



**UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA
DE TABASCO**



DIVISIÓN ACADÉMICA DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

**BIOSURFACTANTES SINTETIZADOS POR MICROORGANISMOS
PROVENIENTES DE AGUA CONGÉNITA CON POTENCIALES
APLICACIONES EN LA INDUSTRIA PETROLERA**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
“MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA”**

PRESENTA:

ING. JESÚS OCTAVIO MACÍAS MENDOZA

DIRECTOR:

DR. MIGUEL ÁNGEL HERNÁNDEZ RIVERA



Cunduacán, Tabasco, México, junio de 2025

Declaración de Autoría y Originalidad

En la Ciudad de Cunduacán, Tabasco, el día 09 del mes de mayo del año 2025, el que suscribe Jesús Octavio Macías Mendoza alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería con número de matrícula 162D19004, adscrito a la División Académica de Ingeniería y Arquitectura, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, como autor de la Tesis presentada para la obtención del Grado de Maestría y titulada “Biosurfactantes sintetizados por microorganismos provenientes de agua congénita con potenciales aplicaciones en la industria petrolera” dirigida por el Dr. Miguel Ángel Hernández Rivera.

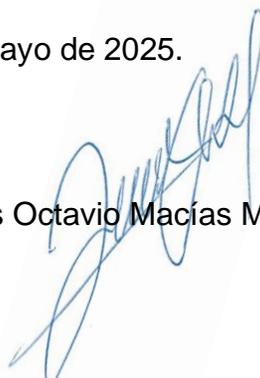
DECLARO QUE:

La Tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la LEY FEDERAL DEL DERECHO DE AUTOR (Decreto por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones de la Ley Federal del Derecho de Autor del 01 de julio de 2020 regularizando y aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad o contenido de la Tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Villahermosa, Tabasco a 09 de mayo de 2025.

Jesús Octavio Macías Mendoza





**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ingeniería
y Arquitectura



2025
AÑO DE LA
Mujer
Indígena

JEFATURA DE POSGRADO

Cunduacán, Tabasco a 06 de mayo de 2025.
MEM / AP-DAIA /58/ 2025

PARA **DRA. DORA MARÍA FRÍAS MÁRQUEZ**
DIRECTORA DE LA DAIA
DE: COMISIÓN SINODAL
ASUNTO: APROBACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS

Una vez hecha la revisión detallada de la Tesis denominada:

"Biosurfactantes sintetizados por microorganismos provenientes de agua congénita con potenciales aplicaciones en la industria petrolera"

Desarrollado por el IQ. **Jesús Octavio Macías Mendoza**, de la Maestría en Ciencias en Ingeniería, le comunicamos que aceptamos la impresión del trabajo, ya que el mismo ha cumplido con los requisitos necesarios.

COMITÉ SINODAL

DR. JUAN GABRIEL ALVAREZ RAMIREZ
PRESIDENTE

DR. JUAN BARAJAS FERNANDEZ
SECRETARIO

DR. MIGUEL ÁNGEL HERNÁNDEZ RIVERA
VOCAL 1

DRA. LAURA LORENA DÍAZ FLORES
VOCAL 2

DRA. YOLANDA CÓRDOVA BAUTISTA
VOCAL 3

DIRECCIÓN

OFICIO: DAIA/DIR/563/2025
FECHA: 08 de mayo de 2025
ASUNTO: Autorización de
impresión definitiva

IQ. JESÚS OCTAVIO MACÍAS MENDOZA
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA
PRESENTE

En virtud de haber elaborado su trabajo de Tesis denominado:

**"Biosurfactantes sintetizados por microorganismos provenientes de agua
congénita con potenciales aplicaciones en la industria petrolera"**

Para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Ingeniería** y en la cual ha tenido como Director de Tesis al Dr. Miguel Ángel Hernández Rivera.

Tengo a bien autorizarle la **IMPRESIÓN DEFINITIVA** de dicho trabajo, continuando con los trámites correspondientes para su examen de obtención de grado.

Sin otro particular, le envío un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE


DRA. DORA MARÍA FRÍAS MÁRQUEZ
DIRECTORA

c.e.p. Archivo
DRA'DMFM / MCA'RACT



DIRECCIÓN

Carta de Cesión de Derechos

Villahermosa, Tabasco a 09 de mayo de 2025.

Por medio de la presente manifestamos haber colaborado como AUTORES en la producción, creación y/o realización de la obra denominada "Biosurfactantes sintetizados por microorganismos provenientes de agua congénita con potenciales aplicaciones en la industria petrolera".

Con fundamento en el artículo 83 de la Ley Federal del Derecho de Autor y toda vez que, la creación y/o realización de la obra antes mencionada se realizó bajo la comisión de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; entendemos y aceptamos el alcance del artículo en mención, de que tenemos el derecho al reconocimiento como autores de la obra, y la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco mantendrá en un 100% la titularidad de los derechos patrimoniales por un período de 20 años sobre la obra en la que colaboramos, por lo anterior, cedemos el derecho patrimonial exclusivo en favor de la Universidad.

COLABORADORES


Ing. Jesus Octavio Macías Mendoza


Dr. Miguel Angel Hernandez Rivera

TESTIGOS


Dr. Juan Barajas Fernández


Dr. Juan Gabriel Alvarez Ramirez

DEDICATORIA

A mis padres, por depositar su confianza, amor, cariño y por su puesto su apoyo incondicional para culminar esta meta más. Las palabras que dedico a ustedes podrían llenar tantas hojas como esta tesis y no acabaría de agradecer y expresarles mi amor.

A mi hermano por estar en los buenos y malos momentos, porque nuestra hermandad va más allá del tiempo y la distancia.

A mi esposa, por formar parte fundamental de mi vida diaria, por todo su apoyo lo cual hace que seamos un excelente equipo y seguramente compartiremos muchos más logros.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme vivir rodeado de personas valiosas.

A mis asesores, el Dr. Miguel Ángel Hernández Rivera y la Dra. Marcia Eugenia Ojeda Morales, por su invaluable guía, paciencia y compromiso con mi formación académica.

Su experiencia y orientación absoluto han sido mis pilares fundamentales para mi crecimiento profesional.

Mi comité sinodal, Dr. Juan Barajas Fernández, la Dra. Laura Lorena Díaz Flores, la Dra. Yolanda Córdova Bautista y el Dr. Juan Gabriel Álvarez Ramírez. Su dedicación, análisis crítico y enriquecedoras observaciones han sido esenciales para el desarrollo y mejora de mi proyecto de investigación y trayectoria académica.

Asimismo, al Dr. César Pérez Alonso, Dr. Jaime Eduardo Vernon Carter, Dra. Andrea Guadarrama Lezama y Dr. Héctor Carrillo Navas por considerarme parte de su equipo de trabajo y brindarme la ayuda incondicional en cada uno de los laboratorios.

A mi alma mater la UJAT-DAIA y al CONACYT por darme cavidad en su recinto en tan inconmensurable lugar, por permitirme ser parte de su historia.

Al equipo de laboratorio de biotecnología UJAT-DAIA, ya que ellos forman mi familia académica.

Cada uno de ustedes ha dejado una huella imborrable en mi vida. Me honra contar con su fraterna amistad, su respaldo, su guía y su confianza. Gracias por creer en mí, por impulsarme a ser mejor y por demostrarme que el conocimiento es un viaje maravilloso que nunca termina.

Con respeto, admiración y profunda gratitud.

Jesús Octavio Macías Mendoza

Índice de contenido

ÍNDICE DE TABLAS.....	11
ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
RESUMEN.....	15
ABSTRACT.....	16
INTRODUCCIÓN.....	17
Capítulo 1.....	20
1 MARCO TEÓRICO.....	20
1.1 Hidrocarburos.....	20
1.1.1 Petróleo.....	20
1.1.2 Origen del petróleo.....	20
1.1.3 Composición del petróleo.....	20
1.1.4 Clasificación del petróleo.....	21
1.1.5 Producción y extracción.....	22
1.1.6 Agua congénita.....	23
1.2 Surfactante.....	23
1.2.1 Clasificación.....	25
1.2.2 Formación de micelas.....	26
1.2.3 La concentración micelar crítica.....	28
1.2.4 La tensión superficial e interfacial.....	29
1.3 Biosurfactantes.....	30
1.3.1 Clasificación y tipos de biosurfactantes que son producidos por los microorganismos.....	32
1.3.1.1 Bajo peso molecular.....	32
1.3.1.2 Alto peso molecular.....	33
1.3.1.3 Glicolípidos.....	33
1.3.1.4 Ramnolípidos.....	33
1.3.1.5 Trehalolípidos.....	34
1.3.1.6 Soforolípidos.....	34
1.3.1.7 Lipopéptidos y lipoproteínas.....	35
1.3.1.8 Ácidos grasos y lípidos neutros.....	35

1.3.1.9 Poliméricos	35
1.3.3 Funciones microbianas y microorganismos productores de biosurfactantes	37
1.3.4 Producción de biosurfactante.....	39
1.3.5 Ventajas de los usos de biosurfactantes	39
1.3.6 Aplicaciones de los biosurfactantes.....	40
1.3.6.1 Aplicación en la industria petrolera	41
1.3.6.2 Recuperación Mejorada de Hidrocarburo	42
1.3.6.3 Recuperación Mejorada de Hidrocarburo vía Microbiana	43
1.3.6.4 Proceso de producción y refinación de los hidrocarburos	45
1.3.6.5 Biorremediación	48
Capítulo 2.....	50
2.1 Justificación	50
2.2 PreguntaS de investigación.....	51
2.3 Hipótesis	51
2.4 Objetivo general.....	51
2.5 Objetivos específicos.....	51
Capítulo 3.....	52
3. METODOLOGÍA	52
3.1. Ubicación del área de muestro	52
3.2 Muestreo de agua y análisis fisicoquímico	53
3.3 Análisis físicos	53
3.3.1 Análisis para la determinación de la turbidez de acuerdo a la norma NMX-AA-038-SCFI-2001.	53
3.3.2 Análisis para la determinación de la conductividad eléctrica de acuerdo a la norma NMX-AA-093-SCFI-2000.....	54
3.3.3 Análisis para la determinación de sólidos totales y sólidos disueltos totales de acuerdo a la norma NMX-AA-034-SCFI-2015.	55
3.4 Análisis químicos.....	57
3.4.1 Análisis para la determinación de alcalinidad de acuerdo a la norma NMX-AA-036-SCFI-2001.	57

3.4.2 Análisis para la determinación de grasas y aceites de acuerdo a la norma NMX-AA-005-SCFI-2013.....	58
3.4.3 Determinación del potencial de hidrógeno de acuerdo a la norma NMX-AA-008-SCFI-2011.....	59
3.4.4 Análisis para la determinación de cloruros totales de acuerdo a la norma NMX-AA-073-SCFI-2001.....	61
3.5 Análisis biológico.....	62
3.5.1 Caracterización y aislamiento de las cepas microbianas.....	63
3.2.2 Caracterización morfológica a nivel colonia.....	63
3.5.3 Aislamiento de las colonias puras por método siembra en estría en placas.....	64
3.6 Prueba petrofílica de las cepas microbianas.....	64
3.7 Crecimiento microbiano en fertilizantes comerciales utilizando la escala de McFarland.....	65
3.8 Ensamble de los biorreactores para la producción de los biosurfactantes de las cepas microbianas.....	67
3.9 Inoculación de las cepas microbianas en medio mineral líquido.....	68
3.10 Extracción y purificación del biosurfactante de cada cepa microbiana.....	69
3.10.1 Filtración.....	69
3.10.2 Precipitación de material no tensoactiva con acetona.....	70
3.10.3 Extracción de biosurfactante con mezcla de solventes cloroformo/metanol.....	71
3.10.4 Purificación de los biosurfactantes.....	72
3.11 Determinación de propiedades de superficie.....	72
3.11.1 Preparación de la muestra.....	72
3.11.2 Medición de tensión superficial.....	73
3.11.3 Concentración micelar crítica.....	74
3.11 Determinación de propiedades termodinámicas.....	74
3.11.1 Determinación de densidad.....	74
3.11.2 Determinación de pH.....	75
3.12 Determinación de propiedades fisicoquímicas.....	76
3.12.1 Índice de emulsificación.....	76
3.13 Determinación de propiedades químicas.....	76
3.13.1 Identificación de lípidos polares.....	76
3.13.2 Preparación de soluciones.....	77

3.13.2.1 Solución reveladora de glicolípidos	77
3.13.2.2 Solución reveladora de lipopéptidos.....	78
3.13.2.3 Solución reveladora de fosfolípidos.....	78
3.13.3 Determinación de grupos funcionales	78
3.13.4 Determinación de la composición elemental en %masa.....	78
Capítulo 4.....	80
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	80
4.1 Análisis fisicoquímicos del agua congénita	80
4.2 Análisis biológico.....	85
4.2.1 Obtención y purificación de cepas microbianas puras	85
4.2.2 Prueba petrofílica a los microorganismos.....	87
4.2.3 Identificación del género de las cepas fúngicas	87
4.3 Crecimiento microbiano.....	88
4.4 Producción de biosurfactantes.....	92
4.5 Caracterización fisicoquímica de los biosurfactantes.....	92
4.5.1. Medición de tensión superficial.....	92
4.5.2 Índice de emulsificación y tamaño de gota de la emulsión	95
4.5.3 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier.....	97
4.5.4 Análisis elemental	99
4.5.5 Determinación de pH.....	100
4.5.6 Determinación de concentración micelar crítica.....	101
Capítulo 5.....	103
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	103
5.1. Conclusiones	103
5.2 Recomendaciones.....	104
5.3 Referencias citadas.....	106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del petróleo de acuerdo a su densidad.	21
Tabla 2. Producción mundial de petróleo (Fantini, 2014).	22
Tabla 3. Clasificación de surfactantes (Schramm, 2000).	25
Tabla 4. Grupos hidrofílicos más comunes en los surfactantes (Sustersick, 2004).	25
Tabla 5. Fuente microbiana y propiedades de algunos biosurfactantes de importancia en la industria petrolera (Desai y Banat, 1997).	38
Tabla 6. Clasificación y efecto de los diferentes subprocesos, empleados en recuperación mejorada.	43
Tabla 7. Costos del tratamiento de suelos contaminados (Cameotra y Bollag, 2003).	49
Tabla 8. Estándar de Mc Farland	67
Tabla 9. Medio de cultivo.	68
Tabla 10. Resultados de análisis fisicoquímicos del agua congénita.	81
Tabla 11. Caracterización macroscópica de las cepas bacterianas.	86
Tabla 12. Caracterización macroscópica de las cepas fúngicas.	86
Tabla 13. Tensión superficial de los microorganismos.	94
Tabla 14. Resultados obtenidos experimentalmente.	97
Tabla 15. Composición elemental en % masa de los BS microbianos.	100
Tabla 16. CMC de los BS microbianos.	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición química elemental del petróleo (Miranda et al., 2007).	21
Figura 2. Ubicación de la molécula de surfactante en la interfase (Riojas et al., 2010)	24
Figura 3. A) Aumento continuo en la pendiente hasta llegar a su máximo; b) Condiciones de concentración expresada en $\ln x$ y de tensión superficial en donde se observa un comportamiento lineal (Katime et al., 2003).	29
Figura 4. a, b y c muestran la ubicación de las moléculas en la interfase y la formación de micelas a medida que aumenta la concentración de las moléculas (cita).	29
Figura 5. Solubilización micelar (cita).	33
Figura 6. Representación esquemática en el arreglo de las moléculas de biosurfactante alrededor de la CMC (Donaji et al., 2010).	37
Figura 7. Estructura básica de una micela con base en el modelo de Hartley (Donaji et al., 2010).	37
Figura 8. Principio de los métodos de recuperación mejorada por inyección (Salager, 1991)...	44
Figura 9. Mapa de la ubicación de los 29 campos petroleros correspondientes al Activo Aceite Terciario del Golfo (CNH-SENER, 2010).	45
Figura 10. Corrosión en medio sulfhídrico e inhibición por adsorción de surfactantes catiónicos (Salager, 1991).	46
Figura 11. Acción detergente en medio no polar (Salager, 1991).	47
Figura 12. Solubilización micelar de una sustancia polar en medio no polar (Salager, 1991). ..	47
Figura 13. Complejo de PEMEX (Datos del mapa © 2019 INEGI).	52
Figura 14. Procedimiento para la determinación de viables por el método en placa usando diluciones seriadas.	63
Figura 15. Caracterización morfológica a nivel colonia (Ramírez, 2001).	63
Figura 16. Cepa bacteriana.	65
Figura 17. Cepa fúngica.	65
Figura 18. Biorreactor para la producción de biosurfactante.	66
Figura 19. Cepas inoculadas en los diferentes biorreactores.	66
Figura 20. a) Cepa bacteriana en agar nutritivo; b) Cepa fúngica en agar dextrosa papa;	68
Figura 21. Medio de cultivo fermentado.	69
Figura 22. Filtrado de la biomasa.	70

Figura 23. Precipitación de las sustancias no tensoactivas.	71
Figura 24. Separación de fases, recuperación del precipitado.	72
Figura 25. a) Recuperación del solvente; b) Biosurfactante puro.	72
Figura 26. Técnica del micropicnómetro.	75
Figura 27. Equipo pHmetro.	75
Figura 28. Agitación en vórtex.	76
Figura 29. Microscopio OLYMPUS BX45, Software Zen Lit3e 2012.	76
Figura 30. a) Placas de cromatografía; b) Soluciones reveladoras; c) Placas sumergidas en solución disolvente.	77
Figura 31. Microscopio Electrónico de Barrido.	79
Figura 32. Cepa H ₂	87
Figura 33. Cepa H ₁	87
Figura 34. Cepa H ₅	88
Figura 35. Curva de calibración para estimar el crecimiento de UFC.	89
Figura 36. Crecimiento bacteriano UFC mL ⁻¹	90
Figura 37. Crecimiento fúngico UFC mL ⁻¹	90
Figura 38. Espectro FT-IR del BS de la Cepa B ₂	98

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

**BIOSURFACTANTES SINTETIZADOS POR
MICROORGANISMOS PROVENIENTES DE AGUA CONGÉNITA
CON POTENCIALES APLICACIONES EN LA INDUSTRIA
PETROLERA**

RESUMEN

Los microorganismos originan una diversidad de compuestos bipolares, anfipáticos, con actividad superficial e interfacial; los biosurfactantes son partes de la membrana celular de bacterias y hongos. En la actualidad los biosurfactantes están obteniendo mayor interés con respecto a los surfactantes químicos debido a las grandes ventajas que representan para el medio ambiente, los biosurfactantes tienen un amplio campo de aplicación, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas pueden ser utilizados en las diferentes industrias, incluyendo la biorremediación de ecosistemas contaminados con hidrocarburos. Los surfactantes químicos, no son ecológicos, tienen baja eficiencia a la biodegradación y son considerados altamente tóxicos. Sin embargo, la información de análisis fisicoquímicos de biosurfactantes es escasa.

En el presente trabajo se aisló microorganismos de agua congénita proveniente de baterías de separación, obteniendo ocho cepas bacterianas y siete fúngicas. Para la selección de los microorganismos se sembraron las cepas en Agar nutritivo con petróleo estéril como única fuente de carbono; de este proceso se seleccionaron seis cepas; para la producción de biosurfactante se empleó medio mineral líquido comercial, el mismo que fue separado de la masa microbiana, mediante la centrifugación y filtración. Los metabolitos fueron evaluados fisicoquímicamente. Los resultados obtenidos indicaron que los biosurfactantes son lipopéptidos de acuerdo a la cromatografía en capa fina y espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier, disminuyen tensión superficial del agua hasta 45 mN m^{-1} . Por lo tanto, los biosurfactantes tienen posibilidad de aplicación en las diferentes industrias.

Palabras clave: Biosurfactantes, petróleo, tensión superficial, concentración micelar crítica.

ABSTRACT

Microorganisms produce a variety of bipolar, amphipathic compounds with surface and interfacial activity. Biosurfactants are components of the cell membrane of bacteria and fungi. Recently, biosurfactants have gained more interest over chemical surfactants due to their environmental advantages. Their wide range of applications depends on their physicochemical properties, allowing their use in various industries, including the bioremediation of ecosystems contaminated with hydrocarbons. Chemical surfactants are not eco-friendly, have low biodegradation efficiency, and are highly toxic. However, information on the physicochemical analysis of biosurfactants remains scarce.

In this study, microorganisms were isolated from connate water obtained from separation batteries, yielding eight bacterial and seven fungal strains. To select microorganisms, strains were cultivated in nutrient agar with sterile petroleum as the sole carbon source, leading to the selection of six strains. For biosurfactant production, a commercial liquid mineral medium was used, which was separated from the microbial biomass through centrifugation and filtration. The metabolites were evaluated physicochemically. The results indicated that biosurfactants are lipopeptides according to thin-layer chromatography and Fourier-transform infrared spectroscopy, reducing water surface tension to 45 mN m^{-1} . Therefore, biosurfactants have potential applications across various industries.

Keywords: Biosurfactants, oil, surface tension, critical micelle concentration

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el petróleo es una de las materias primas más importantes a nivel mundial por tanto es la base de la economía de muchos países como México, Estados Unidos, Arabia Saudita entre otros. El petróleo es utilizado principalmente para la producción de combustibles y lubricantes, además se ocupa para la manufacturación de polímeros, que de acuerdo a sus características pueden ser usados para la elaboración de prótesis, órganos artificiales, implantes para odontología, tubos para uso industrial y doméstico. Con el petróleo también se fabrican fertilizantes, herbicidas, colorantes, detergentes, ceras, asfalto, etc. BP (2015) reportó que los diez principales países productores de petróleo en el 2014 fueron: Estados Unidos, Arabia Saudita, Rusia, Canadá, China, Emiratos Árabes, Irán, Irak, Kuwait y México que ocupó el 10mo lugar de la lista, aportando 2.784 Miles de barriles diarios (Mbd), cifra que es confirmada por lo reportado por Petróleos Mexicanos (PEMEX, 2014). De los 2.784 Mbd, la Región Sureste de la República Mexicana aportó 1.072 Mbd de la producción nacional de petróleo, lo que hizo a Tabasco y Chiapas los estados con mayor producción de petróleo con 683.6 Mbd.

A lo largo de los años la industria petrolera ha manejado procesos fisicoquímicos y mecánicos para lidiar con las complicaciones de obtención y rescate de los hidrocarburos. Para la extracción del petróleo se tienen establecidas tres fases de recuperación: primaria, secundaria y terciaria. En la fase primaria la producción de petróleo depende de la presión natural y flujo característico del petróleo donde la recuperación del petróleo es alrededor del 15%; siendo la fase de extracción más económica. En la fase secundaria se ocupa la inyección de agua (*water flooding*) para extraer parte del petróleo residual entrampado en los poros de la roca o la inyección de gases como CO₂, N₂ o gas natural. No obstante, en esta fase de extracción permanece una remanencia del petróleo pesado y extrapesado de aproximadamente 60%. Y en la fase terciaria también llamada recuperación mejorada del petróleo (EOR). Se considera la más cara puesto que se utilizan distintos métodos para aumentar la presión en el

reservorio y/o disminuir la viscosidad del petróleo mediante la inyección de químicos como polímeros, surfactantes, (*chemical flooding*), agentes térmicos (estimulación con vapor, inyección de agua caliente e inflamación en el área) o solventes miscibles (Peláez, 2009). Las técnicas EOR que ha llamado fuertemente la atención es la recuperación mejorada con microorganismos, la cual emplea microorganismos o sus productos metabólicos (biosurfactantes), con el fin de recuperar aquellas fracciones de petróleo con altos grados de viscosidad (Marchant & Banat, 2012).

En México existen una gran cantidad de yacimientos “agotados” o desatendidos, comúnmente llamados yacimientos o pozos maduros, en el cual la extracción del petróleo crudo remanente por las tecnologías convencionales es costosa. La inclinación de los reservorios en nuestro país, los escenarios ambientales desfavorables y el descenso de encontrar nuevos depósitos petrolíferos, son situaciones que hacen necesaria la investigación científica de nuevas tecnologías. Así como su implementación en la industria petrolera. En la actualidad se han descubierto diversos microorganismos con la capacidad de sintetizar biosurfactantes, los cuales por sus características fisicoquímicas pueden competir y remplazar a los surfactantes de origen químico. Los biosurfactantes tienen grandes ventajas con respecto a los surfactantes químicos. Son buenos reductores de la tensión superficial e interfacial entre el petróleo y el agua, lo que posibilita y aumenta la recuperación de petróleo en la tercera fase de extracción (Youssef et al., 2013). Los biosurfactantes tienen buena estabilidad en medios salinos, son biodegradables, tienen baja o nula toxicidad, etc. (Ojeda et al., 2016) y, además, al no provenir del petróleo como los surfactantes químicos, sus precios son independientes del precio internacional del petróleo.

