas subóptimas para el crecimiento, la menor demanda de precursores celulares favorece la acumulación de otros sustratos, en nuestro caso de sustancias tensioactivas (ramnolípidos). Por otro lado debe considerarse que los sistemas enzimáticos presentan una temperatura óptima en la cual se consigue un máximo rendimiento de los mismos. A pesar de ello, temperaturas de incubación elevadas inciden sobre un mayor coste de producción, siendo recomendable establecer las condiciones de incubación a temperaturas intermedias (30°C). El efecto observado en nuestras investigaciones, permite el planteamiento de una estrategia para la producción, basada en la incubación de la población a la temperatura óptima de crecimiento (27°C) a fin de favorecer un máximo desarrollo bacteriano, seguido de una incubación a la temperatura óptima para la producción (37°C) a efectos de conseguir un óptimo rendimiento en la síntesis de ramnolípidos.

En cuanto al resto de parámetros considerados en este estudio cabe destacar la incidencia del magnesio, necesario tanto para el crecimiento como para la producción de biotensioactivos (10), ya que forma parte de algunos cofactores enzimáticos. En nuestros resultados ha podido constatar que concentraciones inferiores a 0.5 g.l⁻¹ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, limitan el crecimiento y, por consiguiente, la síntesis de biotensioactivos. Concentraciones superiores de dicha sal han proporcionado un óptimo crecimiento y acumulación.

La adición de extracto de levadura al medio como factor de crecimiento, ha ejercido un efecto inhibitorio sobre la producción de tensioactivos. En este sentido, nuestros resultados coinciden con los aportados por Guerra-Santos et al. (15), realizados con una especie del género *Pseudomonas* en cultivo continuo. Por el contrario, otros géneros acumuladores de biotensioactivos exaltan la producción de los mismos en presencia de extracto de levadura (17).

Considerando la influencia ejercida por los fosfatos monopotásico y dipotásico que se han empleado conjuntamente, no se ha podido observar ningún efecto de incremento sobre la producción de ramnolípidos. De hecho, en la bibliografía especializada, no se ha podido constatar ninguna referencia en relación a la incidencia del fósforo en la formación de tensioactivos. Sin embargo, el empleo conjunto de ambas sales es necesario ya que se ha puesto de manifiesto que si bien el K_2HPO_4 favorece el desarrollo bacteriano, el KH_2PO_4 es necesario para la producción. A efectos prácticos, la utilización de la mezcla de las dos sales proporciona un óptimo crecimiento y producción (9).

Es un hecho conocido que la velocidad de metabolismo de los productos, se halla afectada por el pH del medio. En una fermentación de pH no controlado, el valor de éste en un momento dado, es el resultado del metabolismo del microorganismo en relación al pH inicial y a la composición del medio. En nuestro caso, el desarrollo de *Pseudomonas aeruginosa* en medios con $NaNO_3$ produce en la mayoría de los casos una alcalinización del medio. El desarrollo de la cepa, puede conseguirse a partir de un amplio rango de pH iniciales comprendidos entre 5.5 y 7.5 sin observarse diferencias apreciables en la acumulación de ramnolípidos.

Estos estudios preliminares, realizados en agitador rotatorio, han permitido establecer los parámetros mediales y culturales que inciden en la producción de ramnolípidos y que deberán ser considerados en posteriores procesos a escala de fermentador.

BIBLIOGRAFIA

1. Finnerty, W. R. and Singer, M. E.- "Microbial enhancement of oil recovery".- *Biotechnology* 1 (1983) 47-54.
2. Kosaric, N., Gray N. C. C. and Cairns, W. L.- "Biotechnology and the surfactant industry" in "Biosurfactants and Biotechnology" pp. 1-19.- N. Kosaric, W. L. Cairns and N. C. C. Gray (Eds.), Marcel Dekker Inc., New York, 1987.
3. Kachholz, T. and Schlingmann, M.- "Possible food and agricultural application of microbial surfactants: an assessment" in "Biosurfactants and Biotechnology" pp. 183-210.- N. Kosaric, W. L. Cairns and N. C. C. Gray (Eds.), Marcel Dekker Inc., New York, 1987.
4. Bosch, M. P., Robert, M., Mercadé, M. E., Espuny, M. J., Parra J. L. and Guinea, J.- "Surface active compounds on microbial cultures".- *Tenside Surfactants Deterg.* 25 (1988) 208-211.
5. Parra, J. L., Guinea, J., Manresa, M. A., Robert, M., Mercadé, M. E., Comelles, F. and Bosch, M. P.- "Chemical characterization and physicochemical behaviour of biosurfactants".- *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 66 (1989) 141-145.
6. Robert, M., Mercadé, M. E., Bosch, M. P., Parra, J. L., Espuny, M. J., Manresa, M. A. and Guinea, J.- "Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1".- *Biotechnol. Lett.* 11 (1989) 871-874.
7. Lang, S. and Wagner, F.- "Structure and properties of biosurfactants" in "Biotechnology and the Surfactant Industry" pp. 21-47.- N. Kosaric, W. L. Cairns and N. C. C. Gray (Eds.), Marcel Dekker Inc., New York, 1987.
8. Cooper, D. G.- "Biosurfactants".- *Microbiol. Sci.* 3 (1986) 145-149.
9. Robert, M.- "Aislamiento y selección de microorganismos productores de biotensioactivos. Producción y caracterización de biotensioactivos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1".- Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona, 1989.
10. Sylđatk, C. and Wagner, F.- "Production of biosurfactants" in "Biosurfactants and Biotechnology" pp. 89-120.- N. Kosaric, W. L. Cairns and N. C. C. Gray (Eds.), Marcel Dekker Inc., New York, 1987.
11. Hernández, D. and Rowe, J. J.- "Oxygen regulation of nitrate uptake in denitrifying *Pseudomonas aeruginosa*".- *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 745-750.
12. De Smet, M. J.- "A biotechnological approach to the synthesis of epoxides: bioconversion of hydrocarbons by *Pseudomonas oleovorans* during growth in a multiphase system".- Doctoral thesis. University of Groningen, 1982.
13. Cooper, D. G. and Paddock.- "Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*".- *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (1984) 173-176.
14. Torres, L., Perez-Ortin, J. E., Tordera, V. and Beltrán, J. P.- "Isolation and characterization of an FE (III)-chelating compound produced by *Pseudomonas syringae*".- *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (1986) 157-160.
15. Guerra-Santos, L., Käppeli, O. and Fiechter, H.- "*Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source".- *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (1984) 301-305.
16. Cooper, D. G., Macdonald, C. R., Duff, S. J. B. and Kosaric, N.- "Enhanced production of surfactant from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition".- *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (1981) 408-412.
17. Duvnjak, Z., Cooper, D. G. and Kosaric, N.- "Effect of nitrogen source on surfactant production by *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19588" in "Microbial Enhanced Oil Recovery" pp. 66-72.- J. E. Zajic, D. G. Cooper, T. R. Jack and N. Kosaric (Eds.), Pennwell Publishing Co., Tulsa, Okla. 1983.

(Recibido: Abril 1990)