Esta investigación planteó el aislamiento y utilización selectiva de diversas cepas microbianas autóctonas de agua congénita, que tienen la capacidad de sintetizar biosurfactantes. Estos podrían modificar las propiedades del petróleo o las propiedades de la roca de lutita, consintiendo una recuperación sostenible. Por lo tanto, el objetivo principal de esta investigación es el aislamiento de cepas microbianas y caracterización

fisicoquímico de biosurfactantes. De esta manera, se aporta conocimiento científico para su potencial aplicación en un sistema de MEOR en pozo petrolero.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Hidrocarburos

1.1.1 Petróleo

La palabra petróleo descende del latín *petróleum* la cual se compone de “*petra*” que significa roca o piedra y “*óleum*” que significa aceite por lo tanto *petróleum* quiere decir aceite de roca. Se ha considerado como la materia prima con mayor demanda en la industria energética y a pesar de ser un recurso natural, no es renovable (Miranda et al., 2007; Méndez, 2007).

1.1.2 Origen del petróleo

La teoría de Engler de 1911 menciona que la formación de hidrocarburos tanto líquidos como gaseosos está asociada al progreso de peñas sedimentarias, precipitadas en entornos marinos, costeros o contiguos al océano, y resulta del proceso de descomposición de materia orgánica de origen animal y vegetal, que en épocas arcaicas quedaron depositados en esas áreas.

1.1.3 Composición del petróleo

El petróleo es una sustancia de color oscuro y consistencia aceitosa, y por su composición química (hidrógeno y carbono) se le denomina hidrocarburo (Miranda et al., 2007; Olguín et al., 2007).

La composición elemental química del petróleo regularmente está comprendida dentro de los intervalos indicados en la Figura 1 (Miranda et al., 2007).

De acuerdo la cantidad de carbono (átomos) y del arreglo atómico de los hidratos de carbono que componen al petróleo crudo, se poseen distintas propiedades que los identifican por lo tanto establecen sus aplicaciones como combustibles, lubricantes, ceras o solventes (IMP, 2011).

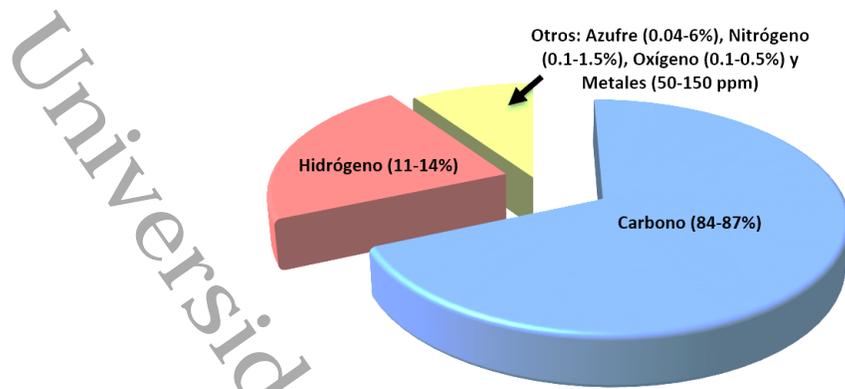


Figura 1. Composición química elemental del petróleo (Miranda et al., 2007).

1.1.4 Clasificación del petróleo

Con la temperatura de ebullición real o "TBP" (True Boiling Point Distillation) existen las curvas de destilación las cuales clasifican al petróleo y delimitan los provechos que se pueden alcanzar de los productos por separación directa. Por ejemplo, con el petróleo crudo del "Istmo" se obtiene una ganancia directa del 26.0% volumétrico en gasolina, mientras que en el petróleo crudo "Maya" sólo se logra el 15.7%.

En la manufactura internacional de los hidrocarburos líquidos, el petróleo se clasifica acorde a los °API (parámetro internacional del Instituto Americano del Petróleo), que hace diferencias en la calidad del petróleo. La Tabla 1 indica la clasificación del petróleo (IMP, 2011).

Tabla 1. Clasificación del petróleo de acuerdo a su densidad (IMP, 2011).

Aceite crudo	Densidad (g cm ⁻³)	Densidad (°API)
Extrapesado	> 1.00	10.00
Pesado	1.00 - 0.92	10.0 - 22.30
Mediano	0.92 - 0.87	22.3 - 31.10
Ligero	0.87 - 0.83	31.10 - 39.00
Superligero	< 0.83	> 39.00

Otra forma de clasificación del petróleo es de acuerdo a sus características fisicoquímicas. Por ejemplo, en petroquímica lo clasifican por el contenido de azufre: Amargo (>1.5%), semi amargo (entre 0.5 a 1.5%) y dulce (<0.5%) (PEMEX, 2014).

1.1.5 Producción y extracción

En el 2016, a nivel mundial se produjeron 72 842.2 Mdb, en la Tabla 2 se muestra la producción mundial de petróleo, de los cuales la región Medio Oriente produjo 23 834.5 Mdb, ocupando el primer lugar por regiones. De acuerdo a su producción siguen Europa Oriental, Euroasia, y Latinoamérica, en segundo lugar, con 17.51% y tercer lugar con 13.29%, respectivamente. Entre los países, Rusia con 10 146.6 Mdb ocupa el primer lugar a nivel mundial, seguido por Arabia Saudita con el 13.23% y Estados Unidos de América con el 10.22% de la producción anual mundial. En este rubro México se ubica en la décima posición con una producción de 2 522.2 Mdb, la cual representa el 3.46% (Fantini, 2014).

Tabla 2. Producción mundial de petróleo (Fantini, 2014).

Región	Producción de petróleo (Mdb)
Norteamérica	8 822.10
Latinoamérica	9 680.20
Europa Oriental y Euro Asia	12 757.30
Europa Occidental	2 721.60
Medio Oriente	23 834.50
África	7 640.10
Asia y Pacífico	7 386.40
Total, mundial	72 842.20

A nivel nacional e internacional en las diferentes industrias, el petróleo mexicano se le considera como materia prima de excelente calidad. Nuestro país cuenta con cuatro tipos de petróleo: **Olmecca** considerado súper ligero y semi amargo por su densidad de 39 °API y 0.8% de azufre en peso, **Istmo** considerado ligero y semi amargo por su densidad de 33 °API y 1.3% de azufre en peso, **Maya** considerado pesado y amargo por su densidad de 22 °API y 3.3% de azufre en peso y **Altamira** considerado pesado y amargo por su densidad de 15 °API y 5.6% de azufre en peso (PEMEX, 2018). A nivel nacional e internacional, al petróleo mexicano se considera como materia prima de excelente calidad.

PEMEX (2014) reportó que de los 2 522.20 Mdb que se produjeron en México, 1 365 Mdb fueron de crudo Maya, 847 Mdb de crudo Istmo y 310 Mdb de crudo Olmeca, siendo la región marítima noreste la que contribuyó con el mayor porcentaje, aportando el 51.38%. Por otra parte, la producción de hidrocarburos en pozos en tierra en el litoral del Golfo de México fue del 25.11%. En el estado de Tabasco se reportó una producción de 433 Mdb, esto representó el 16.99%, convirtiéndose en el estado con mayor extracción de hidrocarburos a nivel nacional.

1.1.6 Agua congénita

El agua congénita o también conocida como agua de formación, es un líquido salado que está presente en el interior de la roca, asociada con la presencia de hidrocarburos. Su composición química es de sales disueltas (CaCl, NaCl y KCl, Na₂CO₃, CaSO₃, BaCO₃, entre otros); incluso puede contener ciertos metales. Las concentraciones de estos compuestos pueden originar impactos negativos al medio ambiente por un mal manejo y/o disposición final inadecuado. En México, en el año 2002, el aprovechamiento de los hidrocarburos, originó 12.09 millones de metros cúbicos de agua congénita, de los cuales se reinyectó 86.4% y se situó en áreas aceptantes, el 14.6% sobrante (Agricultura et al., 2005).

1.2 Surfactante

La palabra surfactante es un vocablo adaptado de las palabras en inglés "Surface Active agente". Los surfactantes son moléculas anfipáticas de origen químico, estas moléculas son capaces de reducir la tensión superficial e interfacial de los líquidos debido a que se concentran o acumulan en la interfase entre dos medios. Los surfactantes gozan de una complejidad molecular distintiva la cual es básicamente lineal y asimétrica, poseen dos zonas, una hidrofóbica (parte apolar) y otra hidrofílica (parte polar). Principalmente los surfactantes se mantienen en la interfase aceite/agua o aire/agua (Figura 2). Si el surfactante está disuelto en una fase oleica, su grupo polar posee interacciones con el solvente. Si el surfactante se encuentra intrínsecamente en la fase acuosa su grupo polar

puede estar rodeado de moléculas de agua y se conoce como solvatación (Riojas et al., 2010).

Los biosurfactantes tienen importantes características fisicoquímicas (tensión superficial, grupos funcionales, concentración micelar crítica, viscosidad, entre otras) las cuales les dan la peculiaridad a las moléculas anfipáticas de ser excelentes detergentes, emulsificantes, espumantes y dispersantes (Ojeda et al., 2016), por lo tanto, los surfactantes son empleados extensamente en las diferentes industrias, principalmente en la elaboración de detergentes y pinturas (Mohammad et al., 2008).

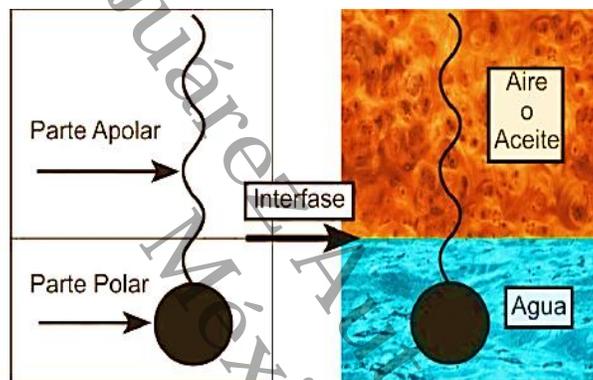


Figura 2. Ubicación de la molécula de surfactante en la interfase (Riojas et al., 2010)

El mecanismo de acción de los surfactantes, está en su capacidad de inmiscuirse como una capa muy fina entre dos fases inmiscible, por lo que la tensión superficial e interfacial entre la sustancia hidrofóbica y los compuestos hidrofílicos se reducen a tal grado que las dos fases se vuelven miscibles entre sí. A concentraciones bajas de los surfactantes, las moléculas bipolares aumentan inicialmente en la interfase aceite/agua, y a concentraciones altas la fase de aceite se disuelve, es decir, las partículas coloidales individuales son encerradas completamente por las moléculas de los surfactantes formando micelas, las cuales se dispersan en la fase acuosa (Martienssen et al., 2003). Los parámetros importantes en un surfactante son la tensión superficial y la concentración micelar crítica.

1.2.1 Clasificación

Los surfactantes pueden clasificarse según la naturaleza de la carga en su parte hidrofílica, en la Tabla 3 se muestra la clasificación.

Tabla 3. Clasificación de surfactantes (Schramm, 2000).

Tipo	Ejemplo	Estructura
Aniónicos	<i>Esterato de sodio</i>	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{16} \text{COO}^- \text{Na}^+$
	<i>Dodecil sulfato de sodio</i>	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{11} \text{SO}_4^- \text{Na}^+$
	<i>Dodecil benceno sulfato de sodio</i>	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{11} \text{C}_6\text{H}_4 \text{SO}_3^- \text{Na}^+$
	<i>Laurilamina hidrociorada</i>	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{11} \text{NH}_3^+ \text{Cl}^-$
Catiónicos	<i>Cloruro de trimetil dodecil amonio</i>	$\text{C}_{12}\text{H}_{25} \text{N}^+ (\text{CH}_3)_3 \text{Cl}^-$
	<i>Bromuro de trimetil cetil amonio</i>	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{15} \text{N}^+ (\text{CH}_3)_3 \text{Br}^-$
No iónicos	<i>Alcohol polioxietileno</i>	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1} (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m \text{OH}$
	<i>Alquilfenol etoxilato</i>	$\text{C}_9\text{H}_{19} \text{C}_6\text{H}_4 (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n \text{OH}$
	<i>Dodecil betaino</i>	$\text{C}_{12}\text{H}_{25} \text{N}^+ (\text{CH}_3)_2 \text{CH}_2\text{COO}^-$
Zwitteriónicos	<i>Cocoamino-2-hidroxi-propil-sulfobetaino</i>	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1} \text{CONH} (\text{CH}_2)_3 \text{N}^+ (\text{CH}_3)_2 \text{CH}_2\text{CH} (\text{OH}) \text{CH}_2 \text{SO}_3^-$

El componente hidrofílico de un surfactante puede ser iónico o soberanamente polar, permitiéndole así actuar como solubilizante en solventes polares. En general, los principales grupos hidrofílicos presentes en los surfactantes se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Grupos hidrofílicos más frecuentes en los tensoactivos (Sustersick, 2004).

Nombre	Grupo hidrofílico
Sulfonato	$\text{R-SO}_3\text{-M}^+$
Sulfato	$\text{R-OSO}_3\text{-M}^+$
Carboxilato	R-COO-M^+
Fosfato	$\text{R-OPO}_3\text{-M}^+$
Amonio	$\text{R}_x\text{H}_y\text{N}^+\text{X}^-$ ($x= 1-3, y=4-x$)
Amonio cuaternario	$\text{R}_4\text{N}^+\text{X}^-$
Betaínas	$\text{RN}^+(\text{CH}_3)_2 \text{CH}_2\text{COO}^-$
Sulfobetainas	$\text{RN}^+(\text{CH}_3)_2 \text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$
Polioxietileno	$\text{R-OCH}_2 \text{CH}_2 (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n \text{OH}$
Polipéptido	$\text{R-NH-CHR-CO-NH-CHR}'\text{-CO---}$
	CO_2H
Poliol	Sorbitan, glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$), etilenglicol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$)
	$\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CH}_2)_n\text{---}$
Poliglicidil	$\text{R-(OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CH}_2\text{OH)}$

1.2.2 Formación de micelas

En soluciones acuosas, las moléculas anfífilas forman agregados moleculares denominados micelas, debido a que la parte hidrofóbica de la molécula se encubre del área húmeda, por otra parte, la sección hidrofílica permanece exteriorizada en el área húmeda. La creación de micelas en medios acuosos ocurre debido a la inclinación de las cadenas alquílicas para evadir la interacción perjudicial con el agua, mientras que el área polar se mantiene en unión con el entorno acuoso (Yajuan et al., 2019).

Termodinámicamente el proceso de síntesis micelar, contiene la carga del resultado electrostático e hidrofóbico sobre la energía de Gibbs del sistema. El petróleo y el agua por sus características fisicoquímicas no son miscibles entre sí. La energía de Gibbs (ecuación 1) se define como una discrepancia asociada al potencial químico del soluto petróleo en agua y talmente petróleo solvente en una disolución imperecedera.

$$\Delta G_t^\circ = \mu_{\text{HC}}^\circ - \mu_{\text{aq}}^\circ \dots\dots\dots (1)$$

En el cual, μ_{HC}° y μ_{aq}° son los potenciales químicos del petróleo combinado en petróleo solvente y en agua, correspondientemente, y ΔG_t° es la energía de Gibbs para el proceso de mover el petróleo disuelto desde el solvente petróleo con dirección al agua. Por ejemplo, n-alcanos o n-alquenos (serie homóloga de hidrocarburos), el valor de ΔG_t° ordinariamente aumenta conforme a la ecuación 2.

$$\Delta G_t^\circ = (a-bn_c) RT \dots\dots\dots (2)$$

En el que a y b permanecen invariables para una específica serie de hidrocarburos y n_c es el número de átomos de los carbonos contenidos en la cadena. La energía de Gibbs, ΔG_t° , alcanza fragmentar en las cargas de entropías y entalpías (ecuación 3) (Schramm, 2000).

$$\Delta G_t^\circ = \Delta H_t^\circ - T\Delta S_t^\circ \dots\dots\dots (3)$$

En el que ΔS_t° y ΔH_t° son la entropía y la entalpía de traspaso, correspondientemente. Es decir, en los procesos químicos para que la reacción se origine de manera improvisada, el diferencial de la energía libre de Gibbs debe resultar negativo, es decir, la compensación entre los valores de entalpía y entropía deberán ser favorables. Las cargas de entalpía están relacionadas con la energía concerniente en los procesos, esencialmente intermoleculares; en cambio las cargas de entropía están con los datos estadísticos afines con el nivel de arreglo que se encuentra en el sistema, es decir, el total de micro estados que se pudieran correlacionar con una cierta energía.

Al analizar disoluciones, el equilibrio de ambas cargas tiende comúnmente a la separación molecular del soluto disuelto en el solvente. El compuesto tendrá alteraciones de agrupación que posiblemente terminen en una precipitación, todo depende de las circunstancias existentes. Pero, cuando el arreglo químico del soluto tiene dos fracciones con conductas químicas diferentes y el líquido dispersante es buen disolvente para una de las fracciones y malo para la otra se podrá crear micelas debido a la precipitación de una de las fracciones de la molécula frente a la predisposición a la disolución de la otra. Si entrambas fracciones correspondieran a distintas moléculas, se originaría una precipitación de las unidades no solubles, quedando los solubles disueltos. A pesar de, la fuerte presencia de la alianza entre ambas imposibilita que se origine la separación o precipitación selectiva (Schramm, 2000).

Así que las interacciones del fragmento no soluble con el disolvente muestran un equilibrio de energía nocivo, el sistema demorará a una reorganización de las moléculas del medio. Esta reorganización radicará en la unión de los fragmentos no solubles entre sí de tal modo se evitarán los empalmes de ese fragmento con el disolvente, teniendo un decremento del componente desfavorable de la energía, quedando en torno a otra zona generada a partir del material disuelto. Por lo tanto, la superficie estará expuesta con el solvente, esto origina dos fenómenos; el primer efecto es el aislamiento del núcleo central contra el disolvente y el segundo efecto es el incremento de las relaciones del componente disoluble con el solvente, acompañado por una emisión de energía. Como

efecto final, la disolución del agregado en el solvente, sin fragmentarse de partículas mono moleculares, es decir que no consiste en una auténtica dilución, más bien se trata con una dispersión de propiedades especiales. De manera que, el efecto se origina como consecuencia de dos fuerzas contrarias: La entalpía está encaminada hacia la agrupación micelar y la entropía que evita el incremento de micelas hasta la etapa macroscópica (Katime et al., 2003).

1.2.3 La concentración micelar crítica

El valor de la concentración micelar crítica (CMC), se deduce experimentalmente por muchas técnicas donde se calcula la transformación de cualquier propiedad fisicoquímica como la tensión superficial, viscosidad, conductividad, entre otras, (Elizalde et al., 1988). El valor de la concentración micelar crítica lo marca en el cambio del sistema en la variable experimental correspondiente.

La concentración micelar crítica es asociada a parámetros significativos como condiciones de frontera en el proceso de adsorción, la tensión superficial máxima, la concentración superficial del surfactante o biosurfactante se satura hasta un punto crítico en el cual se inicia la formación de micelas.

De acuerdo a la Figura 3 de Katime et al. (2003), muestra que la derivada de la tensión superficial de con relación a $\ln X$ (condiciones de concentraciones) es máxima, además su comportamiento es lineal y se ocasiona aproximadamente a los 20 mN m^{-1} , lo cual muestra que a partir de esta tensión la superficie se haya en sus límites de saturación.

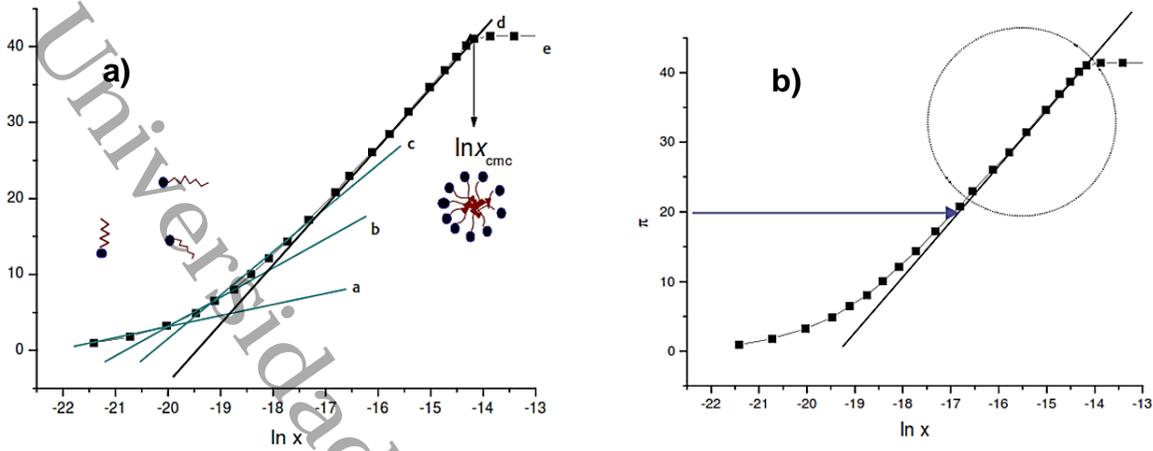


Figura 3. A) Aumento continuo en la pendiente hasta llegar a su máximo; b) Condiciones de concentración expresada en $\ln x$ y de tensión superficial en donde se observa un comportamiento lineal (Katime et al., 2003).

1.2.4 La tensión superficial e interfacial

Los surfactantes de origen químico o biológico son capaces de disminuir la tensión superficial debido a que incomunican la alineación de los puentes de hidrógeno y demás energías implicadas en la afección entre compuestos (Figura 4). La tensión interfacial entre dos líquidos pende de la energía de cohesión entre las moléculas de cada líquido y de la energía de adhesión entre las moléculas de un líquido y el otro, asimismo la tensión interfacial entre dos líquidos es afín a la tensión superficial de cada líquido saturado en el otro (Donahue & Bartell, 1952). Para disminuir la tensión interfacial, los tensoactivos operan como un puente estableciendo así una tercera fase de micro emulsión, lo que beneficia la interacción entre las fases (Ayirala & Rao, 2006).

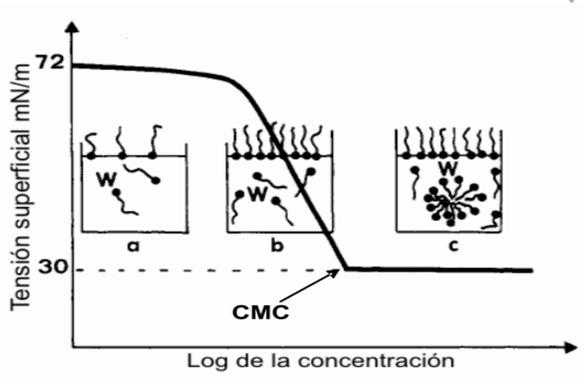


Figura 4. a, b y c muestran la ubicación de las moléculas en la interfase y la formación de micelas a medida que aumenta la concentración de las moléculas (De Gennes & Taupin, 1982).

La tensión superficial e interfacial y la concentración micelar crítica son dependientes del pH, temperatura, concentración de cloruro de sodio y de los demás solutos presentes en el medio acuoso (Ayirala et al., 2006).

En soluciones acuosas, los surfactantes forman micelas que, por su naturaleza anfipática, tienen la capacidad de solubilizar compuestos hidrofóbicos (Bhairi, 2001). Mediante la reducción de la tensión superficial e interfacial, se mejora o incrementa la transferencia de masa de los componentes hidrofóbicos a partir de la fase líquida o sólida no acuosa hacia la fase acuosa, esto debido a la acumulación de los compuestos hidrofóbicos dentro de la micela (Li et al., 2002).

1.3 Biosurfactantes

Los biosurfactantes son moléculas anfifílicas producidas por diferentes microorganismos que tienen la propiedad particular de reducir la tensión superficial e interfacial de las soluciones, así como también de formar emulsiones (Shavandi, 2011). La enorme demanda de los surfactantes en el mercado, principalmente los empleados en la rama del petróleo han incitado un acrecentamiento en la preparación sintética de cuantiosos agentes de superficie químicos. Las actualizaciones en las líneas de investigación del área de biotecnología han desarrollado nuevas técnicas para sintetizar productos (metabolitos secundarios) a mayor nivel industrial y fabricación de cepas microbianas alteradas genéticamente. La inquietud por el ecosistema, garantiza a futuro la implementación de diferentes biosurfactantes en las distintas áreas industriales por sus peculiares características de origen natural (incondicional a los ecosistemas por su poca o nula nocividad), además de tener la peripecia de generar productos mediante fermentación tanto en entornos externos como internos al lugar de origen (Tugrul & Cansunar, 2005).

La mayor parte de los surfactantes microbianos son moléculas complejas, comprenden estructuras que incluyen péptidos, glicolípidos, ácidos grasos y fosfolípidos (Nichke et

al., 2004), aparte de ser capaces de reducir la tensión superficial, numerosos de éstos comprenden un extenso rango de propiedades funcionales como son: separación de fases, actividades superficiales, emulsificaciones, reducción de la viscosidad de lubricantes, entre otras; un sector relevante de la aplicación de biosurfactantes radica en la polimerización y elaboración de pinturas. Así mismo, son generalmente utilizados en la elaboración de hormigones, alquitranes, textiles y en la producción de compuestos fibrosos. Además, tienen usos en el proceso y manejo de las diferentes industrias como la metalurgia, la minera, recursos hídricos, alimentaria, cosmética, productos de limpieza entre otros. En el ámbito agrícola, se emplean como agentes disolventes y dispersantes para abonos y plaguicidas (Sulbarán et al., 2005).

En el ámbito de la industria del petróleo, las aplicaciones abarcan la biorremediación de áreas contaminadas con hidrocarburos, el control y esparcimiento de efusiones de petróleo, la remoción de crudo incrustado en tanques de almacenamiento, la gestión de asfaltenos el transporte y manejo de hidrocarburos, la limpieza y prevención de corrosión al interior de oleoductos y la recuperación avanzada del petróleo crudo.

Los biosurfactantes son sintetizados por diversos grupos de cepas microbianas. Estos agregados en su mayoría, corresponde a metabolitos secundarios liberados por los microorganismos durante la etapa definitiva de su desarrollo (Sulbarán et al., 2005). Poseen una elevada acción de superficie y características emulsificantes. Su función fisiológica radica en mejorar la accesibilidad biológica de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, facilitando su biotransformación y disminuyendo tanto, la tensión superficial como interfacial (Bagheri et al., 2009).

Los microorganismos poseen la habilidad de sintetizar una amplia diversidad de compuestos metabólicos con notables propiedades de superficie. A pesar de ello, su implementación y utilidad ha sido restringidas por elevados costos asociados a su obtención y alto grado de pureza, a diferencia con la fabricación química convencional de tensoactivos (Araujo, 2007). La reducción de los gastos en la generación de

biosurfactantes puede lograrse optimizando la formulación del medio de cultivo con el uso de sustratos económicos asequibles mediante la concepción y ejecución eficiente de biorreactores (Amani et al., 2009). La manufactura internacional de surfactantes en el año 2000 coexistió en 11 millones de toneladas, con un incremento aproximado del 3.5% anual. En el 2004 Specialty surfactants indicó que el territorio de Asia fue el máximo productor de estos químicos con el 45%, siguiendo Europa con un 28% y América con el 22%.

1.3.1 Clasificación y tipos de biosurfactantes que son producidos por los microorganismos

La composición y la estructura química de los biosurfactantes están influenciadas por las condiciones del cultivo, tales como la disponibilidad del carbono y nitrógeno, la presencia de oligoelementos, la temperatura, el nivel de oxígeno y pH. Estos factores generan modificaciones en la estructura molecular, lo que, a su vez, afecta sus propiedades físicas y químicas.

A nivel de la perspectiva química presenta mayor variedad estructural, ostentan una mayor selección y son invariables a temperaturas altas, pH y salinidad (Ojeda et al., 2016).

1.3.1.1 Bajo peso molecular

Los biosurfactantes de bajo peso molecular corresponden a menos de 1500 Da, son colectivamente glicolípidos, donde los hidratos de carbono quedan incorporados a largas cadenas de ácidos alifáticos, o lipopéptidos (Ron & Rosenberg, 2002). Estos biosurfactantes tienen una baja concentración micelar crítica y aumentan la solubilidad aparente de los hidratos de carbono juntándolos en los senos hidrofóbicos de las micelas.

En la Figura 5 se observa la diferenciación de la concentración del petróleo solubilizado en una solución de biosurfactante dependiendo de las concentraciones del metabolito. En función de la concentración micelar crítica, la solubilización crece formidablemente

porque el petróleo se inserta al centro de la micela, esta característica es la que favorece a la solubilización de los compuestos del hidrocarburo, entonces, los biosurfactantes tienen buena aplicación en los procesos de recuperación de petróleo (Salger, 1993).

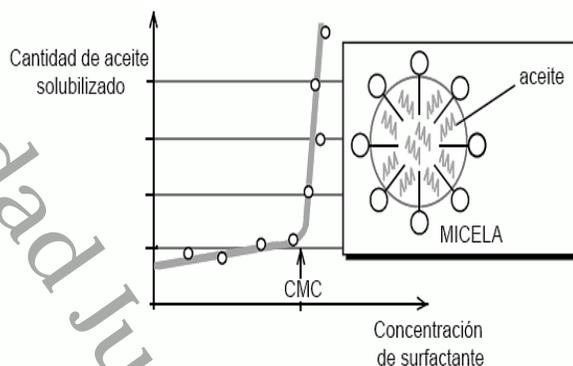


Figura 5. Solubilización micelar (Salger, 1993).

1.3.1.2 Alto peso molecular

Los biosurfactantes con elevado peso molecular están después de los 1500 Da, son compuestos polisacáridos, proteínas, lipopolisacáridos, lipoproteínas, o composiciones complejas de estos biopolímeros. Estos tienen baja efectividad disminuyendo la tensión superficial; pese a, son eficaz al envolver las gotas del petróleo y frenar que éstas se acoplen, por los cuales se consideran excelentes emulsificantes (Ron et al., 2002).

1.3.1.3 Glicolípidos

Se componen de un mono-, di-, tri- y tetrasacáridos, entre los que se encuentran la glucosa, manosa, galactosa, ácido glucurónico, ramnosa y sulfato de galactosa que se encuentran unidos a una cadena alifática o ácidos hidroxialifáticos (Desai et al., 1997).

1.3.1.4 Ramnolípidos

Se componen de uno o dos elementos de ramnosa Enlazadas a una o dos elementos de ácido β -hidroxidecanoico. Diversos cultivos de *Pseudomonas aeruginosa*, *putida*, *chlororaphis* y *Burkholderia sp* han sido utilizados para producir ramnolípidos, logrando

reducir la tensión superficial entre 25 a 30 mN m^{-1} y la tensión interfacial a 1 mN m^{-1} en n-hexano según lo reportado por Suwansukho et al. (2008).

La síntesis de ramnolípidos facilita que las células de microorganismos se adhieran a los hidrocarburos, gracias a una disminución en la tensión superficial, lo que incrementa la disponibilidad de nutrientes para su metabolismo (Raza et al., 2011). A través de cromatografía líquida combinada con espectroscopía de masas, se puede identificar la formación de variedades distintas de ramnolípidos, diferenciándose solo en la longitud de las cadenas de ácidos grasos, que varían entre C_8 a C_{12} , así como en la posición Y el número de insaturaciones (Soberón et al., 2005).

1.3.1.5 Trehalolípidos

Los biosurfactantes están formados por el disacárido trehalosa, el cual se une a los carbonos C_6 y C_6' del ácido micólico. Este tipo de compuestos es producido, en su mayoría, por microorganismos de los géneros *Mycobacterium*, *M. Nocardia* y *M. Corynebacterium* (Desai y Banat, 1997). El ácido micólico se caracteriza por ser una cadena larga de ácidos grasos con ramificación en posición alfa y un grupo hidroxilo en posición beta. Los trehalípidos generados por distintos microorganismos se distinguen especialmente por la longitud y arreglo del ácido micólico, la cantidad de átomos de carbono y el nivel de insaturación (Rahman & Gakpe, 2008).

1.3.1.6 Soforolípidos

Los soforolípidos están formados por el disacárido soforosa, el cual se une a una cadena larga no polar de lípidos carboxílicos que contienen entre 16 y 18 partículas de carbono, con uno o más enlaces saturados. Estos agentes de superficie consisten en una combinación de 6 a 9 tipos distintos de soforósidos (Desai & Banat, 1997). La soforosa es un disacárido de glucosa que presenta una conexión peculiar β -1,2 acetilada. Las levaduras no patógenas como *Torulopsis Magnoliae*, *T. Bombicola*, *T. Petrophilum*, *Candida Apicola* y *C. Bogoriensis* son capaces de sintetizar soforolípidos en altas cantidades (Van Bogaert et al., 2007).

1.3.1.7 Lipopéptidos y lipoproteínas

Se encuentran con una alta diversidad de lipopéptidos cíclicos producidos por diferentes microorganismos como *Bacillus Brevis*, *B. Polymyxa*, *Pseudomonas Rubescens*, *Thiobacillus Thiooxidans*, *Gluconobacter Cerinus*, *Agrobacter Tumefaciens*, etc. (Desai & Banat, 1997).

Diferentes lipopéptidos anticuerpos poseen poderosa acción superficial: la Estreptofactina es un péptido hidrofóbico extracelular con un volumen de 1003 a 1127 Da, las Polimixinas son lipopéptidos anticuerpos constantes, la Viscosina es un lipopéptido que disminuye la tensión superficial (Ron & Rosenberg, 2001).

Mohammad et al. (2008) reportan un lipopéptido cíclico llamado Surfactina producido por *Bacillus Subtilis*, es uno de los mejores y/o poderoso biosurfactante contra los surfactantes de origen químico. La Surfactina presenta una característica anfifílica, con la capacidad de disminuir la tensión superficial del agua de 72 a 29 mN m⁻¹ a una mínima concentración de 0.005%.

1.3.1.8 Ácidos grasos y lípidos neutros

Son producidos por una gran variedad de especies microbianas durante su crecimiento sobre n-alcános. Los ácidos grasos que bajan ampliamente la tensión superficial e interfacial, suelen tener entre 12 y 14 átomos de carbono en su molécula. Entre este grupo de agentes de superficie, se ha identificado que la Fosfatidiletanolamina generada por *Rodococcus Erythropolis* reduce la tensión interfacial entre el hexadecano y el agua a valores inferiores a 1 mN m⁻¹, donde la CMC es de 30 mg L⁻¹ (Desai & Banat, 1997).

1.3.1.9 Poliméricos

Los biosurfactantes poliméricos de mayor demanda o más conocidos son monoptroteínas, liposan, emulsan, además de compuestos de polisacáridos-proteína. La cepa *Acinetobacter Calcoaveticum* produce un eficaz bioemulsificante anfipático de

naturaleza heterosacárida llamada emulsán, que destaca por su notable certeza a concentraciones entre 0.001 a 0.1%. Este agente de superficie se compone de un trisacárido formado por N-acetil-D-galactosamina, ácido urónico N-acetil galactosamina y un azúcar no definido, los cuales se encuentran incorporados a la molécula de un lípido carboxílico por medio de un enlace covalente o éster (Rahman et al., 2008).

1.3.2 Propiedades de los biosurfactantes

La acción de los biosurfactantes frecuentemente corresponde con alteraciones en la tensión superficial de los líquidos, los gradientes de tensión superficial, esto es causado por la existencia molecular de un biosurfactante en las interfases aceite-agua o aire-agua, son definitivos por tensiómetros análogos o digitales (Makkar & Cameotra, 1998).

La concentración micelar crítica es un parámetro característico para cada metabolito. Para valores inferiores a esta concentración, todas las moléculas del metabolito presente en cualquier líquido se encuentran de manera de monómeros situados en la interfase agua-aire, en cambio, en las concentraciones más altas, ciertas moléculas del metabolito se hallan de manera micelar.

En la Figura 6, la molécula del metabolito se representa:

- I. Baja concentración todo el metabolito se encuentra en forma de monómeros.
- II. Alta concentración del metabolito se forman micelas.
- III. Concentraciones mayores o saturadas del metabolito se forman estructuras como arreglos cilíndricos de micelas.
- IV. El modelo físico más aceptado para la micela es el desarrollado por Hartley (1936) y consiste en una configuración esférica con tres fases (Figura 7).

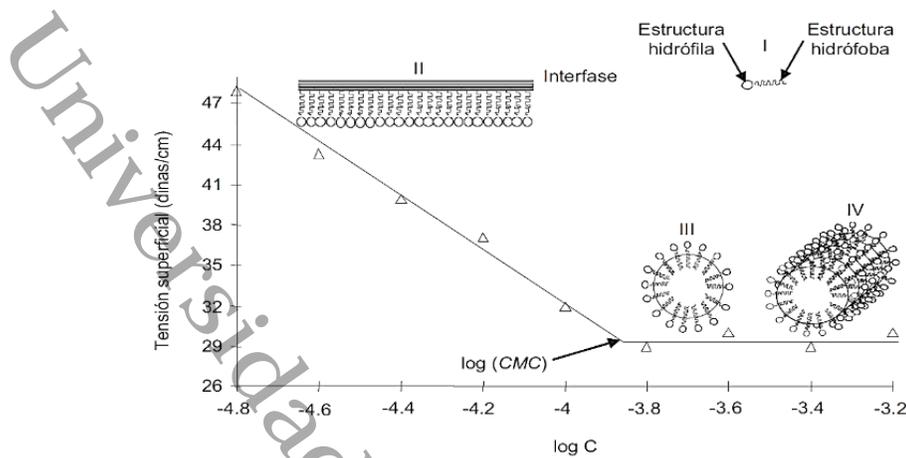


Figura 6. Representación esquemática en el arreglo de las moléculas de biosurfactante alrededor de la CMC (Donaji et al., 2010).

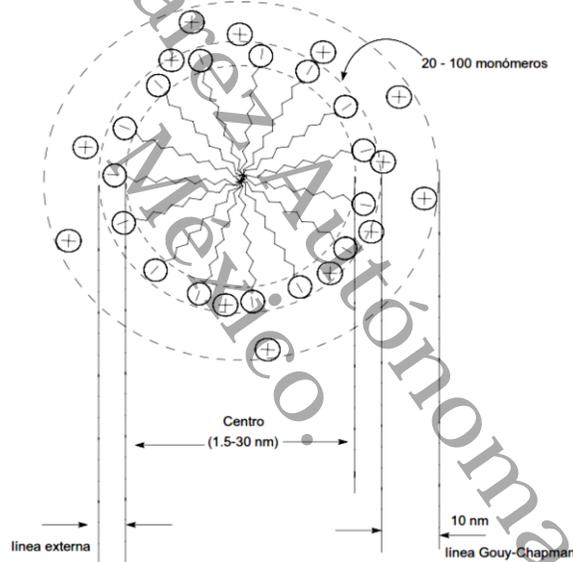


Figura 7. Estructura básica de una micela con base en el modelo de Hartley (Donaji et al., 2010).

1.3.3 Funciones microbianas y microorganismos productores de biosurfactantes

Diferentes especímenes de microorganismos ya sean bacterias, levaduras y hongos, tienen el distintivo privilegio de sintetizar un metabolismo secundario mejor conocido como biosurfactante (Correa et al., 1999). Sin embargo, la mayoría de los biosurfactantes

son producidos por cepas bacterianas. En la tabla 5 se enlistan algunos de los principales biosurfactantes, los microorganismos productores y propiedades características del metabolito.

Tabla 5. Fuente microbiana y propiedades de algunos biosurfactantes de importancia en la industria petrolera (Desai y Banat, 1997).

Biosurfactante	Organismo	Tensión superficial (mN m ⁻¹)	CMC (mg L ⁻¹)	Tensión interfacial (mN m ⁻¹)
Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29	0.1 - 10	0.25
	<i>Pseudomonas sp</i>	25 - 30	0.1- 10	1
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	32 - 36	4	14 - 17
Trehalolípidos	<i>Nocardi erythropolis</i>	30	20	3.5
	<i>Mycobacterium sp</i>	38	0.3	15
	<i>Torulopsis bombicola</i>	33		1.8
Soforolípido	<i>Torulopsis apícola</i>	30		0.9
Lipopéptido	<i>Bacillus licheniformis</i>	27	12 - 20	0.1 - 0.3
Serrawetina	<i>Sewanella marcenscens</i>	28 - 33		
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	26.5	150	
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	27 - 32	23 - 160	1
Ácidos grasos	<i>Corynebacterium lepus</i>	30	150	1

Los microorganismos monopolizan variedades de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía para su desarrollo. Cuando estos sustratos son abruptos por su pobre solubilidad, la competitividad con otros microorganismos u otro tipo de factor ambiental, los microorganismos tienden a utilizar su propio metabolito secundario para poder disponer de la fuente de carbono con mayor facilidad. Las primordiales ocupaciones de los biosurfactantes a nivel orgánico son:

- i. Capacidad de formar emulsiones y solubilizar moléculas insolubles en fases acuosas, como el petróleo crudo e hidrocarburos, de esta manera facilitan la biodisponibilidad de estos sustratos para el crecimiento y mantenimiento de los microorganismos y facilitan el transporte de los hidrocarburos (Zeng et al., 2005).
- ii. Capacidad de los microorganismos para adherirse o desprenderse de superficies es una estrategia clave para su supervivencia. Esto se debe a la presencia de biosurfactantes en la parte externa de su membrana o pared celular, los cuales regulan las propiedades de la superficie celular. Gracias a estos metabolitos, las células pueden fijarse en sitios específicos para obtener nutrientes o

desprenderse para evitar condiciones ambientales adversas (Rosenberg et al., 1989).

- iii. Actividad antibiótica, la que ha sido demostrada por varios biosurfactantes, principalmente los lipopéptidos y glicopéptidos (Lin, 1996).

1.3.4 Producción de biosurfactante

En la producción a gran escala de distintos metabolitos mediante procesos biotecnológicos, la viabilidad económica suele verse afectada por las etapas críticas de biosíntesis o purificación, las cuales representan los principales desafíos en la optimización del proceso.

Para tener un proceso favorable de producción de biosurfactante económicamente competitivo, es recomendable que se den los siguientes factores:

- i. Desarrollo de procesos eficientes, incluida la optimización de las condiciones de cultivo usando sustratos baratos o de desecho para disminuir así los costos del proceso y procesos de separación rentables para la máxima producción y recuperación del metabolito.
- ii. Desarrollo y uso de cepas microbianas sobre productoras, mutantes o recombinantes, para aumentar los rendimientos (Mukherjee et al., 2006).

1.3.5 Ventajas de los usos de biosurfactantes

Los biotensoactivos poseen diversas ventajas con respecto a sus homólogos de origen químico, entre ellas son:

- i. Baja o nula toxicidad: Existen biosurfactantes que a concentraciones de 80 000 ppm empiezan a ser tóxicos mientras que sus homólogos de origen químico a 5 000 ppm son altamente tóxicos.
- ii. Alta biocompatibilidad y biodegradabilidad: Los biotensoactivos pueden interactuar de manera favorable con compuestos en situaciones específicas, sin resultar perjudiciales para la flora y fauna. Esta característica facilita su uso en

productos como cosméticos, medicamentos y suplementos alimentarios. Los biosurfactantes son más fáciles de biodegradar.

- iii. Disponibilidad de insumos: los biotensoactivos se pueden fabricar utilizando materiales de bajo costo o residuos de procesos primarios que se encuentren en abundancia. La disponibilidad del carbono puede derivar de hidrocarburos, lípidos y/o carbohidratos, capaces de emplearse individualmente o de manera combinada.
- iv. Gestión ambiental: los biotensoactivos se emplean de manera efectiva en el tratamiento de emulsiones industriales, la contención de derrames de petróleo crudo e hidrocarburos, la desintegración biológica y eliminación de toxinas de desechos industriales, así como en la biorremediación de suelos afectados negativamente por contaminantes.
- v. Especificidad: los biotensoactivos, al tratarse de partículas orgánicas complejas con grupos funcionales definidos, suelen mostrar especificidad en su acción especialmente en procesos como la depuración o eliminación de tóxicos de contaminantes concretos. También, se emplean en la separación de fases de emulsiones industriales, así como en aplicaciones específicas en industrias cosmética, farmacéutica y alimentaria.
- vi. Eficacia: Los biotensoactivos desempeñan su función incluso bajo condiciones extremas de temperatura, pH, y concentraciones de sales, adaptándose a las mismas condiciones en las que fueron producidas por los organismos.

1.3.6 Aplicaciones de los biosurfactantes

La aplicación práctica de los biosurfactantes en las diferentes industrias está condicionada por los precios de manufactura y características como agentes de superficie en relación a la competencia con los surfactantes (Georgiou et al., 1992). Los biosurfactantes asumen aplicaciones potenciales en áreas ambientales, recuperación de hidrocarburos, sectores agrícolas, farmacéuticos, alimentaria y cosmética.

1.3.6.1 Aplicación en la industria petrolera

En el sector petrolero, los surfactantes han cobrado una importancia significativa en las etapas de perforación, producción y refinamiento del crudo, ya que esta industria afronta desafíos relacionados con los procesos interfaciales a lo largo de todo el procesamiento, desde las operaciones iniciales de perforación hasta la producción de los bienes terminados.

Cabe destacar que una de las aplicaciones relevantes de los biosurfactantes es la creación de emulsiones estables de crudos pesados en agua, es decir, aceite en agua O/W. Las cuales están destinadas a facilitar la extracción, el transporte y el almacenamiento del crudo. Este tipo de emulsiones representa una opción a los métodos tradicionales como la dilución con crudos ligeros o gasóleos o el calentamiento de ellos, los cuales conllevan elevados costos tanto de inversión como operativos. No obstante, es crucial considerar la calidad de emulsión que los biotensoactivos puede generar, ya que en algunos casos el producto final debe cumplir con ciertos estándares de calidad, específicamente en relación al contenido de agua. De acuerdo con la norma ASTM-4006, este contenido no debe superar el 2% en el petróleo crudo.

En los últimos años, el uso de surfactantes no-iónicos y aniónicos ha sido clave para la emulsificación del crudo en agua. Los surfactantes no-iónicos presentan la ventaja de ser prácticamente insensibles a la salinidad del agua, mientras que los aniónicos destacan por reducir aún más la tensión interfacial petróleo/agua y ofrecer un menor costo. En las formulaciones comerciales, además de los surfactantes o sus combinaciones, se incorporan otros compuestos como co-surfactantes, álcalis y polímeros que pueden modificar las características del sistema. Recientemente, se ha estudiado el papel de las aminas de cadena corta en la estabilización de emulsiones de crudo en agua (Delgado et al., 2007).

1.3.6.2 Recuperación Mejorada de Hidrocarburo

En el campo de la investigación, han sido creado numerosos métodos para la recuperación mejorada de hidrocarburo conocida como EOR por sus siglas en inglés. Estos métodos están diseñados para aplicarse en yacimientos que ya están maduros o agotados. Clasificados como técnicas de recuperación terciaria, permiten optimizar la extracción de hidrocarburos en comparación con los métodos primarios y secundarios (Satter & Iqbal, 2016).

Los métodos de recuperación mejorada de hidrocarburo incluyen la inyección de fluidos como gases inertes, vapor de agua o simplemente agua en los yacimientos. Este proceso aporta energía adicional al reservorio, facilitando el desplazamiento de los hidrocarburos residuales atrapados. Además, los fluidos inyectados pueden interactuar con el sistema roca-hidrocarburo (donde el hidrocarburo se encuentra atrapado en las rocas porosas), generando ambientes que favorecen su extracción. Estos procesos están vinculados a procedimientos de tipo físico, químico o biológico, los cuales contribuyen a reducir la tensión superficial e interfacial, disminuir la viscosidad y modificar la mojabilidad de las rocas (Emegwalu, 2009).

Los procesos de recuperación mejorada de hidrocarburo son catalogados en cuatro subprocesos los cuales son: térmico, solvente, químico y microbiológico. La Tabla 6 presenta una categorización y los efectos de diversos subprocesos utilizados en la recuperación mejorada de hidrocarburos. Estos subprocesos están principalmente orientados a aumentar el coeficiente capilar y/o reducir el factor de movilidad, en comparación con los valores correspondientes al agua de inyección. Dicho aumento implica una reducción en la tensión interfacial entre el agua utilizada para el desplazamiento y el hidrocarburo, mientras que la modificación del factor de movilidad puede incrementar la viscosidad del agua y disminuir la del hidrocarburo (Lake & Walsh, 2008).

Tabla 6. Clasificación y efecto de los diferentes subprocesos, empleados en recuperación mejorada.

Subproceso	Tipo de fluido	Efecto en mecanismo	Recuperación alcanzada en %
Térmico	Vapor	Reduce viscosidad Vaporiza ligeros	5 - 40
	Agua caliente	Reduce viscosidad	5 - 10
	Combustión	Reduce viscosidad Vaporiza ligeros	10 - 15
	Hidrocarburo miscible	Desarrolla miscibilidad	5 - 10
CO ₂ miscible	Desarrolla miscibilidad		
CO ₂ inmisible	Hinchamiento de aceite		
Solvente	N ₂	Mejora movilidad, disuelve gas	5 - 15
	Aire		
	Gas de combustión		
	Polimérico		
Químico	Surfactante	Mejora movilidad Mejora movilidad, reduce tensión superficial	5 15
	Álcalis	Mejora movilidad, reduce tensión superficial, altera mojabilidad	5
Microbiológico	Biosurfactante	Reduce tensión superficial e interfacial	7 - 30
	Biopolímeros	Obstrucción del medio poroso, producción de CO ₂ , alcoholes y ácidos	

1.3.6.3 Recuperación Mejorada de Hidrocarburo vía Microbiana

En la actualidad la investigación apunta la utilización de microorganismos dentro de los procesos de Recuperación Mejorada de Hidrocarburo vía Microbiana denominado Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR por sus siglas en inglés). El método más común implica la introducción directa de microorganismos en el reservorio mediante inyección, acompañada de nutrientes inorgánicos y sustratos que funcionan como fuentes de carbono. Este enfoque tiene como objetivo fomentar el desarrollo microbiano y la generación de metabolitos (Geetha et al., 2018). Por otro lado, un segundo método consiste en aislar cepas microbianas capaces de producir biosurfactantes, optimizar su producción en condiciones controladas de laboratorio y, posteriormente, inyectarlos en los reservorios (Figura 8). Este procedimiento busca reducir la tensión interfacial entre el hidrocarburo y el agua congénita, facilitando la extracción del hidrocarburo residual

(Youssef et al., 2007). Además, estas moléculas tienen la ventaja de incrementar la biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos, que pueden ser degradados por microorganismos autóctonos en las áreas cercanas al reservorio. Los análisis a nivel de laboratorio contienen estudios de curvas de crecimiento microbiano, modificaciones en la composición del hidrocarburo y la caracterización fisicoquímica de los metabolitos obtenidos (Dejun et al., 1999).



Figura 8. Principio de los métodos de recuperación mejorada por inyección (Rodríguez, 2024).

La implementación de inyección de microorganismos o sus metabolitos en los diferentes reservorios de varios países productores de hidrocarburos han mostrado de manera exitosa que favorecen la recuperación del petróleo remanente, asimismo, no interfieren en la etapa de refinamiento del petróleo crudo (Hitzman & Dennis, 2004).

En México se han implementado técnicas de Microbial Enhanced Oil Recovery en la agrupación de 29 pozos petroleros en la zona de Chicontepec, los cuales se encuentran localizados en el Golfo de México (zona costera de plataformas), mejor conocida como la faja de oro. Esta cuenta con un área en kilómetros cuadrados de 3 815, rayando con los estados de Veracruz, Puebla e Hidalgo (Figura 9). El Plan Activo Aceite Terciario del Golfo tienen una gran importancia para México, debido a su 39% lo que representa una cifra importante en la reserva total de hidrocarburos del país, que refleja un 17.7 Mdb de petróleo crudo equivalente. Durante el primer trimestre de 2010, Pemex registró una

producción total de 2.6 Mdb de petróleo crudo, lo que representó un aumento del 2.2% versus el año 2019 (Pemex, 2011).

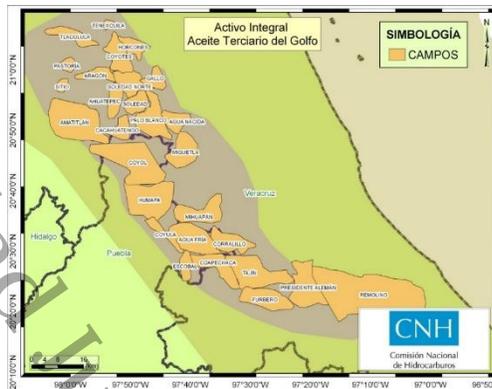


Figura 9. Mapa de la ubicación de los 29 campos petroleros correspondientes al Activo Aceite Terciario del Golfo (CNH-SENER,

1.3.6.4 Proceso de producción y refinación de los hidrocarburos

Tanto en producción como en refinación se aplican mayormente surfactantes catiónicos (aminas grasas, imidazolinias y alquil amonio cuaternarios), los metabolitos se aplican como inhibidores de corrosión (Figura 10). Cuando el ácido sulfhídrico está presente en un medio acuoso, los equilibrios de disociación pueden alterarse si los iones H^+ son consumidos. En este proceso, los iones HS^- se adsorben sobre la superficie metálica, generando una carga negativa que favorece la adsorción de protones. A medida que los protones se reducen, se forma el ion metálico, lo que da lugar a un proceso de corrosión debido al transporte de iones en la fase acuosa.

Cuando los surfactantes catiónicos se adsorben sobre superficies metálicas, forman una capa hidrófoba que minimiza la interacción entre la pared y los protones hidratados. Esto reduce significativamente el riesgo de contacto directo y proporciona una barrera protectora contra la corrosión (Salager, 1991).

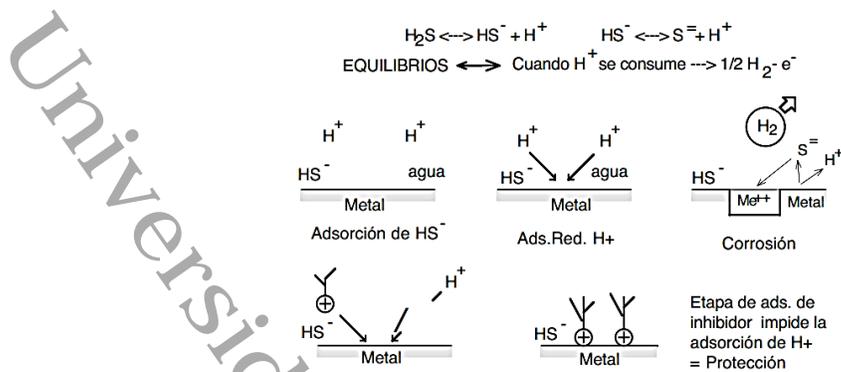


Figura 10. Corrosión en medio sulfhídrico e inhibición por adsorción de surfactantes catiónicos (Salager,

Los depósitos de escamas pueden prevenirse mediante el uso de organofosforados, mientras que los acumulados de parafina se eliminan con agentes dispersantes, como los alquilfenoles etoxilados. En ambos casos, los surfactantes desempeñan un papel clave al actuar como agentes dispersantes, antinucleación y antidepósito, ayudando a mantener la estabilidad del sistema. Otra aplicación importante es en la producción de emulsiones aceites en agua por sus siglas en inglés O/W de crudos pesados y extrapesados. Estos hidrocarburos de bajos °API son considerablemente viscosos (10^5 cp) las únicas opciones simples de movimiento y acaparamiento de los crudos pesados y extrapesados consisten en métodos térmicos o químicos, estos métodos implican grandes costos de inversión por esta razón la aplicación de surfactantes para formar emulsión O/W de baja viscosidad lo cual permita su bombeo, transporte y almacenamiento a un bajo costo. Sin embargo, el problema no es simple, porque las emulsiones deben ser estables al momento del transporte sobre los oleoductos y al almacenarlos, pero también deben tener la cualidad de romperse fácilmente más adelante si se requiere la separación del crudo del agua (Salager, 1991).

En las gasolinas se incorporan surfactantes debido a sus propiedades detergentes, dispersantes y su capacidad para inhibir la corrosión. Su acción contribuye a mantener la limpieza del sistema de combustión y prevenir la acumulación de residuos no deseados.

Las figuras 11 y 12 presentan esquemáticamente cómo estos compuestos actúan como detergentes y solubilizantes en medios no polares, favoreciendo la estabilidad y eficacia del combustible.

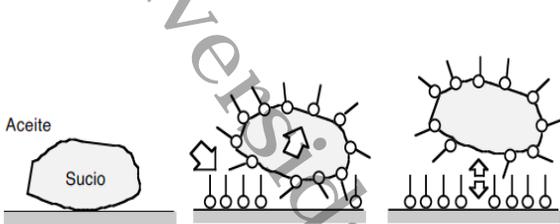


Figura 12. Acción detergente en medio no polar (Salager, 1991).

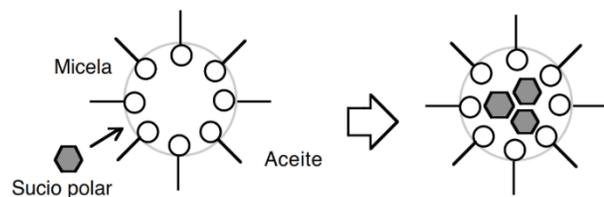


Figura 11. Solubilización micelar de una sustancia polar en medio no polar (Salager, 1991).

Los aditivos antidepósito incluyen detergentes y dispersantes, los cuales previenen la acumulación de residuos en el sistema de inyección, válvulas y agujas. Además, ayudan a reducir la formación de resinas y óxido de zinc en las superficies expuestas a la gasolina. La mayoría de estos compuestos están diseñados para quemarse sin generar cenizas, evitando problemas en el funcionamiento del motor.

Los aditivos para gasolina contienen distintos tipos de surfactantes, tanto no iónicos con carácter catiónico—como alquil diaminas, alquil succinimidias de dietilén triamina, alquil aminas fenólicas y alquil imidazolinias—como iónicos, entre los que destacan sales de ácidos carboxílicos, alquil sulfónicos y fosfóricos. También se emplean derivados polimerizados con grupos amino o amido, los cuales contribuyen a mejorar la estabilidad del combustible y optimizar el desempeño del sistema (Salager, 1991).

En los aceites lubricantes para motores de combustión interna se aplican surfactantes con acción detergentes del tipo sulfonatos de petróleo, alquil fenolatos o alquil salicilatos de metales divalentes como bario, calcio y magnesio, al quemarse, estas sustancias no generan cenizas y, además, retrasan la liberación de carbón y óxido de zinc al adsorberse en las superficies metálicas del motor. También funcionan como agentes secuestrantes en micelas inversas formadas por emulsiones derivadas de la combustión. Gracias a su acción, es posible incorporar al aceite lubricante sustancias alcalinas

polares, las cuales contrarrestan la acidez de los subproductos generados en la combustión. Los aceites lubricantes incluyen agentes dispersantes que mantienen en suspensión las partículas finas de carbón y calamina, evitando su acumulación y depósito. Estas partículas son las responsables del ennegrecimiento del aceite.

Los dispersantes más utilizados en estos sistemas son surfactantes poliméricos, como copolímeros de metacrilato con vinil piridina o metil vinil pirrolidona, así como copolímeros oxidados de etileno y propileno neutralizados con poliamina. Para reducir la viscosidad de los aceites lubricantes con respecto a la variación de temperatura se utilizan surfactantes poliméricos como el polibutano-anillas (Salager, 1991).

Las grasas lubricantes son, en esencia, aceites lubricantes que han sido gelificados con surfactantes, como los jabones de litio, sodio, calcio y aluminio, o con polímeros de urea. En el caso de las grasas fibrosas, estas contienen cristales líquidos y polímeros, lo que influye en sus propiedades estructurales. Algunas grasas incluyen sólidos coloidales suspendidos, como el sulfuro de molibdeno, cuya dispersión es facilitada por surfactantes iónicos lipofílicos.

Por otro lado, en la industria cosmética y farmacéutica se emplean geles de aceites de parafina purificados, los cuales pueden contener cantidades variables de agua y aceite atrapadas en una red tridimensional con estructura de cristal líquido (Salager, 1991).

1.3.6.5 Biorremediación

La biorremediación es un proceso mediante el cual los desechos orgánicos son eliminados o degradados biológicamente bajo condiciones controladas, hasta alcanzar un estado seguro o reducirse a concentraciones dentro de los límites establecidos por las autoridades reguladoras (Vidali, 2001).

La biodegradación de un compuesto suele ser el resultado de la interacción entre diversos microorganismos, cuya eficiencia depende de las condiciones ambientales, ya

que su crecimiento y actividad enzimática deben ser adecuados para el proceso. Para acelerar la degradación, es común manipular ciertos parámetros, como la agitación, el tamaño del inóculo, la temperatura de crecimiento y la relación carbono-nitrógeno, entre otros (Vidali, 2001).

El método específico para implementar la biorremediación depende principalmente del costo del tratamiento (Kosaric, 2001). En la Tabla 7 se comparan diferentes procedimientos en función de su relación costo-beneficio.

Tabla 7. Costos del tratamiento de suelos contaminados (Cameotra & Bollag, 2003).

Tratamiento	\$ USA / Ton
Depósito	140 – 200
Incineración	150 – 140
Estabilización / fijación	100 – 200
Biorremediación	15 – 70

Tang et al. (2007) llevaron a cabo un proceso de biodegradación de petróleo crudo, en el cual observaron una reducción de la tensión superficial de 50 a 35 mN·m⁻¹ en un lapso de 24 horas. La disminución continuó hasta alcanzar su mínimo valor de 32 mN·m⁻¹ a las 96 horas, logrando una biodegradación del 60% del compuesto.

Investigaciones han demostrado que el empleo de biosurfactantes en suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos mejora la biodisponibilidad y mineralización de estos compuestos, incluidos el naftaleno y el fenantreno (Deziel et al., 1996). Además, los biosurfactantes se utilizan en la biodegradación de pesticidas y en la remoción de metales, aunque este ámbito aún no ha sido ampliamente explorado. En el caso específico de los pesticidas, la mayor parte de los estudios se centran en compuestos organoclorados, como el Dicloro-Difenil-Triclohexano (DDT) y los isómeros del Hexa-Clorociclo-Hexano (HCH) (Karanth et al., 2000).

2.1 JUSTIFICACIÓN

La justificación de esta investigación radica en la necesidad de encontrar alternativas sostenibles para la recuperación de petróleo en yacimientos maduros y agotados. México, como uno de los principales productores de petróleo a nivel mundial, enfrenta el reto de maximizar la extracción de hidrocarburos de sus reservas existentes sin comprometer el medio ambiente ni generar costos excesivos.

El uso de técnicas convencionales de recuperación de petróleo ha demostrado ser insuficiente para extraer el crudo remanente de los yacimientos, especialmente en la fase terciaria, donde las tecnologías tradicionales son costosas y poco eficientes en ciertos escenarios. En este contexto, la implementación de biosurfactantes sintetizados por microorganismos representa una solución innovadora, ya que pueden mejorar la recuperación de petróleo al reducir la tensión superficial entre el petróleo y el agua, aumentando la movilidad del hidrocarburo atrapado en los poros de la roca.

Además, los biosurfactantes presentan ventajas clave sobre los surfactantes químicos: son biodegradables, no tóxicos y resistentes a condiciones extremas como alta salinidad, lo que los convierte en una opción más ecológica y económicamente viable. Dado que su producción no depende del petróleo, su costo es independiente de las fluctuaciones del mercado petrolero, lo que otorga estabilidad a la industria.

Por ello, la investigación sobre la capacidad de microorganismos autóctonos para generar biosurfactantes y su aplicación en la recuperación mejorada de petróleo (MEOR) es crucial para garantizar una explotación más eficiente y sostenible de los recursos energéticos del país. Con esta tecnología, México puede fortalecer su industria petrolera al adoptar métodos más amigables con el medio ambiente, prolongar la vida útil de sus yacimientos y disminuir la dependencia de métodos convencionales de extracción.

2.2 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Cuáles son las principales características fisicoquímicas de los biosurfactantes producidos por microorganismos provenientes de agua congénita?
- ¿Qué tipos de microorganismos se han identificado como productores de biosurfactantes en agua congénita?
- ¿Cuáles son las condiciones óptimas para la producción de biosurfactantes por microorganismos provenientes de agua congénita?

2.3 HIPÓTESIS

Microrganismos de agua congénita producen biosurfactante que reducen la tensión superficial del agua y tienen aplicaciones industriales.

2.4 OBJETIVO GENERAL

Obtener y caracterizar fisicoquímicamente biosurfactantes sintetizados por microorganismos aislados de agua congénita, para evaluar su aplicación industrial.

2.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar fisicoquímicamente la muestra de agua congénita.
- Obtener en condiciones *in vitro* cepas microbianas autóctonas, con capacidad de sintetizar biosurfactante.
- Obtener un fertilizante comercial como fuente de crecimiento microbiano.
- Realizar prueba petrofílica a las cepas microbianas.
- Obtener y purificar biosurfactante de cada cepa microbiana.
- Realizar análisis fisicoquímicos a cada biosurfactante.

3. METODOLOGÍA

En este capítulo se describe el desarrollo de esta investigación la cual consistió en tres etapas. En la primera etapa se realizó el muestreo y caracterización fisicoquímicos del agua congénita proveniente en las instalaciones de PEMEX exploración y producción ubicada en la región suroeste de México en el municipio de Centro, Tabasco. La segunda etapa consistió en aislar y purificar en condiciones axénicas los microorganismos hallados en el agua congénita, a cada microorganismo encontrado se le realizaron pruebas petrofílica en medio mineral sólido. La curva de crecimiento microbiano se graficó de las mejores cepas microbianas crecidas en tres diferentes fertilizantes como medio mineral líquido. Posteriormente se ejecutó una prueba petrofílica donde se demostró una degradación significativa de petróleo crudo de un suelo contaminado con petróleo crudo. La tercera etapa consistió en la inoculación de las mejores cepas microbianas en condiciones axénicas en biorreactores para la producción de biosurfactantes, de ahí se continuo con la caracterización fisicoquímica de cada biosurfactante. Los análisis realizados a cada biosurfactante y todos los procedimientos que se realizaron en la presente investigación se llevaron a cabo en un medio controlado y a una temperatura ambiente de 30 °C.

3.1. Ubicación del área de muestro

El sitio de muestreo se ubicó en las instalaciones de Petróleos Mexicanos en el área de exploración y producción en la región suroeste de México en la ciudad de Villahermosa, municipio Centro, Tabasco, México (Figura 16).



Figura 13. Complejo de PEMEX (Datos del mapa © 2019 INEGI).

3.2 Muestreo de agua y análisis fisicoquímico

Una muestra compuesta de agua congénita se recolectó de un equipo llamado deshidratador el cual capta todo el producto que sale de todos los pozos petroleros del sitio adyacente a la extracción de petróleo crudo. La muestra se guardó en un frasco de vidrio color ambar, este fue etiquetado y resguardado a 4 °C. El muestreo se realizó de acuerdo a la Norma Mexicana (NOM-143-SEMARNAT-2003). Para el análisis fisicoquímicos a nivel laboratorio de acuerdo a la NMX-EC-17025-IMNC-2006 de calidad y ensayos en cumplimiento de la NOM-001-SEMARNAT-1996 de límites máximos permisibles de contaminantes en aguas residuales.

3.3 Análisis físicos

3.3.1 Análisis para la determinación de la turbidez de acuerdo a la norma NMX-AA-038-SCFI-2001.

Se ocupó un equipo de la marca HANNA modelo HI 93414

La norma NMX-AA-038-SCFI-2001 es una especificación mexicana para la determinación de turbidez en agua, establecida por la Dirección General de Normas (DGN) de México. A continuación, se presenta un análisis detallado para la determinación de turbidez según esta norma:

Objetivo: Determinar la turbidez en agua mediante el método de nefelometría.

Método: Nefelometría con instrumento de medición de turbidez.

Equipo y materiales:

1. Nefelómetro
2. Estándar de turbidez (solución de fornacina)
3. Cubetas de medición
4. Agua de muestra

Procedimiento:

1. Calibrar el nefelómetro con el estándar de turbidez.

2. Preparar la muestra de agua.
3. Introducir la muestra en la cubeta de medición.
4. Medir la turbidez con el nefelómetro.
5. Registrar el resultado.

Cálculos: No se requieren cálculos adicionales, ya que el nefelómetro proporciona la lectura directa de turbidez.

Unidades de medida: La turbidez se expresa en Unidades Nefelométricas de Turbidez (UNT).

Interpretación de resultados: La turbidez se clasifica de acuerdo a la siguiente escala: Baja turbidez: < 1 UNT; Moderada turbidez: 1-5 UNT; Alta turbidez: 5-20 UNT; Muy alta turbidez: > 20 UNT.

3.3.2 Análisis para la determinación de la conductividad eléctrica de acuerdo a la norma NMX-AA-093-SCFI-2000.

La norma NMX-AA-093-SCFI-2000 es una especificación mexicana para la determinación de la conductividad eléctrica en agua, establecida por la Dirección General de Normas (DGN) de México. A continuación, se presenta un análisis detallado para la determinación de conductividad eléctrica según esta norma:

Objetivo: Determinar la conductividad eléctrica en agua mediante el método de conductimetría.

Método: Conductimetría con instrumento de medición de conductividad.

Equipo y materiales:

1. Conductímetro
2. Electrodo de platino
3. Cubetas de medición
4. Agua de muestra

5. Estándar de conductividad (solución de KCl)

Procedimiento:

1. Calibrar el conductímetro con el estándar de conductividad.
2. Preparar la muestra de agua.
3. Introducir la muestra en la cubeta de medición.
4. Medir la conductividad con el conductímetro.
5. Registrar el resultado.

Cálculos: No se requieren cálculos adicionales, ya que el conductímetro proporciona la lectura directa de conductividad.

Unidades de medida: La conductividad eléctrica se expresa en microSiemens por centímetro ($\mu\text{S cm}^{-1}$).

Interpretación de resultados: La conductividad eléctrica se clasifica de acuerdo a la siguiente escala en unidades $\mu\text{S cm}^{-1}$: Baja conductividad: < 100 ; Moderada conductividad: $100-500$; Alta conductividad: $500-1000$ y Muy alta conductividad: > 1000 .

3.3.3 Análisis para la determinación de sólidos totales y sólidos disueltos totales de acuerdo a la norma NMX-AA-034-SCFI-2015.

La norma NMX-AA-034-SCFI-2015 es una especificación mexicana para la determinación de sólidos totales y sólidos disueltos totales en agua, establecida por la Dirección General de Normas (DGN) de México. A continuación, se presenta un análisis detallado para la determinación de sólidos totales y sólidos disueltos totales según esta norma:

Sólidos Totales

Objetivo: Determinar la cantidad de sólidos totales en agua.

Método: Secado en estufa a 105°C .

Equipo y materiales:

1. Estufa
2. Cruceta de porcelana
3. Pesa exacta
4. Agua de muestra

Procedimiento:

1. Tomar 100 mL de agua de muestra.
2. Verter la muestra en la cruceta de porcelana.
3. Secar en estufa a 105°C durante 24 horas.
4. Enfriar y pesar la cruceta.
5. Calcular la cantidad de sólidos totales.

Cálculos: Sólidos totales (mg L^{-1}) = $(\text{Peso final} - \text{Peso inicial}) \times 1000 / \text{Volumen de muestra}$

Unidades de medida: Los Sólidos totales y los Sólidos Disueltos Totales se expresa en miligramos por litro (mg L^{-1}).

Sólidos Disueltos Totales

Objetivo: Determinar la cantidad de sólidos disueltos totales en agua.

Método: Filtración y secado en estufa a 105°C.

Equipo y materiales:

1. Filtro de 0.45 μm
2. Estufa
3. Cruceta de porcelana
4. Pesa exacta
5. Agua de muestra

Procedimiento:

1. Tomar 100 mL de agua de muestra.
2. Filtrar la muestra a través del filtro de 0.45 μm .
3. Verter el líquido filtrado en la cruceta de porcelana.
4. Secar en estufa a 105°C durante 24 horas.
5. Enfriar y pesar la cruceta.
6. Calcular la cantidad de sólidos disueltos totales.

Cálculos: Sólidos disueltos totales (mg L^{-1}) = (Peso final - Peso inicial) x 1000 / Volumen de muestra.

Interpretación de resultados: Los resultados se clasifican de acuerdo a la siguiente escala en unidades mg L^{-1} :

Sólidos totales: Bajo: < 100; Moderado: 100-500; Alto: 500-1000 y Muy alto: > 1000.

Sólidos disueltos totales: Bajo: < 50; Moderado: 50-200; Alto: 200-500 y Muy alto: > 500.

3.4 Análisis químicos

3.4.1 Análisis para la determinación de alcalinidad de acuerdo a la norma NMX-AA-036-SCFI-2001.

La norma NMX-AA-036-SCFI-2001 es una especificación mexicana para la determinación de alcalinidad en agua, establecida por la Dirección General de Normas (DGN) de México. A continuación, se presenta un análisis detallado para la determinación de alcalinidad según esta norma:

Objetivo: Determinar la alcalinidad total en agua mediante la titulación con ácido clorhídrico (HCl).

Método: Titulación potenciométrica con pH-metro.

Equipo y materiales:

1. pH-metro
2. Electrodo de vidrio
3. Solución de ácido clorhídrico (HCl) 0.01 N

4. Solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 0.01 N (para calibración)
5. Agua de muestra

Procedimiento:

1. Calibrar el pH-metro con soluciones de pH conocidas.
2. Preparar la solución de ácido clorhídrico (HCl) 0.01 N.
3. Tomar 100 mL de agua de muestra y agregar de 2 a 3 gotas de indicador de pH (p. ej., fenolftaleína).
4. Titular la muestra con ácido clorhídrico (HCl) 0.01 N hasta alcanzar un pH de 8.3.
5. Registrar el volumen de ácido clorhídrico (HCl) utilizado.

Cálculos:

$$1. \text{Alcalinidad total (mg L}^{-1} \text{ de CaCO}_3) = (V \times N \times 50,000) / V_m$$

Donde: V = Volumen de ácido clorhídrico (HCl) utilizado (mL); N = Normalidad del ácido clorhídrico (HCl) (0.01 N) y V_m = Volumen de muestra (100 mL).

Unidades de medida: La alcalinidad total se expresa en miligramos por litro de Carbonato de Calcio (mg L^{-1} de CaCO_3).

Interpretación de resultados: La alcalinidad total se expresa en mg L^{-1} de CaCO_3 . Los resultados se clasifican de acuerdo a la siguiente escala: Baja alcalinidad: < 30; Moderada alcalinidad: 30-100; Alta alcalinidad: 100-200 y Muy alta alcalinidad: > 200.

3.4.2 Análisis para la determinación de grasas y aceites de acuerdo a la norma NMX-AA-005-SCFI-2013.

La norma NMX-AA-005-SCFI-2013 es una especificación mexicana para la determinación de grasas y aceites en agua, establecida por la Dirección General de Normas (DGN) de México. A continuación, se presenta un análisis detallado para la determinación de grasas y aceites según esta norma:

Objetivo: Determinar la cantidad de grasas y aceites en agua.

Método: Extracción con solvente orgánico y medición gravimétrica.

Equipo y materiales:

1. Equipo de extracción (separador de fases)
2. Solvente orgánico (hexano o metanol)
3. Papel de filtro
4. Pesa exacta
5. Agua de muestra

Procedimiento:

1. Tomar 100 mL de agua de muestra.
2. Agregar solvente orgánico y mezclar bien.
3. Dejar reposar durante 30 minutos.
4. Separar las fases y recoger la fase orgánica.
5. Filtrar la fase orgánica a través de papel de filtro.
6. Evaporar el solvente orgánico.
7. Pesar el residuo.

Cálculos: Grasas y aceites (mg L^{-1}) = (Peso del residuo / Volumen de muestra) x 1000

Unidades de medida: Grasa y aceites se expresa en miligramos por litro (mg L^{-1}).

Interpretación de resultados en unidades mg L^{-1} : Los resultados se clasifican de acuerdo a la siguiente escala: Bajo: < 1; Moderado: 1-10; Alto: 10-50 y Muy alto: > 50.

3.4.3 Determinación del potencial de hidrógeno de acuerdo a la norma NMX-AA-008-SCFI-2011.

La norma NMX-AA-008-SCFI-2011 es una especificación mexicana para la determinación del potencial de hidrógeno (pH) en agua, establecida por la Dirección

General de Normas (DGN) de México. A continuación, se presenta un análisis detallado para la determinación del pH según esta norma:

Objetivo: Determinar el potencial de hidrógeno (pH) en agua.

Método: Medición electrométrica con pH-metro.

Equipo y materiales:

1. pH-metro
2. Electrodo de vidrio
3. Electrodo de referencia (Ag/AgCl)
4. Solución de calibración (pH 4, 7 y 10)
5. Agua de muestra

Procedimiento:

1. Calibrar el pH-metro con soluciones de calibración.
2. Preparar la muestra de agua.
3. Introducir el electrodo de vidrio y el electrodo de referencia en la muestra.
4. Medir el pH con el pH-metro.
5. Registrar el resultado.

Cálculos: No se requieren cálculos adicionales, ya que el pH-metro proporciona la lectura directa del pH.

Unidades de medida: El pH se expresa en unidades de pH (0-14).

Interpretación de resultados: Los resultados se clasifican de acuerdo a la siguiente escala: Ácido: $\text{pH} < 7$; Neutro: $\text{pH} = 7$ y Básico: $\text{pH} > 7$

Niveles de pH en agua: Agua potable: $\text{pH} 6.5-8.5$; Agua residual: $\text{pH} 6-9$ y Agua superficial: $\text{pH} 6-9$

3.4.4 Análisis para la determinación de cloruros totales de acuerdo a la norma NMX-AA-073-SCFI-2001.

La norma NMX-AA-073-SCFI-2001 es una especificación mexicana para la determinación de cloruros totales en agua, establecida por la Dirección General de Normas (DGN) de México. A continuación, se presenta un análisis detallado para la determinación de cloruros totales según esta norma:

Objetivo: Determinar la cantidad de cloruros totales en agua.

Método: Titulación con nitrato de plata (AgNO_3).

Equipo y materiales:

1. Bureta
2. Pipeta
3. Vaso de precipitación
4. Solución de nitrato de plata (AgNO_3) 0.01 N
5. Solución de cloruro de sodio (NaCl) 0.01 N (para calibración)
6. Agua de muestra
7. Indicador de bromocresol verde

Procedimiento:

1. Preparar la solución de nitrato de plata (AgNO_3) 0.01 N.
2. Calibrar la bureta con solución de cloruro de sodio (NaCl) 0.01 N.
3. Tomar 100 mL de agua de muestra.
4. Agregar 5 mL de indicador de bromocresol verde.
5. Titular la muestra con solución de nitrato de plata (AgNO_3) hasta que cambie el color del indicador.
6. Registrar el volumen de solución de nitrato de plata (AgNO_3) utilizado.

Cálculos: Cloruros totales (mg L^{-1}) = $(V \times N \times 35.45) / V_m$. Donde: V = Volumen de solución de nitrato de plata (AgNO_3) utilizado (mL); N = Normalidad de la solución de

nitrate de plata (AgNO_3) (0.01 N); V_m = Volumen de muestra (100 mL) y 35.45 = Peso molecular del cloruro de sodio (NaCl).

Unidades de medida: Los cloruros totales se expresan en miligramos por litro (mg L^{-1}).

Niveles de cloruros totales en agua: Agua potable: < 250; Agua residual: < 500 y Agua superficial: < 1000.

3.5 Análisis biológico

Determinación de viables por el método en placa usando diluciones seriadas (Madigan et al., 2018). En un matraz Erlenmeyer de 250 mL marca PYREX, se preparó la solución madre, la cual consistió en disolver 10 mL de agua congénita en 90 mL de agua destilada estéril, con la ayuda de un Termo-Agitador marca CIVEQ se dejó en agitación constante por 15 min. Después con una pipeta estéril se transfirió 1 mL de la solución madre a un tubo de ensayo de vidrio de 10x120 mm marca PYREX, el cual contenía 9 mL de agua destilada estéril teniendo así la primera dilución 10^{-1} . A partir de la dilución 10^{-1} se continuaron haciendo diluciones de hasta 10^{-7} . Por triplicado se colocaron las cajas de Petri de vidrio estándar marca PYREX con su respectivo medio de cultivo (agar papa dextrosa y agar nutritivo). En el centro de cada una de las cajas de Petri se agregó 0.1 mL de las diluciones y se dispersó con una espátula de vidrio Digralsky sin marca, por toda la superficie de la caja Petri (Figura 17).

Posteriormente, las cajas fueron etiquetadas y colocadas en bolsas de polietileno de baja densidad sin marca, estas bolsas fueron limpiadas por dentro y por fuera con cloruro de benzalconio para su desinfección. Las cajas se llevaron a una incubadora biológica marca YAMATO a una temperatura de 28 °C en un periodo de 24 h para bacterias y hongos totales. El material de vidrio se esterilizó a calor seco durante 2 h a 150°C en una estufa marca MEMMERT y los agares se esterilizaron a calor húmedo en una

autoclave de aluminio a gas de 24 L marca ALL AMERICAN a 15 psia durante 15 min (Aquiahuatl et al., 2004).

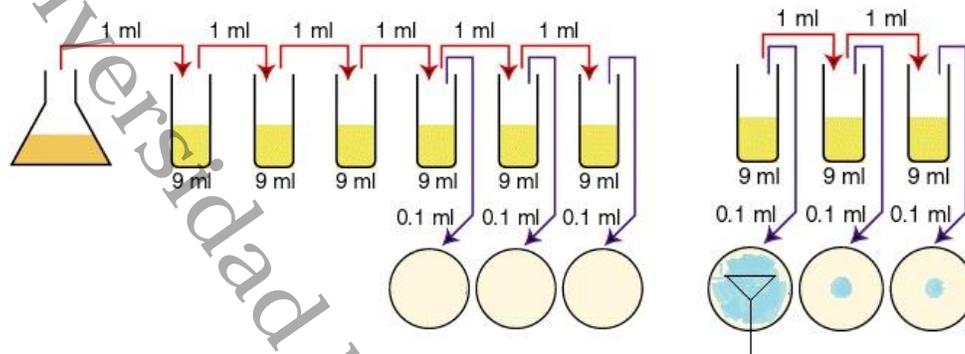


Figura 14. Procedimiento para la determinación de viables por el método en placa usando diluciones seriadas.

3.5.1 Caracterización y aislamiento de las cepas microbianas

3.2.2 Caracterización morfológica a nivel colonia

La caracterización macroscópica (Figura 18) se realizó tomando los criterios en cuanto a características físicas como: forma, bordes, elevación, color, tamaño, y consistencia (Ramírez, 2001).

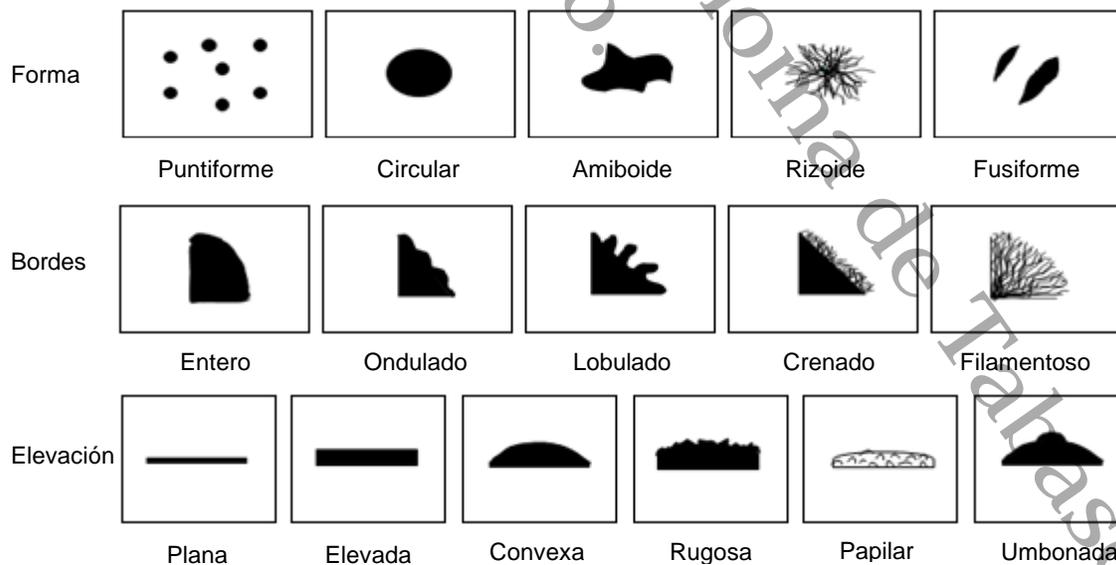


Figura 15. Caracterización morfológica a nivel colonia (Ramírez,

3.5.3 Aislamiento de las colonias puras por método siembra en estría en placas

La caracterización morfológica a nivel colonia, se realizó el aislamiento de las microbianas. En un matraz Erlenmeyer de 500 mL marca PYREX se preparó cada medio de cultivo (agar nutritivo para cepas microbianas y agar dextrosa papa para cepas fúngicas) y se esterilizó a calor húmedo en una autoclave de aluminio a gas de 24 L marca ALL AMERICAN a 15 psia durante 15 min (Aquihuatl et al., 2004).

El vaciado del medio de cultivo se realizó en cajas Petri en condiciones axénicas, las cuales se esterilizaron a calor seco durante 2 h a 150°C en una estufa marca MEMMERT. De las cepas totales se sacaron cuidadosamente con un asa bacteriológica para posteriormente depositarlas en el agar correspondiente (Madigan et al., 2018).

Los estriados fueron colocados en bolsas de polietileno de baja densidad e incubados en una incubadora biológica a 28°C.

3.6 Prueba petrofílica de las cepas microbianas

Las cepas obtenidas del agua congénita fueron sometidas a un análisis de sobrevivencia en agar bacteriológico, donde el petróleo fue utilizado como única fuente de carbono.

Para las cepas bacterianas, la técnica consistió en agregar una gota de petróleo estéril esparcida por toda la superficie de la caja Petri y las cepas bacterianas fueron inoculadas con un asa microbiológica (Figura 16) y para las cepas fúngicas se colocaron cuadritos de papel Whatman No. 40 de 10 X 10 mm (previamente esterilizados e impregnado con petróleo), donde fueron colocadas las ruedas de las cepas fúngicas (Figura 17).

Posteriormente, las cajas fueron colocadas en una incubadora biológica marca YAMATO a 28°C y 72 horas; esto, con el objetivo de observar que cepas crecían radialmente.

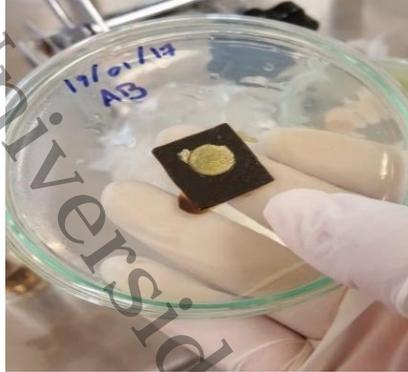


Figura 17. Cepa bacteriana.



Figura 17. Cepa fúngica.

3.7 Crecimiento microbiano en fertilizantes comerciales utilizando la escala de McFarland

Tres fertilizantes comerciales (Urea, Triple 17 y Nitrofoska) fueron seleccionados para trabajar en el crecimiento microbiano. Cada unidad experimental demandó un matraz Erlenmeyer de vidrio marca PYREX de 500 mL con un acople de tapón de hule trihoradado (Figura 18). A cada tapón se le introdujeron tres tubos de vidrio sin marca con un diámetro interno de 6 mm. El primer tubo ofreció la entrada de aire estéril para ello el tubo estaba conectado a un compresor de aire marca ELITE, junto con un filtro microbiológico con el fin de evitar la entrada de microorganismos externos a la unidad experimental (Ojeda et al., 2015). El segundo tubo se utilizó como venteo atmosférico para liberar la presión del sistema del biorreactor (Hernández et al., 2011). Al tercer tubo se le adaptó la toma de muestreo a través de una venoclisis clínica, de tal modo que el medio de cultivo no se contaminara al momento de muestrear. El material de vidrio se esterilizó a calor seco durante 2 h a 150°C en una estufa marca MEMMERT (Aquihuatl et al., 2004).

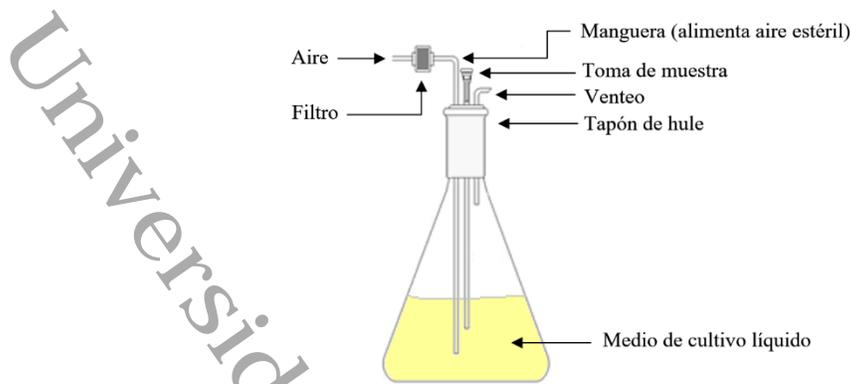


Figura 18. Biorreactor para la producción de biosurfactante.

Cada unidad experimental (Figura 19) utilizó:

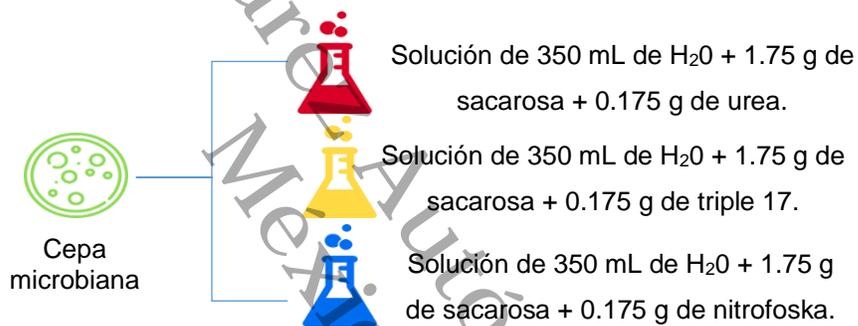


Figura 19. Cepas inoculadas en los diferentes

En las unidades experimentales de las cepas bacterianas se realizó una toma de muestra cada hora y en las cepas fúngicas cada 24 h.

Las muestras fueron analizadas con el método de McFarland el cual consiste en preparar dos soluciones en matraz Erlenmeyer de vidrio de 100 mL marca PYREX, la primera solución es cloruro de bario al 1% y ácido sulfúrico al 1%. Posteriormente en 10 tubos de ensayo de vidrio de 10 x 120 mm marca PYREX se realizan combinaciones de las dos soluciones anteriores, en la Tabla 8 se muestra la relación. Seguidamente de tener las soluciones, éstas se analizan en un espectrofotómetro uv-vis a una absorbancia de 600 nm (Tristan et al., 2015; García et al., 2007).

Tabla 8. Estándar de Mc Farland

Tubo	BaCl ₂	H ₂ SO ₄	UFC (10 ⁻⁸ /mL)	Absorbancia (600 nm)
1	0.1	9.9	3	0.138
2	0.2	9.8	6	0.218
3	0.3	9.7	9	0.299
4	0.4	9.6	12	0.404
5	0.5	9.5	15	0.768
6	0.6	9.4	18	0.896
7	0.7	9.3	21	0.994
8	0.8	9.2	24	1.070
9	0.9	9.1	27	1.117
10	1	9	30	1.206

Con este estándar se calcula la curva patrón con la cual se podrá sustituir con la absorbancia de cada muestra de las unidades experimentales y de tal manera poder determinar el crecimiento máximo de unidades formadoras de colonia (la ecuación es $y=0.0438x-0.0109$).

3.8 Ensamble de los biorreactores para la producción de los biosurfactantes de las cepas microbianas

Cada unidad experimental demandó un matraz Erlenmeyer de 1 L de capacidad nominal con un acople de tapón de hule trihoradado (Figura 19). A cada tapón se le introdujeron tres tubos de vidrio con un diámetro interno de 6 mm. El primer tubo ofreció la entrada de aire estéril para ello, el tubo estaba conectado a un compresor de aire, junto con un filtro microbiológico con el fin de evitar la entrada de microorganismos externos a la unidad experimental (Ojeda et al., 2015). El segundo tubo se utilizó como venteo atmosférico para liberar la presión del sistema del biorreactor (Hernández et al., 2011). Al tercer tubo se le adaptó la toma de muestreo a través de una venoclisis clínica, de tal modo que el medio de cultivo no se contaminara al momento de muestrear. El material de vidrio se esterilizó a calor seco durante 2 h a 150°C en una estufa (Aquiáhuatl et al., 2004).

3.9 Inoculación de las cepas microbianas en medio mineral líquido

El medio mineral líquido se preparó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. En la Tabla 9 se muestran los reactivos que se emplearon para preparar el medio el medio mineral líquido para la producción de biosurfactante. El medio mineral líquido se esterilizó a calor húmedo en una autoclave de aluminio a gas de 24 L marca ALL AMERICAN a 15 psia durante 15 min (Aquiahuatl et al., 2004).

Tabla 9. Medio de cultivo.

Reactivos	Cantidad (g mL ⁻¹)
Mejor fertilizante	0.175
Dextrosa	1.750
H ₂ O destilada	350.000

La biomasa de las cepas microbianas fue recuperada de las placas de agar con un asa de microbiológica e inoculadas en el medio de cultivo (Figura 20). El experimento establecido se dejó durante 9 h para las cepas bacterianas y 12 días para las cepas fúngicas. Posteriormente los biorreactores se desarmaron en condiciones axénicas, subsiguientemente en la Figura 21 se muestra el medio de cultivo fermentado, este fermentado pasó a las fases de extracción y purificación para obtener el metabolito puro para su análisis.

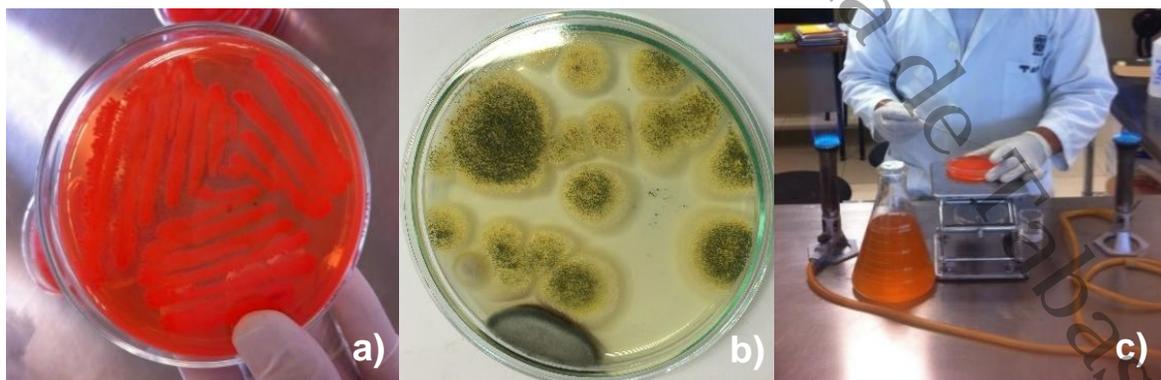


Figura 20. a) Cepa bacteriana en agar nutritivo; b) Cepa fúngica en agar dextrosa papa; c) Inoculación de cepas microbianas en medio mineral líquido.



Figura 21. Medio de cultivo fermentado.

3.10 Extracción y purificación del biosurfactante de cada cepa microbiana

3.10.1 Filtración

Transcurrido el tiempo de fermentación en los biorreactores, la biomasa se retiró del caldo utilizando el método de filtración con succión (Hernández et al., 2011), con la ayuda de un embudo Büchner de porcelana de 9 cm de diámetro interno marca FISHERBRAND, conectado a un matraz Kitasato marca PYREX y acoplado a una bomba de vacío marca NOVATECH. El proceso de filtrado se llevó a cabo empleando papel Whatman No. 42 el cual se colocó en el embudo Buchner. El proceso fue iterativo hasta desprender la mayor cantidad de biomasa (Figura 22).

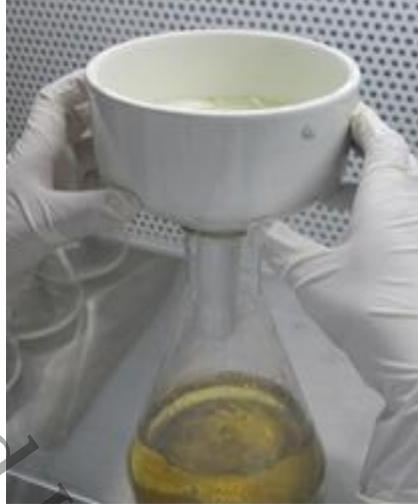


Figura 22. Filtrado de la biomasa.

3.10.2 Precipitación de material no tensoactivo con acetona

El material no tensoactivo fue eliminado mediante su precipitación con acetona marca FERMONT a una temperatura de 4 °C empleando la relación caldo/acetona: 1:1.2. La acetona se cargó lentamente al filtrado a un flujo constante y manteniendo una agitación constante a 80 rpm durante 15 min con ayuda de un Termo-Agitador marca CIVEQ (Figura 23).

Posteriormente, la mezcla del filtrado/solventes fue añadida en embudo de separación de vidrio de 1 L marca PYREX, la mezcla filtrada/acetona se dejó reposar por 24 h hasta lograr la precipitación del material no tensoactivo (Figura 24). El precipitado extraído y almacenado en contenedor de desechos inorgánicos para su confinación y el sobrenadante fue llevado a un rotavapor marca ECISHEL a una temperatura de 40 °C, 30 rpm y 10 in Hg de vacío, para recuperar la acetona. El filtrado libre de acetona se recuperó para su siguiente proceso (Almazán et al., 2000).



Figura 23. Agregado de acetona al caldo libre de biomasa.



Figura 23. Precipitación de las sustancias no tensoactivas.

3.10.3 Extracción de biosurfactante con mezcla de solventes cloroformo/metanol

Al filtrado se le extrajo el biosurfactante mediante tres extracciones repetidas con una mezcla de solventes cloroformo/metanol usando una relación de 2:1 (Almazán et al., 2000).

La mezcla de solventes/ filtrado fue en relación 1:1. El filtrado se agregó a un matraz Erlenmeyer de vidrio donde se puso en agitación constante a 80 rpm con la ayuda de un Termo-Agitador, la mezcla de solventes se agregó lentamente a flujo constante (Ojeda et al., 20015) y se dejó en agitación por 15 min (Figura 23).

Posteriormente, la mezcla homogénea de solventes/ filtrado se dejó reposar durante 60 min en embudos de separación de 1 L (Figura 25). La mezcla se separó en tres fases donde el precipitado fue recuperado y almacenado en residuos inorgánicos para su confinamiento, el siguiente precipitado fue recuperado y almacenado en refrigeración a 4 °C en un frasco de vidrio de color ámbar con capacidad de 30 mL y la última fase (sobrenadante) fue llevada a repetir el paso del filtrado y mezcla de solventes para lograr una extracción más de biosurfactante.



Figura 24. Separación de fases, recuperación del precipitado.

3.10.4 Purificación de los biosurfactantes

El segundo precipitado que se guardó en frasco ámbar fue purificado en un rotavapor marca ECISHEL a una temperatura de 30 °C a 30 rpm hasta la recuperación de la mezcla de solventes (Figura 26).



Figura 25. a) Recuperación del solvente; b) Biosurfactante

3.11 Determinación de propiedades de superficie

3.11.1 Preparación de la muestra

En viales de vidrio de color ámbar con capacidad de 50 mL, se prepararon diluciones de los diferentes biosurfactantes sintetizados por los microorganismos (bacterias y hongos),

biosurfactante/agua grado HPLC (High Performance Liquid Chromatography) a diferentes concentraciones (1, 0.7, 0.4, 0.2, 0.1, 0.4, 0.01 y 0.001 % p/p.) Las diluciones se colocaron en un baño isotérmico a temperatura constante de 35°C por 24 h para su estabilización (Hernández, 2015).

3.11.2 Medición de tensión superficial

En la determinación de la tensión superficial, se utilizaron las muestras previamente preparadas. Las pruebas se realizaron con un tensiómetro DuNouy (CSC Scientific Company Inc., Fairfax, VA, EE. UU.) modelo 70535 (Figura 27). La técnica consistió en medir la fuerza (P) con la que un líquido jala al anillo de platino de geometría conocida. Se puso en contacto el anillo de platino con el líquido, y éste saltó hacia el anillo y lo jaló hacia el seno del mismo (Figura 28). Para el cálculo de la tensión superficial se usaron ecuaciones proporcionadas por el fabricante, el tensiómetro da una lectura en dinas y se usa la ecuación numero 4 para tener la tensión superficial en mN m⁻¹ (Martínez et al., 2018).

$$A = P * F \dots \dots \dots (4)$$

Dónde: A: Tensión superficial; P: Tensión superficial aparente (dato leído del disco); F: Factor de corrección.

$$F = 0.7250 + \sqrt{\frac{0.01452 P}{c^2(D-d)}} + 0.04534 \frac{1.679r}{R} \dots \dots \dots (5)$$

Dónde: F: Factor de corrección; P: Tensión superficial aparente (dato leído del disco); C: Circunferencia del anillo (impreso en el contenedor del anillo); D: Densidad de fase inferior (muestra); d: Densidad de la fase superior (aire); R: Radio del anillo y r: radio del anillo de alambre.

El tensiómetro fue calibrado, la porta muestra del tensiómetro y el anillo de Dunouy, fueron lavados con agua HPLC y con acetona por cada muestra analizada. Inicialmente se hizo el análisis del agua HPL, obteniendo una lectura de la tensión superficial

promedio de 70.8 mN m^{-1} a 30°C . Posteriormente las diluciones de los diferentes biosurfactantes fueron analizadas en el tensiómetro.



Figura 27. Tensiómetro anillo de DuNouy.

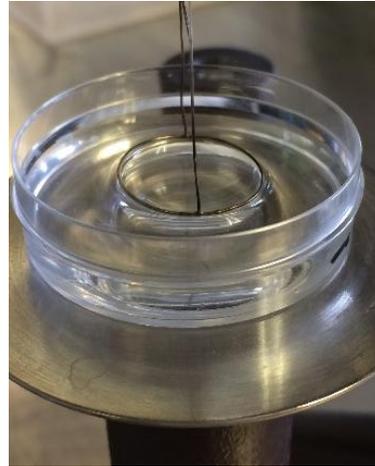


Figura 28. Vista transversal del anillo DuNouy.

3.11.3 Concentración micelar crítica

La concentración micelar crítica (CMC) es la concentración a la cual las micelas se comenzaron a formar. En la CMC un repentino cambio en la tensión superficial fue observado. La CMC se determinó representando gráficamente la tensión superficial como una función de la concentración de cada biosurfactante.

3.11 Determinación de propiedades termodinámicas

3.11.1 Determinación de densidad

La densidad fue medida por el método del micropicnómetro, tomando como referencia la densidad del agua destilada, utilizando la siguiente ecuación:

$$\rho_{BT} = \frac{\omega_{\mu m} - \omega_{\mu v}}{\omega_{\mu a} - \omega_{\mu v}} * \rho_{H_2O} \dots \dots \dots (6)$$

Donde: $\omega_{\mu m}$ = Masa del micro picnómetro con muestra del biosurfactante (g); $\omega_{\mu v}$ = Masa del micropicnómetro vacío (g); $\omega_{\mu a}$ = Masa del micropicnómetro con agua destilada (g) y

$\rho_{\text{H}_2\text{O}} =$ Densidad del agua 1 g cm^{-3} .

La densidad es la característica más comúnmente registrada en cualquier sustancia y desempeña un papel fundamental en la predicción de diversas propiedades físicas y químicas (Bolotnikov et al., 2007). El análisis de la densidad en los líquidos es inevitable para el diseño de procesos químicos; por lo tanto, las mediciones experimentales de densidad son útiles para entender el comportamiento de esta propiedad. Las mediciones de densidad fueron realizadas mediante la técnica del micropicnómetro (Figura 29).

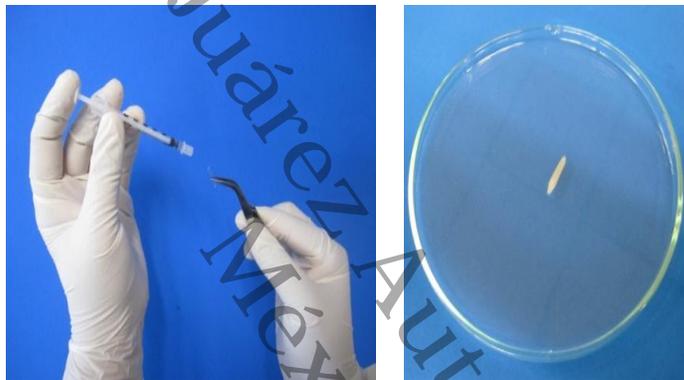


Figura 26. Técnica del micropicnómetro.

3.11.2 Determinación de pH

La medición del pH se realizó con un pH-metro digital Hanna modelo HI 9813-6 ST (Figura 30).



Figura 27. Equipo pHmetro.

3.12 Determinación de propiedades fisicoquímicas

3.12.1 Índice de emulsificación

El índice de emulsión es la capacidad (en %) que tienen los biosurfactantes de emulsificar el petróleo. Utilizando la técnica reportada por Cooper & Goldenberg (1987). El análisis se realizó con 2 mL de biosurfactante más 2 mL de petróleo crudo y se agitó mecánicamente con ayuda de un vórtex marca THERMO SCIENTIFIC a 3,000 rpm durante dos minutos (Figura 31). El índice de emulsión fue dado como porcentaje de la altura de la capa emulsificada (mm) dividido por la altura total de la columna de líquido (mm), mientras que, para el tamaño de gota de la emulsión, la muestra se analizó en un microscopio OLYMPUS modelo BX45 y un software ZEN lite 2012 (Figura 32).



Figura 29. Agitación en vórtex.



Figura 29. Microscopio OLYMPUS BX45, Software Zen Lit3e 2012.

3.13 Determinación de propiedades químicas

3.13.1 Identificación de lípidos polares

La presencia de los lípidos polares de interés (glicolípidos, lipopéptidos y fosfolípidos) se determinaron, ya que éstos son los que primariamente muestran características tensoactivas. Se emplearon 3 placas de cromatografía de vidrio cubiertas de sílica gel, de medidas: espesor de 0.25 mm de 3.5 x 10 cm. A tres placas a 1 cm del borde inferior se le agrego una gotita aproximadamente 5 μ L de biosurfactante (Figura 33 inciso a), cada placa fue rociada con una solución reveladora (una placa con difenilamina, otra

placa con ninhidrina y la última placa con azul de bromotimol (Figura 33 inciso b). Inmediatamente las placas se sumergieron en posición vertical aproximadamente a 5 mm de profundidad en una solución disolvente (Figura 33 inciso c), las placas de cromatografía quedaron en contacto con la solución y ésta ascendió por capilaridad y arrastró los compuestos a lo extenso de la placa causando “manchas” de los lípidos presentes en la muestra (Hamilton & Hamilton, 1992).

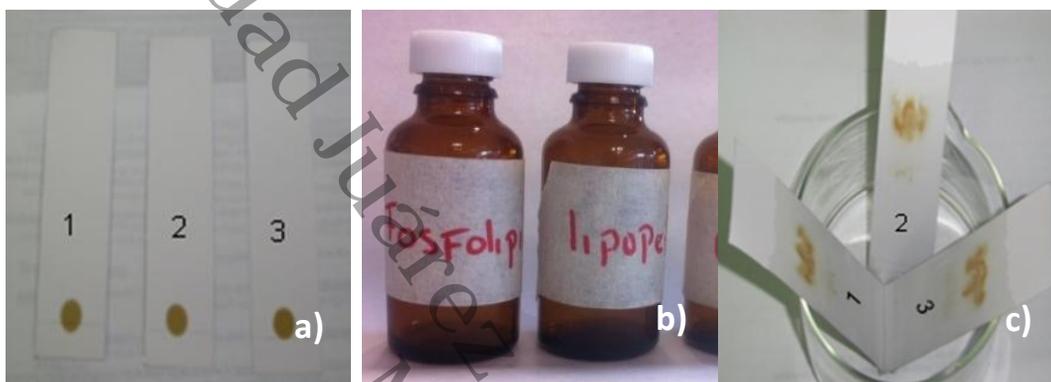


Figura 30. a) Placas de cromatografía; b) Soluciones reveladoras; c) Placas sumergidas en solución disolvente.

3.13.2 Preparación de soluciones

La solución disolvente se preparó en un matraz volumétrico de vidrio de 250 mL marca PYREX a una relación de 6:8:2:2:1 v/v con los solventes cloroformo/acetona/metanol/ácido acético/agua destilada.

3.13.2.1 Solución reveladora de glicolípidos

La solución reveladora se preparó en un matraz volumétrico de vidrio de 25 mL marca PYREX con 2 g de difenilamina, 20 mL de etanol, 100 mL de ácido clorhídrico al 38% de pureza y 80 mL de ácido acético; la placa se roció (con atomizador) con difenilamina y después se calentó a 105°C en una estufa marca MEMMERT por espacio de 25-30 min (Hamilton & Hamilton, 1992).

3.13.2.2 Solución reveladora de lipopéptidos

La solución reveladora se preparó en un matraz volumétrico de vidrio de 25 mL marca PYREX, se calculó el peso del reactivo ninhidrina al 2 % utilizando etanol como diluyente. La placa cromatografía se roció (con atomizador) con esta solución y después se calentó a 100 °C en una estufa marca MEMMERT por espacio de 5 a 10 min (Hamilton & Hamilton, 1992).

3.13.2.3 Solución reveladora de fosfolípidos

La solución reveladora se preparó en un matraz volumétrico de vidrio de 25 mL marca PYREX se pesó 0.0025 g de azul de bromotimol se disolvió en 25 mL de una solución de NaOH 0.01 M. La placa se roció con esta solución y después se calentó la placa a 100 °C en una estufa marca MEMMERT por espacio de 5 a 10 min. (Hamilton & Hamilton, 1992).

3.13.3 Determinación de grupos funcionales

Los principales grupos funcionales de los compuestos presentes en los biosurfactantes obtenidos se identificaron mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), empleando un espectrofotómetro marca SHIMADZU modelo IRAFFINITY-1. Para las mediciones se utilizó un accesorio de reflexión total atenuada (ATR) marca SMITHS con porta muestras. El análisis se realizó en el intervalo de longitud de onda de 4000 a 800 cm^{-1} , con resolución de 2 cm^{-1} . Para el análisis de los biosurfactantes, cada muestra fue colocada en pastillas individuales de bromuro de potasio.

3.13.4 Determinación de la composición elemental en %masa

El análisis elemental de los biosurfactantes se realizó por el método de energía dispersiva de rayos X utilizando un microscopio electrónico de barrido marca JEOL, modelo JSM-6010LA (Figura 34). Para el análisis, se tomó una gota de muestra y se

colocó una porta objetos el cual fue llevado a un desecador de 10 L de vidrio marca CIVEQ, hasta que la muestra se deshidratara, de seguida cada muestra fue pegada sobre una cinta de carbono de doble cara en una porta muestra de acero inoxidable. Las muestras se analizaron en el microscopio electrónico de barrido en condiciones de bajo vacío.



Figura 31. Microscopio Electrónico de Barrido.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este estudio corresponden al promedio de tres repeticiones por cada muestra analizada. Esto significa que cada una de las muestras fue sometida a tres ensayos independientes, y los valores obtenidos se calcularon y se promediaron para obtener un resultado representativo y confiable. Esta metodología se utilizó con el objetivo de minimizar la variabilidad y garantizar la precisión y consistencia de los datos obtenidos, permitiendo así una interpretación fiable y objetiva de los resultados.

4.1 Análisis fisicoquímicos del agua congénita

Los riesgos ambientales derivados del manejo inadecuado del agua en la industria petrolera están relacionados con la presencia de sólidos totales, grasas y aceites, así como metales pesados, entre los que se incluyen estroncio, bario, cadmio, cromo, plomo y mercurio. Además, en el agua pueden encontrarse gases como cloro y ácido sulfhídrico, aniones como sulfatos, carbonatos y bicarbonatos, cationes como magnesio, sodio y hierro, y también microorganismos, lo que contribuye a la contaminación y al impacto ambiental negativo (Mancilla & Mesa, 2012).

Se realizan pruebas fisicoquímicas de la muestra de agua congénita procedente de un activo de PEMEX de acuerdo a lo establecido en la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 de calidad y ensayos en cumplimiento de la NOM-001-SEMARNAT-1996 de límites máximos permisibles de contaminantes en aguas residuales.

Tabla 10. Resultados de análisis fisicoquímicos del agua congénita.

Parámetro	Resultados	Morales et al., 2016	Zamora et al., 2014	Adames et al., 2014	Vera et al., 2011	Roja et al., 2008	Morante 2002	Límites máximos	Unidades
Turbiedad	120	220				480			NTU
Alcalinidad	300	15	394			2 277			mg L ⁻¹
Cloruros totales	93 701	40	196			1 802		250	mg L ⁻¹
Conductividad	2.58	1.44	126.8	47					mS cm ⁻¹
pH	6.6	5		9		7.8		5 a 10	Unidades de hidrogeno
Sólidos totales	119 376	95 687			401	600		32,000	mg L ⁻¹
Sólidos disueltos totales	490	4						200	mg L ⁻¹
Grasas y aceites	11.60						1 195	25	mg L ⁻¹

Análisis de turbiedad. La turbiedad del agua es el resultado de la presencia de partículas suspendidas y disueltas, incluyendo arcilla, cieno, materia orgánica e inorgánica finamente dividida, así como compuestos solubles coloridos, plancton y diversos microorganismos. La transparencia del agua es un aspecto esencial cuando está destinada al consumo humano, la producción de bienes o procesos industriales que requieren ciertas propiedades específicas. Por esta razón, la medición de la turbiedad es un criterio fundamental para evaluar la calidad del agua y optimizar el desempeño de las plantas de tratamiento, ayudando en el control de los procesos para determinar el momento y el método adecuado para su tratamiento.

El resultado obtenido fue de 120 UNT (Unidades Nefelométricas de Turbiedad). Rojas et al. (2008) obtuvieron resultados de 480 UNT; Medina et al. (2007) adquirieron un resultado de 60 UNT.

Los resultados derivados del trabajo experimental muestran que la turbidez de la muestra es significativamente diferente a lo reportado por los autores Rojas et al. (2008); Medina et al. (2007). Esta diferencia significativa se debe principalmente por la presencia de arcilla y materia orgánica presentes en el agua.

Análisis de alcalinidad. La alcalinidad se define por la presencia de sustancias hidrolizables en el agua, las cuales, al someterse a hidrólisis, generan iones hidroxilo (HO^-). Entre estos compuestos se encuentran bases fuertes e hidróxidos de metales alcalinotérreos, que desempeñan un papel fundamental en la regulación del pH. Además, los carbonatos y fosfatos contribuyen significativamente a la alcalinidad del agua.

El resultado obtenido del análisis fue de 300 mg L^{-1} de alcalinidad en la muestra, lo cual demuestra que la alcalinidad de muchas aguas reportadas en la literatura se debe solamente a bicarbonatos de calcio y magnesio. La alcalinidad total es prácticamente similar con la dureza de carbonatos. Rojas et al. (2008) exponen resultados de $2\,277 \text{ mg L}^{-1}$; Zamora et al. (2014) reportan resultados de 394 mg L^{-1} en su publicación.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que existen diferencias significativas en la alcalinidad del agua congénita entre las distintas muestras analizadas y reportadas en la literatura. Estas variaciones se deben a una combinación de factores geológicos, geoquímicos y procesos naturales que influyen en la composición química del agua. Es decir, la alcalinidad del agua congénita está estrechamente relacionada con el origen geológico y composición mineral de las rocas huéspedes, procesos diagenéticos y de interacción con las rocas circundantes, edad y profundidad de la formación del agua y reacciones geoquímicas y procesos naturales (Wei Li et al., 2017).

Análisis de cloruros totales. El ión cloruro es uno de los iones inorgánicos más abundantes en aguas naturales, residuales y tratadas, y su presencia es esencial en el agua potable. En este contexto, su concentración influye en el sabor salado, el cual puede variar según los niveles presentes. Sin embargo, cuando su concentración es

elevada, puede ocasionar corrosión en estructuras metálicas, afectar el crecimiento de la flora y contribuir al deterioro del suelo.

Los cloruros totales son un parámetro importante en la caracterización química del agua. El resultado obtenido fue de 93 701 mg L⁻¹ de cloruros totales, se observó una correlación positiva entre los cloruros totales y la salinidad del agua. La presencia de cloruros totales en el agua congénita puede deberse a la disolución de minerales como halita (NaCl) y silvita o también conocida como silvina (KCl). La variabilidad en las concentraciones de cloruros totales puede estar relacionada con factores como: Origen geológico del agua, procesos diagenéticos y de interacción con las rocas circundantes, edad y profundidad de la formación del agua, influencia de agua meteorítica o subterránea. La concentración de cloruros totales puede afectar la calidad del agua para uso humano, agrícola o industrial. Puede influir en la estabilidad de las estructuras subterráneas y la integridad de los pozos (Changchang Fu et al., 2018). Comparando el resultado con lo reportado en la literatura de 196 mg L⁻¹; 1–802 mg L⁻¹ entre otros, se demuestra una alta concentración de cloruros totales cotejado a lo reportado por (Rojas et al., 2008; Zamora et al., 2014).

Análisis para conductividad. La conductividad electrolítica representa numéricamente la habilidad de una solución para conducir corriente eléctrica. Esta propiedad está determinada por la concentración de iones disueltos, siendo los cloruros y sulfatos los principales responsables de este fenómeno (Solís-Castro et al., 2018).

El resultado obtenido fue de 227 mS cm⁻¹, cotejando el resultado con resultados expuestos en la literatura se encuentra con un nivel alto de conductividad eléctrica. Se observó una correlación positiva entre la conductividad y la salinidad del agua. Las muestras con mayor conductividad provenían de formaciones geológicas con alta presencia de evaporitas y rocas sedimentarias. El resultado obtenido varía con estudios previos que reportan conductividades bajas en aguas congénitas. Por ejemplo, Zamora et al. (2014) muestran un resultado de una muestra de 126.8 mS cm⁻¹ y Adames et al.

(2014) reportan uno más bajo de 47 mS cm^{-1} . El resultado de la investigación es alto porque probablemente tiene una correlación con la alta presencia del ion cloruro.

Análisis de pH. El potencial de hidrógeno (pH) en soluciones acuosas se define como el logaritmo negativo de la actividad del ion hidronio (H^+): $\text{pH} = -\log a_{\text{H}^+}$. En otras palabras, el pH es un indicador de la acidez o alcalinidad de una disolución y refleja la concentración de iones de hidrógeno presentes en ella.

El resultado del análisis fue de 6.6 el cual es ligeramente ácido, este resultado coincide con estudios previos de otros autores que reportan pH similares en aguas congénitas en un rango de 6.5 y 8.5 (Adames et al., 2014; Rojas et al., 2008), esto se debe principalmente a la presencia del ion cloruro, hidroxilo e hidróxidos. Las muestras con pH más alto provenían de formaciones geológicas con alta presencia de carbonatos.

Análisis sólidos totales y sólidos disueltos totales. La presencia de sólidos y sales disueltas puede influir negativamente en la calidad del agua, tanto en cuerpos naturales como en efluentes industriales o procesos específicos. En el caso de las plantas potabilizadoras, el análisis de sólidos disueltos es un parámetro esencial para evaluar la eficacia de los procesos de tratamiento, ya que permite determinar el grado de purificación alcanzado.

Los resultados obtenidos para sólidos totales fue de $119\,376 \text{ mg L}^{-1}$ y para sólidos disueltos totales 490 mg L^{-1} . Se observó una correlación positiva entre ST y SD. La relación entre sólidos totales y sólidos disueltos sugiere la presencia de contaminantes. Además, la influencia de factores geológicos y químicos también es significativa.

Medina et al. (2007), reportan $30\,000 \text{ mg L}^{-1}$ de sólidos disueltos totales y $29\,000 \text{ mg L}^{-1}$ de sólidos totales; Vera et al. (2011) alcanzan sólidos disueltos totales de $401\,600 \text{ mg L}^{-1}$, los cuales son muy altos comparándolos con lo obtenido en esta investigación y reportado en otros estudios similares, sin embargo, esto tiene una correlación con las características fisicoquímicas de los pozos petroleros.

Análisis de grasas y aceites. La presencia de grasas y aceites en el agua es un indicador del nivel de contaminación provocado por actividades industriales y humanas. En su medición, no se analiza una única sustancia, sino un conjunto de compuestos que comparten propiedades fisicoquímicas similares.

Los resultados obtenidos fueron de 11.60 mg L⁻¹, lo cual expone una baja presencia de hidrocarburo en la muestra. Morante (2002), reportó resultados de 1 195 mg L⁻¹; Otorola (2011) de 174 mg L⁻¹. La composición de las aguas de formación varía según el yacimiento, pero suele incluir petróleo en concentraciones de 500 a 5 000 ppm, además de sulfatos, bicarbonatos, sulfuro de hidrógeno, cianuro y dióxido de carbono. También pueden contener metales pesados, como cadmio, arsénico, cromo, plomo, mercurio, vanadio y zinc (Bravo, 2007).

4.2 Análisis biológico

4.2.1 Obtención y purificación de cepas microbianas puras

La obtención de microorganismos productores de biosurfactantes de agua congénita es de especial interés debido a la capacidad de los microorganismos para sobrevivir en condiciones extremas. Aplicando las técnicas microbiológicas previamente descritas se obtuvieron ocho bacterias y cinco hongos.

En la Tabla 11 se muestra la caracterización microscópica y macroscópica de las cepas bacterianas obtenidas. Como parte de esta caracterización se analizó la morfología de la colonia, observándose colonias no mayores a los 4 mm de diámetro, de color blanco o amarillo muy claro. A nivel microscópico se observó que las cepas bacterianas son Gram positivas y Gram negativas respectivamente en forma de bacilos. Estudios relacionados con suelos contaminados con petróleo crudo mencionan que los microorganismos Gram negativos y Gram positivos han sido aislados de estos suelos contaminados como lo reportan autores como Ramírez et al., 2012; Whang et al., 2008

y Cameotra et al., 1998. En la tabla 12 se muestra la caracterización macroscópica y microscópica de las cepas fúngicas obtenidas.

Tabla 11. Caracterización macroscópica de las cepas bacterianas.

Cepa	Forma	Tamaño (mm)	Color	Borde	Consistencia	Tinción de Gram (+/-)
B ₁	Irregular	3	Amarillo	Ondulado	Viscosa	-
B ₂	Circular	2	Blanco	Ondulado	Viscosa	+
B ₃	Irregular	2	Blanco	Entero	Viscosa	+
B ₄	Irregular	2	Amarillo	Entero	Viscosa	-
B ₅	Circular	3	Amarillo	Entero	Viscosa	+
B ₆	Circular	3	Amarillo	Entero	Viscosa	-
B ₇	Circular	3	Blanco	Ondulado	Viscosa	+
B ₈	Irregular	3	Blanco	Ondulado	Viscosa	-

Tabla 12. Caracterización macroscópica de las cepas fúngicas.

Cepa	Color	Textura	Densidad	Micelio aéreo	Características de las hifas
H ₁	Blanco/verde	Algodonosa	Regular	Presente	Hifas de paredes delgadas, con fíbulas e hifas entrelazadas
H ₂	Blanco	Algodonosa	Regular	Presente	Hifas de paredes delgadas, con fíbulas e hifas entrelazadas
H ₃	Verde	Compacta	Regular	Presente	Hifas de paredes delgadas, con fíbulas
H ₄	Negro/verde	Compacta	Regular	Presente	Hifas de paredes delgadas, con fíbulas
H ₅	Melón	Algodonosa	Regular	Presente	Hifas de paredes delgadas, con fíbulas e hifas entrelazadas
H ₆	Blanco	Compacta	Regular	Presente	Hifas de paredes delgadas, con fíbulas
H ₇	Amarillo	Compacta	Regular	Presente	Hifas de paredes delgadas, con fíbulas
H ₈	Verde	Algodonosa	Regular	Presente	Hifas de paredes delgadas, con fíbulas e hifas entrelazadas
H ₉	Blanco/negro	Compacta	Regular	Presente	Hifas de paredes delgadas, con fíbulas

4.2.2 Prueba petrofílica a los microorganismos

De las seis cepas bacterianas sembradas en agar nutriente con petróleo como única fuente de carbono, las cepas B₂, B₃, y B₇ sobresalieron en la supervivencia al presentar un crecimiento uniforme y de las nueve cepas fúngicas se observó que las cepas H₁, H₂ y H₅, tuvieron un mejor crecimiento radial en mm de 1.5, 1.7 y 1.8 respectivamente.

El crecimiento de bacterias en el petróleo crudo se debe a una combinación de nutrientes disponibles, condiciones anaeróbicas, capacidad de biodegradación y adaptación a su entorno. El crecimiento radial puede sugerir que las cepas fúngicas sintetizan más enzimas para degradar hidrocarburos derivado del petróleo (Rivera-Cruz et al., 2004), por este motivo el trabajo continuó con estas seis cepas microbianas (tres bacterianas y tres fúngicas).

4.2.3 Identificación del género de las cepas fúngicas

Los análisis a las cepas fúngicas donde se identificaron las características fisiológicas con el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) revelaron que de las cepas H₁ (Figura 36) y H₂ (Figura 37), corresponden al género *Aspergillus sp* y la cepa H₅ (Figura 37) corresponde a un *Penicillium sp*, esto fue cotejado en el libro especializado en microbiología de Koneman, MD. (2006).

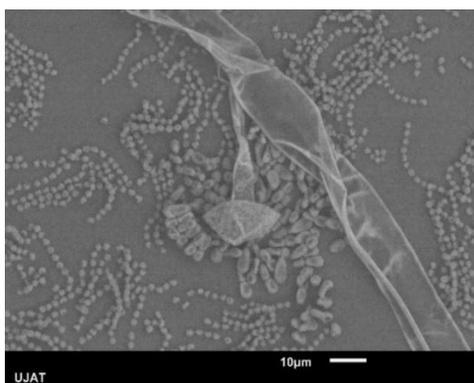


Figura 32. Cepa H₂.

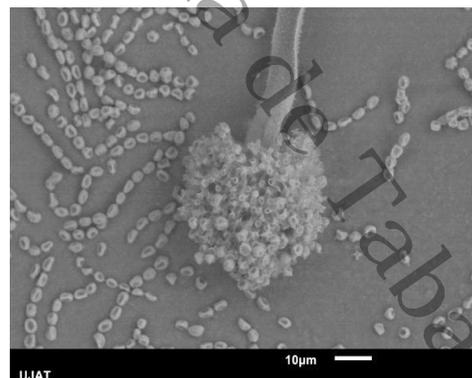


Figura 33. Cepa H₁.

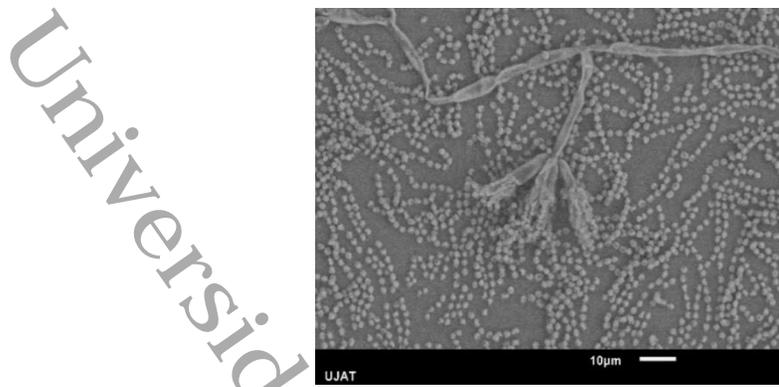


Figura 34. Cepa H5.

Las cepas *Aspergillus* sp. es un género de hongos imperfectos que pertenecen al orden Eurotiales. Son conocidos como mohos y se encuentran en una amplia gama de hábitats terrestres, incluyendo suelo, madera, plantas en revisión e incluso alimentos enmohecidos. Algunos miembros de este género son importantes en la biotecnología debido a sus enzimas productoras de quitinasa y celulasa y su capacidad de producir diversos metabolitos secundarios con propiedades biológicas (Cabrero C. & Barea JL. 2009).

Las cepas *Penicillium* sp. en agua congénita es un hallazgo significativo que puede deberse a la contaminación del suelo y las rocas circundantes, infiltración de agua superficial contaminada, actividades humanas, como la agricultura y la industria y/o procesos naturales, como la descomposición de materia orgánica (Lujan N. et al., 2019).

4.3 Crecimiento microbiano

El crecimiento bacteriano se determinó por crecimiento máximo de las unidades formadoras de colonias por espectrometría UV-VIS, en la Figura 38 se muestra la curva de calibración obtenida con la respectiva ecuación:

$$y = 0.0438x - 0.0109 \dots \dots \dots (7)$$

de acuerdo al método McFarland reportado en la literatura por varios autores (Marín & Jaramillo, 2015; Tristan et al., 2015; Rojas et al., 2013; Medicina & Laboratorio, 2009 y Lozano et al., 1999).

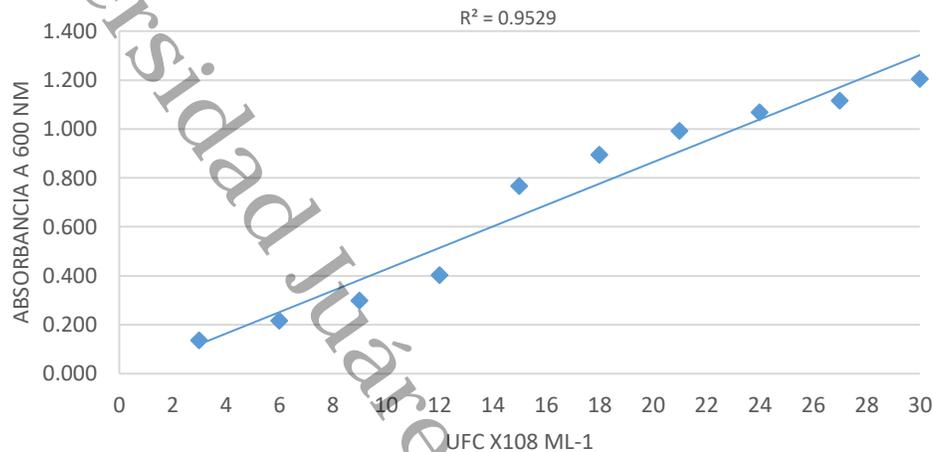


Figura 35. Curva de calibración para estimar el crecimiento de UFC.

Como medio de cultivo se ocuparon tres fertilizantes comerciales (triple 17, urea y Nitrofoska), y como fuente de carbono se añadió glucosa. Cada biorreactor contó con tres réplicas, los biorreactores fueron armados en condiciones axénicas. Las tomas de muestras se realizaron cada dos horas durante 26 h consecutivas. Cada muestra fue analizada en el espectrofotómetro a 600 nm para medir su turbidez y determinar por densidad óptica su crecimiento máximo.

La siguiente gráfica (Figura 39) muestra el crecimiento máximo de unidades formadoras de colonias que se obtuvieron con los datos experimentales de acuerdo al estándar de McFarland a 600 nm. De todas las cepas bacterianas, las que mejor demostraron un crecimiento máximo y significativo con el fertilizante Nitrofoska fueron la B₂, B₃ y B₇. El Nitrofoska demuestra ser un fertilizante que cumple con los nutrientes necesarios para que las cepas bacterianas crezcan eficientemente en un corto periodo de tiempo. Marín & Jaramillo (2015), Se informó que las colonias estudiadas fueron cultivadas en medio mínimo M9, con una concentración de clorpirifos de 200 ppm. El cultivo se incubó a 36

°C ± 1 y, cada 24 horas, se monitoreó el crecimiento bacteriano, determinando su densidad óptica mediante un espectrofotómetro UV-VIS a 600 nm, sus resultados reportan un máximo crecimiento microbiano a las 120 h de incubación.

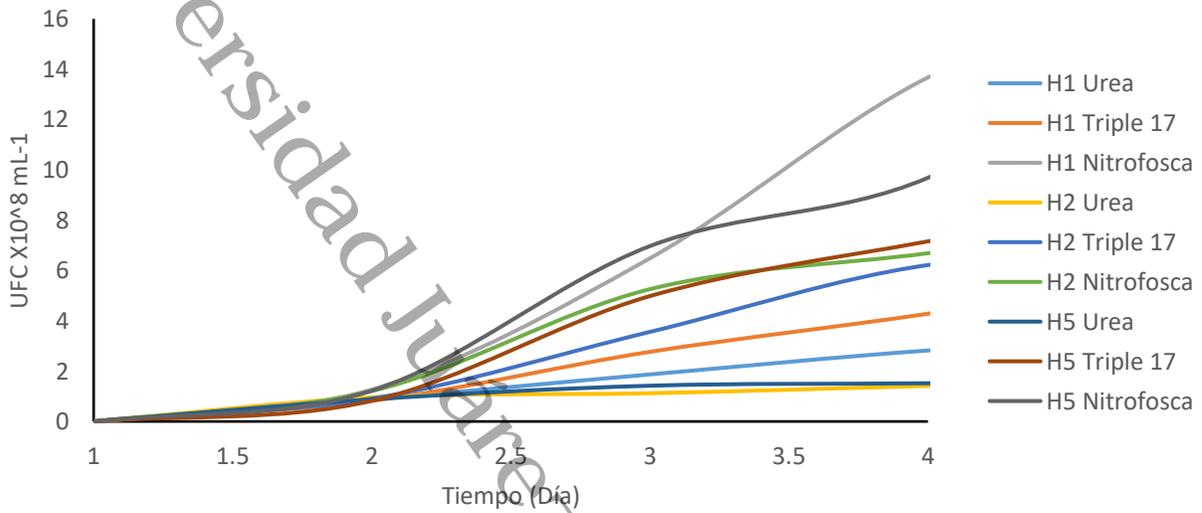


Figura 36. Crecimiento bacteriano UFC mL⁻¹

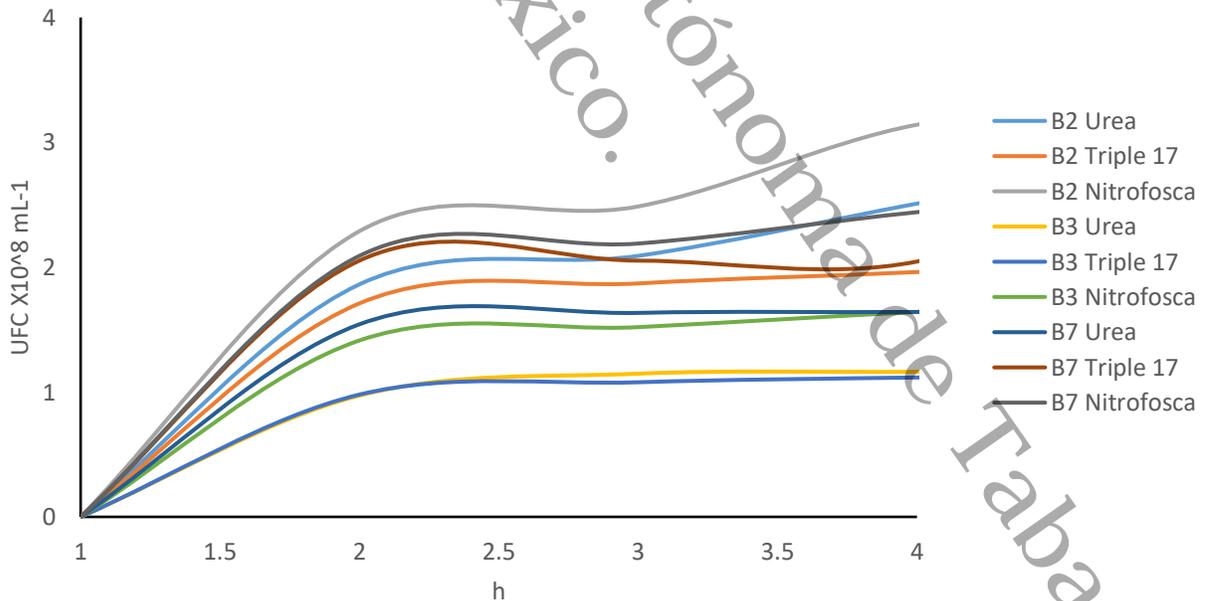


Figura 37. Crecimiento fúngico UFC mL⁻¹

En la figura 39 se muestra la gráfica de crecimiento de las cepas fúngicas, donde se destaca el crecimiento de la cepa H₁ en el medio mineral Nitrofoska.

Las bacterias crecen bien en Nitrofoska porque este fertilizante contiene nutrientes esenciales para su crecimiento y desarrollo. A continuación, se presentan algunos motivos por los cuales las bacterias prosperan en Nitrofoska: Nitrógeno: es un componente fundamental para el crecimiento bacteriano, ya que forma parte de las proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos. El Nitrofoska contiene nitrógeno en forma de nitrato y amonio, lo que facilita su absorción por parte de las bacterias. Fósforo: es esencial para la síntesis de ATP, ADN y ARN, y también para la formación de la membrana celular.

El Nitrofoska contiene fósforo en forma de fosfato, lo que permite a las bacterias utilizarlo para sus procesos metabólicos.

Potasio: Es importante para la regulación osmótica y la síntesis de proteínas. El Nitrofoska contiene potasio, lo que ayuda a mantener el equilibrio iónico y a promover el crecimiento bacteriano.

Micronutrientes: Puede contener micronutrientes como hierro, zinc, manganeso y cobre, que son esenciales para diversas funciones enzimáticas y metabólicas en las bacterias.

pH adecuado: El Nitrofoska suele ser cercano a un pH neutro, lo que es ideal para el crecimiento de muchas bacterias.

Disponibilidad de oxígeno: La estructura porosa del Nitrofoska permite una buena circulación de oxígeno, lo que es esencial para el crecimiento aeróbico de muchas bacterias.

Sustrato para la adherencia: La superficie del Nitrofoska proporciona un sustrato adecuado para que las bacterias se adhieran y formen biofilms (Grageda-Cabrera O. A., et al., 2018).

4.4 Producción de biosurfactantes

Las cepas microbianas seleccionadas fueron inoculadas en el medio mineral líquido para la producción de biosurfactante. En un matraz Erlenmeyer de 2 000 mL se preparó el medio mineral líquido conteniendo 4 g L⁻¹ de glucosa, 1 g L⁻¹ de fertilizante Nitrofoska y 2 000 mL de agua destilada. El medio mineral se esterilizó a calor húmedo en una autoclave a 121°C durante 15 min (Ramírez, 2001).

En condiciones axénicas, la biomasa de las cepas bacterianas fue raspada de las placas de agar con un asa de platino e inoculadas en el medio de cultivo. El experimento se dejó durante 12 h, posteriormente el biorreactor se desarmó y el caldo fermentado pasó a las fases de extracción y purificación para extraer el biosurfactante puro.

4.5 Caracterización fisicoquímica de los biosurfactantes

4.5.1. Medición de tensión superficial

Una de las características más importante de cualquier tensioactivo, sea de origen químico o biológico, es disminuir la tensión superficial de los líquidos, sin embargo, los biosurfactantes tienen la gran ventaja contra sus homólogos de origen químicos de ser biodegradables y tener baja o nula toxicidad (Ojeda et al., 2016).

Los resultados del análisis de tensión superficial se muestran en la Tabla 13 y en la Figura 41 se muestra la gráfica representativa a la disminución de la tensión superficial de los diferentes biosurfactantes. El biosurfactante producido por la cepa B₂ fue quien tuvo mejor capacidad de reducir tensión superficial del agua grado HPLC desde 71.3 mN m⁻¹ hasta 42.5 mN m⁻¹.

Los resultados obtenidos de la tensión superficial de los biosurfactantes sintetizados por las cepas bacterianas son ligeramente diferentes en el rango de 42.5 a 42.9 mN m⁻¹, los biosurfactantes sintetizados por las cepas fúngicas los resultados entran en un rango de 45 a 48.7 mN m⁻¹. Los cuales son significativamente diferentes a los biosurfactantes

bacterianos, esto se puede deber por la estructura química, propiedades y aplicaciones debido a las siguientes razones: Los biosurfactantes bacterianos suelen ser lipopéptidos, glicolípidos o fosfolípidos, con cadenas laterales hidrofóbicas y grupos hidrofílicos. Los biosurfactantes fúngicos suelen ser glicoproteínas, polímeros de ácido polihidroxicanoato o lípidos con estructuras más complejas.

Los biosurfactantes bacterianos tienen una mayor afinidad por los hidrocarburos, lo que los hace efectivos en la remoción de petróleo y productos químicos. Mientras que los biosurfactantes fúngicos tienen una mayor estabilidad en pH y temperatura, lo que los hace adecuados para aplicaciones en procesos industriales.

Es decir, los biosurfactantes bacterianos se utilizan comúnmente en la remoción de petróleo y productos químicos, mejora de la recuperación de petróleo en técnicas como MEOR, en tratamiento de aguas residuales y los biosurfactantes fúngicos se utilizan comúnmente en producción de cosméticos y productos de cuidado personal, en mejora de la solubilidad de fármacos y en procesos industriales como la fabricación de papel y textiles.

Además, por razones evolutivas las bacterias desarrollaron biosurfactantes para sobrevivir en entornos con alta concentración de hidrocarburos y los hongos sintetizan biosurfactantes para interactuar con su entorno y otros organismos en suelos y ecosistemas.

Tabla 13. Tensión superficial de los microorganismos.
Tensión superficial en mN m^{-1}
CMC en % (p/p)

Cepa	Resultados	Ahmed Sam et al. (2015)	al. (2017)	Rita et al. (2017)	El-Sheshtaw y et al. (2015)	Otros			
B ₂	42.5 0.4								
B ₃	43.61 0.4								
B ₇	43.19 0.7								
H ₁	48.02 0.4								
H ₂	47.80 0.2								
H ₅	49.32 0.4								
H ₂ O HPLC	71.28								
Solución buffer		72	59.3	65	72				
Biosurfactante		30	32.4	25.5	36	27	33	26	32

Ahmed et al. (2015) caracterizaron diversos biosurfactantes en base a lipopéptidos obtenidos de cepas bacterianas, donde su mejor biosurfactante redujo la tensión superficial del agua pura de 72 mN m^{-1} a 30 mN m^{-1} .

Sam et al. (2017) obtuvieron diversos biosurfactantes de los cuales uno redujo la tensión superficial de 59.3 a 32.4 mN m^{-1} .

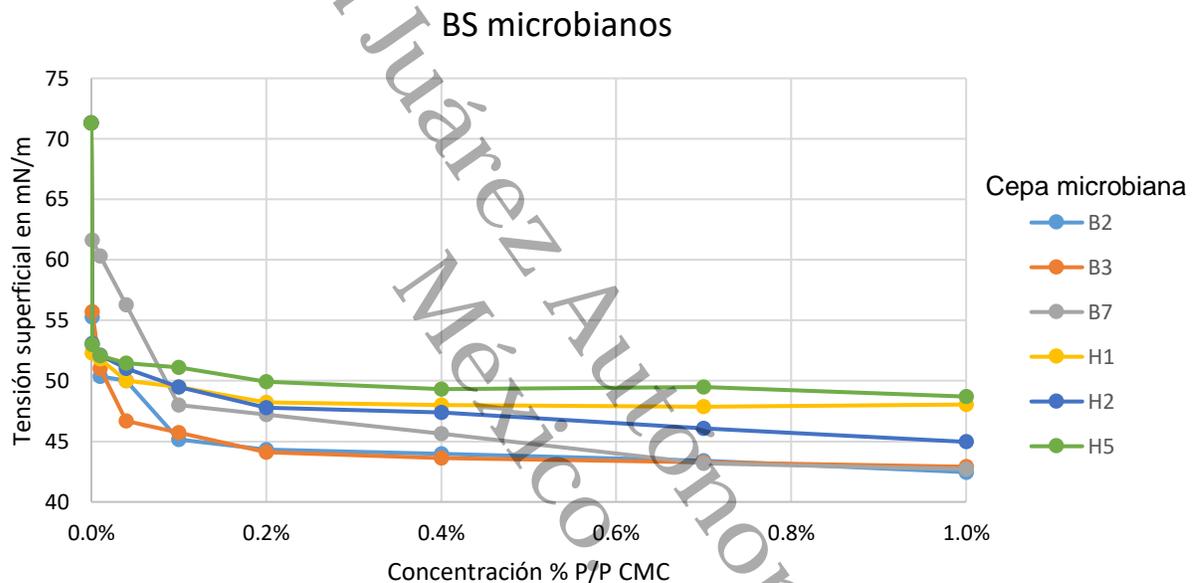
Rita et al. (2017) de una *Pseudomona* obtienen un biosurfactante el cual demuestra reducir la tensión patrón de 65 mN m^{-1} a 25.5 mN m^{-1} .

El-Sheshtawy et al. (2015) sintetizan biosurfactante de una cepa bacteriana, el cual asume el efecto de reducir la tensión superficial de 72 mN m^{-1} a 36 mN m^{-1} .

Por otra parte, en otras publicaciones de investigadores como: Fooladi et al. (2016); Thies et al. (2014); Ismail et al. (2013) reportaron la obtención de biosurfactante en los

cuales los lípidos polares asociados a la acción surfactante son de tipo lipopéptidos y su actividad de superficie reportado son favorables en la reducción de la tensión superficial a como lo es en esta investigación.

Las cepas bacterianas reportadas por los investigadores que tienen la facilidad de producir biosurfactante son: *B. licheniformis*, *S. marcescens*, *P. fluorescens*, *B. subtilis* y *B. Pumilus*, los cuales pudieron disminuir la tensión superficial hasta 27 mN m^{-1} , 33 mN m^{-1} , 26 mN m^{-1} y 32 mN m^{-1} respectivamente.



4.5.2 Índice de emulsificación y tamaño de gota de la emulsión

Una característica importante de un biosurfactante es que además de reducir la tensión superficial, tenga la peculiaridad de formar emulsiones estables. Esta cualidad es crucial para determinar sus posibles aplicaciones ambientales o industriales por lo que se le determinó la capacidad emulsionante a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, en la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos de índice de emulsión y tamaño de gota de la emulsión de cada biosurfactante.

Los parámetros que definen las posibles ocupaciones de un biosurfactante en las diferentes industrias como: agricultura, alimentaria, cosmética, metalúrgica, petrolera, entre otras (Ojeda et al., 2016), es considerar un elevado índice de emulsión y un tamaño de gota razonablemente pequeño. La habilidad de emulsificación de los biosurfactante producidos por las cepas microbianas fue comparado con la de un surfactante de origen químico (Tabla 14); siendo el biosurfactante producido por la cepa B₂ con mayor índice de emulsión (92%), por lo cual lo coloca con mayor ventaja sobre el surfactante químico, pues éste apenas alcance un IE del 62.5%. Para obtener el tamaño de gota de la emulsión, la muestra se analizó en un microscopio OLYMPUS modelo BX45 y el software ZEN lite 2012 (figura 4.19), el biosurfactante producido por la cepa bacteriana B₂, también mostró un tamaño de gota menor (11.87 μm) a comparación de sus homólogos, sin embargo, el surfactante de origen químico de marca registrada (pinol[®]) presenta un tamaño mucho menor a lo de los biosurfactantes, el cual fue de 2.69 μm .

Una aplicación potencial de estos biosurfactante, se puede pensar en la industria petrolera en el proceso de recuperación mejorada con microorganismos (MEOR por sus siglas en inglés). En este proceso se utilizan biosurfactantes con el objetivo de reducir la tensión de las interfases presentes entre el petróleo, la superficie sólida de las rocas y la fase acuosa al interior de los poros de la roca. Al reducir las fuerzas interfaciales, se mejora la fluidez de los hidrocarburos facilitando la extracción del petróleo residual.

Por otra parte, en el caso de un derrame de petróleo, la alta capacidad de emulsionar puede facilitar una eficiente biodisponibilidad para su posterior degradación en procesos de biorremediación (Ojeda et al., 2016), también se puede aumentar el metabolismo microbiano e incrementar la actividad enzimática microbiana o bien facilitar el transporte del sustrato orgánico hacia las células microbianas, por lo que este tipo de biosurfactantes podría utilizarse para llevar a cabo una biorremediación de mantos acuíferos contaminados con pesticidas organoclorados, organofosforados e isómeros del hexa-cloro-ciclohexano (Marín & Jaramillo, 2015; Karanth et al., 2000). Otras posibles aplicaciones de estos biosurfactantes, serían para facilitar el transporte del petróleo

crudo en las tuberías, limpieza de buques-tanques de almacenamiento de petróleo crudo y reducción de la viscosidad del petróleo crudo extra pesado (Bannat et al., 2000).

Tabla 14. Resultados obtenidos experimentalmente

Biosurfactante	Capacidad de emulsión en %	Tamaño de gota en μm (promedio)
B ₂	92	11.87
B ₃	90	15.46
B ₇	80	11.96
H ₁	90	29.74
H ₂	85	12.38
H ₅	85	13.58
PINOL	62	2.69

4.5.3 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier

La técnica clásica para el análisis estructural de compuestos orgánicos es la espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).

La Figura 37 muestra los espectros obtenidos con el análisis de FT-IR de los diferentes biosurfactantes sintetizados por las cepas microbianas. Las bandas más importantes con las características de absorción corresponden típicamente a grupos funcionales formado por lipopéptidos, lo cual se confirmó mediante cromatografía de capa fina.

La cromatografía de capa fina es empleada para la identificación de lípidos polares, Hamilton & Hamilton (1992) asocian a la acción tensoactiva con estos compuestos "lipopéptidos". Las bandas de absorción fueron localizadas en $3\ 467\ \text{cm}^{-1}$ (enlace O-H, típico de polisacáridos), $2\ 957$ y $2\ 885\ \text{cm}^{-1}$ (banda C-H: cadenas de hidrocarburos alifáticos), $1\ 637\ \text{cm}^{-1}$ (enlace amida O=C-N), $1\ 438\ \text{cm}^{-1}$ (grupos aminas C-N), $1\ 118\ \text{cm}^{-1}$ (radicales alquilos). Estos resultados son similares a los reportados por Thavasi (2009) quien obtuvo un biosurfactante de una cepa *Azotobacter chroococcum*, teniendo como componente principal un lipopéptido con una combinación de lípidos y proteínas 31.30 y 68.69 % (Banat et al., 2010; Rodríguez et al., 2006).

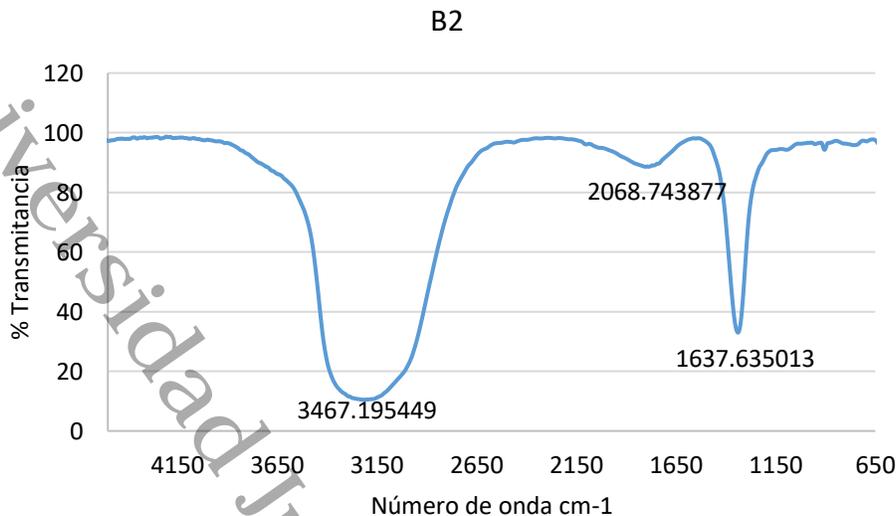


Figura 38. Espectro FT-IR del BS de la Cepa B₂.

Los espectros obtenidos en este estudio son consistentes con los espectros característicos de las moléculas de los lipopéptidos. El análisis FT-IR de los biosurfactantes obtenidos de las cepas microbianas, es similar a los resultados obtenidos por otros investigadores (Mukherjee & Das, 2007; Kuiper et al., 2004), quienes usaron el FT-IR como una herramienta analítica para caracterizar el biosurfactante.

El análisis de Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier es importante para los biosurfactantes por varias razones. Permite identificar los grupos funcionales presentes en la molécula del biosurfactante. Ayuda a determinar la estructura química y la composición del biosurfactante. También ayuda a detectar la presencia de impurezas o contaminantes en la muestra y ayuda a evaluar la pureza del biosurfactante. Además, se puede evaluar las propiedades físico-químicas del biosurfactante, como la hidrofobicidad y la carga, asimismo facilita a predecir el comportamiento del biosurfactante en diferentes entornos.

El estudio de FT-IR sirve para comparar el espectro de FT-IR del biosurfactante con patrones conocidos y con ello es posible identificar la similitud o divergencia con otros

biosurfactantes. Y sobre todo las grandes ventajas de este análisis con respecto a otros es que es una técnica no destructiva y no invasiva, es rápida y fácil de realizar, permite analizar muestras en diferentes estados (sólido, líquido o gaseoso) y es una técnica relativamente económica.

Algunos ejemplos de grupos funcionales que se pueden identificar mediante FT-IR en biosurfactantes son: Grupos hidroxilo (-OH), Grupos carboxilo (-COOH), Grupos amino (-NH₂), Grupos fosfato (-PO₄), Grupos éster (-COO-).

4.5.4 Análisis elemental

El análisis elemental de los biosurfactantes se realizó por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y microanálisis tipo energía dispersiva de rayos X, con la finalidad de establecer un perfil de composición integral de cada muestra. En la Tabla 15 se muestran las composiciones en % masa de los elementos químicos que constituyen a cada uno de los biosurfactantes. Las muestras contienen carbono (transición $K\alpha=0.277$ keV), oxígeno (transición $K\alpha=0.525$ keV), nitrógeno ($K\alpha=0.485$ keV) y sodio (transición $K\alpha=1.041$ keV).

El análisis elemental de los biosurfactantes obtenidos en este estudio presentó en mayores proporciones al nitrógeno, carbono y oxígeno, elementos claves que componen a un lipopéptido. Los lipopéptidos presentan enlaces covalentes denominados peptídicos que se presentan entre el grupo carboxilo y el grupo amino de los aminoácidos (Madigan et al., 2018).

Tabla 15. Composición elemental en % masa de los BS microbianos

Elemento químico	B ₂	B ₃	B ₇	H ₁	H ₂	H ₅
C	47.04	46.15	47.23	61.52	60.23	55.83
N	8.91	9.02	9.13	16.92	14.36	12.58
O	32.18	32.45	32.05	19.46	24.09	24.85
Na	4.24	4.01	4.27	0.72	0.25	2.57
Mg	1.65	1.12	1.49	-	0.29	-
P	3.31	2.95	3.21	0.53	0.45	1.16
K	2.21	2.35	2.18	0.30	0.10	1.63

El análisis elemental es crucial para entender la composición química, verificar la pureza y optimizar procesos en diversas industrias, incluyendo la producción de biosurfactantes. Ayuda con la Identificar los elementos presentes en la molécula. Determina la proporción de los elementos que lo componen. Además, favorece a entender la estructura y propiedades del biosurfactante.

4.5.5 Determinación de pH

El pH de los biosurfactantes fue en promedio de 6.9. El valor de pH encontrado en este estudio es similar a lo reportado por otros investigadores sobre biosurfactantes. Araji et al. (2007) caracterizaron un biosurfactante producido por la cepa bacteriana *B. licheniformis* con base en lipopéptidos teniendo un pH de 7.2; Gobbert et al. (1884) y Guerra et al. (1984), mencionan que el pH de los medios tiene un papel muy importante para la producción de biosurfactante, ambos artículos mencionan un pH de 6 y 6.5 para una máxima producción de biosurfactante.

La determinación del pH es fundamental para entender las propiedades, la estabilidad y la compatibilidad de los biosurfactantes, así como para garantizar su seguridad y eficacia en diversas aplicaciones industriales. Es importante mencionar que el pH afecta la estabilidad de los biosurfactantes y la compatibilidad con otros componentes depende del pH. Además, en sus propiedades fisicoquímicas, el pH influye en la carga y la hidrofobicidad y también afecta la solubilidad y la dispersión. En cuestión de actividad

biológica, el pH puede afectar la actividad enzimática y la actividad antimicrobiana depende del pH.

4.5.6 Determinación de concentración micelar crítica

Los valores obtenidos para la CMC de acuerdo a la tensión superficial se muestran en la Tabla 16 de los biosurfactantes. En la Figura 36 se muestra una disminución de la tensión superficial a diferentes concentraciones de biosurfactante. El valor de la concentración micelar crítica fue variado desde de 0.12% peso y no se presenta una variación significativa con la temperatura a 30 °C.

Conocer la CMC es importante por varias razones. En propiedades fisicoquímicas, indica la concentración a partir de la cual se forman micelas y determina la estabilidad y la solubilidad del biosurfactante. En cuestión de eficacia y eficiencia, la CMC afecta la capacidad de solubilizar sustancias hidrofóbicas e influye en la eficacia de la limpieza y la remoción de contaminantes. En las aplicaciones industriales la CMC es crucial en procesos de limpieza y desinfección. También afecta la eficacia en aplicaciones agrícolas y ambientales. En la estabilidad y compatibilidad la CMC puede afectar la estabilidad del biosurfactante e influye en la compatibilidad con otros componentes. Los factores que influyen en la CMC son: Temperatura, pH, concentración de sal y presencia de otros surfactantes.

Los lipopéptidos incrementan la solubilidad de los hidrocarburos incorporándolos en las cavidades hidrofóbicas de las micelas, y por lo general, presentan baja concentración micelar crítica. La concentración micelar crítica de los biosurfactantes en disoluciones acuosas varía con la estructura de éstos (Deshpande et al., 1999). Un biosurfactante cuyo valor esté por debajo de su concentración micelar crítica (CMC) será más efectivo si tiene la capacidad de solubilizar contaminantes en bajas concentraciones y, al mismo tiempo, minimiza la exposición a sustancias tóxicas, reduciendo los posibles efectos adversos sobre los microorganismos presentes en el suelo. (Lee et al., 2005). Es notable

que la aplicación de biosurfactante con concentraciones por encima de su CMC, además de costosa pueda ser tóxica para los microorganismos (Riojas et al., 2010).

El valor de la CMC encontrado en este estudio es similar al reportado por otras investigaciones (Dinis et al., 2014; Janek et al., 2013; Price et al., 2012; Ferhat et al., 2011). En la Tabla 16 se muestran los resultados obtenidos de la CMC de los biosurfactantes analizados.

La concentración micelar crítica es un intervalo de concentraciones, no un valor exacto y absoluto, ya que las transiciones de fase ocurren paulatinamente (Aparicio, 2012). En el mismo contexto, Thies et al. (2014) señalan que el agente biosurfactante con concentraciones por arriba de la CMC puede ser apropiado para el lavado de suelos, pero estas altas concentraciones pueden ser inapropiadas para la biorremediación, datos que contrastan con Kim et al. (2001), quienes encontraron que la solubilidad de los hidrocarburos policíclicos aromáticos es proporcional a las concentraciones de los biosurfactantes, por encima de la CMC ésta mejora, mientras que por debajo o cerca de la CMC la solubilidad de los hidrocarburos policíclicos aromáticos es menor.

Tabla 16. CMC de los BS microbianos

Cepa Microbiana	CMC %
B₂	0.4
B₃	0.4
B₇	0.7
H₁	0.4
H₂	0.2
H₅	0.4

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

La variedad de especies de cepas microbianas adaptadas en medios estresantes con 11.60 mg L^{-1} de petróleo (agua congénita) fueron escasas. Sin embargo, se aislaron ocho cepas bacterianas y 5 cepas fúngicas, de las cuales tres cepas bacterianas y tres cepas fúngicas demostraron tener buena actividad de crecimiento usando como única fuente de carbono al petróleo crudo. Estos tuvieron buena capacidad de sintetizar biosurfactante en cortos intervalos de tiempo.

Los biosurfactantes producidos por las cepas microbianas, presentan actividad de superficie y propiedades emulsificantes, por lo que pueden incrementar la biodisponibilidad de los hidrocarburos con el fin de permitir su biodegradación. El índice de emulsión de los biosurfactantes producidos por las cepas microbianas hacen a estos biosurfactantes prometedores en aplicaciones para la industria petrolera, como por ejemplo la recuperación mejorada de hidrocarburos; mejorando el drenaje de aceite en pozos petroleros, en la limpieza de buque tanques, en el transporte y almacenamiento de petróleo crudo, etc.

Los biosurfactantes tienen buena capacidad de reducir la tensión superficial a bajas CMC y presentan buen índice de emulsión; con base en estas características pueden ser aplicados para emulsionar el petróleo remanente proveniente de un derrame de petróleo crudo en aguas y suelos, evitando la mortandad de especies de alta importancia ecológica como son las presentes en los ecosistemas.

5.2 Recomendaciones

Estudios de aplicaciones específicas en la industria

- I. Evaluación de la eficacia de los biosurfactantes en la remoción de contaminantes en suelos y agua.
- II. Estudio de la actividad antimicrobiana y antifúngica en diferentes matrices (alimentos, cosméticos, etc.).
- III. Investigación de la capacidad de los biosurfactantes para mejorar la solubilidad y biodisponibilidad de fármacos.

Optimización de procesos de producción

- I. Estudio de la influencia de factores como temperatura, pH y concentración de nutrientes en la producción de biosurfactantes.
- II. Desarrollo de métodos de purificación y concentración más eficientes.
- III. Evaluación de la escalabilidad y viabilidad económica de la producción de biosurfactantes.

Análisis de la estabilidad y compatibilidad

- I. Estudio de la estabilidad de los biosurfactantes en diferentes condiciones de almacenamiento y transporte.
- II. Evaluación de la compatibilidad con otros componentes en formulaciones industriales.
- III. Investigación de la influencia de la temperatura y la humedad en la estabilidad de los biosurfactantes.

Comparación con surfactantes sintéticos

- I. Evaluación de la eficacia y eficiencia de los biosurfactantes en comparación con surfactantes sintéticos.
- II. Estudio de la toxicidad y biodegradabilidad de los biosurfactantes en comparación con surfactantes sintéticos.

Desarrollo de nuevos productos y tecnologías

- I. Creación de formulaciones innovadoras que combinen biosurfactantes con otros componentes.
- II. Desarrollo de tecnologías de liberación controlada de biosurfactantes.
- III. Investigación de la aplicación de biosurfactantes en tecnologías emergentes (nanotecnología, biotecnología, etc.).

Colaboraciones y aplicaciones interdisciplinarias

- I. Colaboración con investigadores de otras disciplinas (biología, química, ingeniería, etc.) para explorar nuevas aplicaciones.
- II. Evaluación de la viabilidad de los biosurfactantes en diferentes industrias (alimentaria, farmacéutica, textil, etc.).

5.3 REFERENCIAS CITADAS

- A. Martínez-Velasco, C. Lobato-Calleros, B.E. Hernández-Rodríguez, A. Román Guerrero, J. Álvarez-Ramírez, E. Jaime Vernon-Carter, High intensity ultrasound treatment of faba bean (*Vicia faba* L.) protein: Effect on surface properties, foaming ability and structural changes, *Ultrasonics Sonochemistry* (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.007>
- Almazán V., González J., Pérez J., Dieguez F., Villaverde M., Pérez G., Joseph N. y Gan R. (2000). Purificación e Identificación de la Naturaleza Química de un Tensoactivo Producido por *Pseudomonas aeruginosa* Cepa Ido-330. *Revista Biología*. 14(2), 172-177.
- Amani H., Reza H., Hossein M., Haghoghi M y Reza M. (2009). Scale up and application of Biosurfactant from *Bacillus subtilis* in Enhances Oil Recovery. *Appl Biochem Biotechnol*.
- Aparicio R. (2012). Determinaciones de las concentraciones micelares críticas (CMC) para el sistema p-Fluorobenzoato del cetiltrimetilamonio (CTAPFB)/Agua. Tesis de licenciatura. Centro universitario de ciencias exactas e ingenierías. División de ingeniería química. Departamento de ingeniería química. Universidad de Guadalajara. Jalisco, México. 38 pp.
- Ayirala S. y Rao D. (2006). Solubility, miscibility and their relation to interfacial tension in ternary liquid systems. *Fluid fase equilibria*. 249, 82-91.
- Bagheri T., Shourian M., Roostaazad R., Rouholamini A., Reza M. y Akbari K. (2009). An Efficient Biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, Isolated from Oil Excavation Area in South of Iran. *Colloids and surfaces B: Biointerfases*. 1-11.
- Banat I., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M., Fracchia L., Smyth T. y Marchant R. (2010). Microbial biosurfactant production, applications of microbial surfactant. *Appl Microbiol Biotechnol*. 53, 495-508.
- Bhairi S. (2001). Detergen tension superficial: a guide to the properties and uses of detergen tension superficial in biological systems. Calbiochem-Novabiochem Corporation. 41.
- Briceyda Jeanethe Pérez Roldan (2006). Descripción de las características macroscópicas, de cultivo in vitro de cepas de pleurotus aisladas en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Cabrero, C., y Barea, JL (2009). Ecología fúngica en ecosistemas mediterráneos. En *Fungal Diversity and Climate Change* (pp. 23-42). Springer, Berlín, Heidelberg.
- Cameotra S. y Bollag J. (2003). Biosurfactantenhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec*. 33, 111-126.
- Changchang Fu, Xiangquan Li, Jianfei Ma, Lingxia Liu, Ming Gao, Zhanxue Bai (2018). A hydrochemistry and multi-isotopic study of groundwater origin and hydrochemical evolution in the middle reaches of the Kuye River basin, *Applied Geochemistry*, Volume 98, Pages 82-93, ISSN 0883-2927, DOI.org/10.1016/j.apgeochem.2018.08.030.

- Cooper D. y Goldenberg B. (1987). Surface-Active agent tension superficial front two *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* 53, 224-229.
- Correa B., Colombo F. y Ayub M. (1999). Production of biosurfactant tension superficial by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *R. Microbiol.* 30, 231-236.
- De Gennes PG, Taupin C. (1982) Microemulsions and the Flexibility of Oil/Water Interfaces. *J. Phys. Chem.* 86: 2294–2304.
- Dejun D., Chenglong L., Quanyi J. y Pingcang W. (1999). Systematic Extensive laboratory Studies of Microbial EOR Mechanisms and Microbial EOR Application Result tension superficial in Changqing Oilfield. *Society of Petroleum Engineers.* 54380, 1-9.
- Delgado N., Ysambertt F., Montiel C., Chávez G., Cáceres A., Bravo B. y Márquez N. (2007). Evaluation of Oil-in water Emulsions with No ionic and Anionic Surfactant Mixtures for Potential Use in the Oil Industry. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia.* 30(2), 118-127.
- Desai J. y Banat I. (1997). Microbial Production of Surfactant tension superficial and Their Commercial Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 61(1), 47-64.
- Deshpande S., Shiau B., Wade D., Sabatini D. y Harwell J. (1999). Surfactant selection for enhancing ex situ soil washing. *Pergamon.* 33, 351-60.
- Donahue D. y Bartell F. (1952). The Boundary Tension at Water-Organic Liquid Interfaces. *J. Phys. Chem.* 56, 480-484.
- Donaji J., sergio A., y Jorge G. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *rev. int. contam. ambient.* 26 (1), 65-84.
- Emegwalu C. (2009). Surfactant Flooding as a Possibility for the Norne E-segment. *Norwegian University of Science and Technology. Department of Petroleum Engineering and Applied Geophysics.*
- Fantini A. (2014). *OPEC Annual Statistical Bulletin.* Vienna: Organization of the Petroleum Exporting Countries.
- Ferhat F., Mnif, S., Badis A., Eddouaouda K., Alouaouil R., Boucherit A., Mhiri N., Moulai-mostefa N. y Sayadi S. (2011). Screening and preliminary Characterization of biosurfactant produced by *Chrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration and Biodegradation.* 65, 1182-1188. doi: 10.1016/J.IBIOD.20011.07013.
- García Rico, R. O. y Herrera Arias, F. C. (2007). Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa*: estudio preliminar *in vitro*. *Revista de la Facultad de Ciencias Basicas,* Vol.5, núm. 2, pp. 68-79.
- Geetha, S.; Banat, I.M. & Joshi. S.J. (2018) Biosurfactants: Production and pontencial application in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,* 14: 23-32. Doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.010.

- Georgiou G., Lin C. y Sharma M. (1992). Surface-active compounds from microorganisms. *Biotechnol.* 10, 60-65.
- Hamilton R. y Hamilton S. (1992). *Lipid Analysis*, IRL Press, the practical Approach Series, U.S.A. 65-93.
- Hernández M., Ojeda M., Martínez J., Villegas V. y Córdova Y. (2011). Optimal parameters for the develop of the hydrocarbonoclastic Microorganism *Proteu* sp. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 11(1), 29-43.
- Hitzman O. y Dennis M. (2004). Recentension superficial Successes: MEOR using synergistic H2S Prevention and Increased Oil Recovery System. Society of Petroleum Engh.
- Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) (2011) Composición del petróleo. Extraído el 10 de febrero del 2012 desde: <http://www.imp.mx/petroleo/?imp=comp>
- Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) (2011) Origen de petróleo. Extraído el 18 de enero del 2012 desde: <http://www.imp.mx/petroleo/?imp=origen>
- Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) (2011) Teoría de Engler. Extraído el 25 de enero del 2012 desde: <http://www.imp.mx/petroleo/?imp=engler>
- Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) (2011) Tipos de petróleo. Extraído el 22 de febrero del 2012 desde: <http://www.imp.mx/petroleo/?imp=tipos>
- Janek T., Lukaszewicz M. y Krasowska A. (2013). Identification and characterization of biosurfact produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 110, 379-386. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.05.008.
- Karant N., Gowthaman M. y Veenanadig N. (2000). Scale up studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 22, 95-99.
- Katime I., Quintana J. y Villacampa M. (2003). Micelas. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* 4 (2), 123-151.
- Kim I., Park J., y Kim K. (2001). Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic Hydrocarbons using nonionic Surfactant in soil slurry. *Applied Geochemistry.* 16, 1419-1428.
- Kosaric N. (2001). Biosurfactant and their application for soil bioremediation. *Food Technol. Biotechnol* 39 (4) 295–304.
- Kuiper I., Legendijk E., Pickford R., Derrick J., Lamers G., Thomas-Oates J., Lugtembeg B. y Bloemberg G. (2004). Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactant, putisolvins I and II, which inhibit biofilm Formation and break down existing biofilms. *Mol Microbiol.* 51, 97-113.
- Lake L. y Walsh M. (2008). Enhanced Oil Recovery Field Data Literature Search. Department of Petroleum and Geosystems Engineering University of Texas at Austin.
- Lee D., Kim E. y Chang H. (2005). Effect of twen surfactant component for remediation of toluene contaminated groundwater. *Geosciences Journal.* 9, 261-267.
- Lin S. (1996). Biosurfactantension superficial: recent advances. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 66, 109-120.

- Luján Urseler, Noelia, Bachetti, Romina Andrea, Damilano, Gabriela, Morgante, Verónica, Ingaramo, Rosa Natalia, Saino, Verónica, & Morgante, Carolina Andrea. (2019). CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y USOS DEL AGUA SUBTERRÁNEA EN ESTABLECIMIENTOS AGROPECUARIOS DEL CENTRO-SUR DE CÓRDOBA, ARGENTINA. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 35(4), 839-848. Epub 22 de diciembre de 2020. doi.org/10.20937/rica.2019.35.04.06
- Madigan M., Martinko M., Stahl A. y Clark D. (2018). *Brock Biology of microorganisms*. 18a. Edition. Pearson Higher education. España. 1152 pp.
- Mancilla, R., Mesa, H., 2012. Metodología para el manejo de aguas de producción en un campo petrolero. Tesis de pregrado. Facultad de Ingeniería Físico-Químicas, Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.
- Marchant R. y Banat I. (2012). Microbial biosurfactant tension superficial: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in Biotechnology*. 30, 558-565.
- Martienssen M., Reichel O. y Schirmer M. (2003). Use of surfactant tension superficial to improve the biological degradability of petroleum hydrocarbons. *Chemie Ingenieur Technik*. 75(11), 1749-1755.
- Méndez C., Vergaray G., Béjar V. y Cárdenas K. (2007). Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno. *Revista Perú. Biol.* 13(3), 203-205.
- Miranda M., Delgadillo J., Alarcón A. y Ferrera R. (2007). Degradación de fenantreno por microorganismos en la rizósfera del pasto alemán. *Revista Terra Latinoamericana*. 25 (1), 25-33.
- Mohammad A., Mabrouk M. y Abdel H. (2008). Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BIOSURFACTANTE5. *Appl Biochem Biotechnol*. 150, 305-325.
- Morales-Bautista, C. M., Lobato García, C. E., Méndez-Olán, C., & Alor Chávez, M. D. J. (2016). Evaluación del tratamiento del intercambio catiónico en dos suelos aluviales contaminados con aguas congénitas. *Interciencia*, 41(10).
- Mukherjee A. y Das K. (2007). Comparison of lipopeptide biosurfactant production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: some industrial applications of biosurfactant. *Process biochem*. 42, 1191-1199.
- Mukherjee S., Das P. y Sen R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactant tension superficial. *Trends Biotechnol*. 24, 509-515.
- N. Youssef, D.R. Simpson, K.E. Duncan, M.J. McInerney, M. Folmsbee, T. Fincher, R. M. Knapp (2007). In Situ Biosurfactant Production by Bacillus Strains Injected into a Limestone Petroleum Reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (4) 1239-1247. DOI: 10.1128/AEM.02264-06.
- Ojeda M., Dominguez M., Hernandez M. y Zavala J. (2015). Biosurfactant production by strains of *Azospirillum* isolated from petroleum-contaminated sites water, air and soil pollu. Doi:10.1007/511270-015-2659-0.

- Ojeda-Morales, M.E., Domínguez-Domínguez., Hernández-Rivera, M.A. (2016). Biosurfactant Synthesized by *Azospirillum lipoferum* ALM1B2: Characterization and Application for Environmental Protection. *Water Air Soil Pollut* 227, 181. Doi.org/10.1007/ss11270.016-2871-6.
- Olguín E., Hernández M. y Sánchez G. (2007). Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitoremediación y restauración. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 23(3), 139-154.
- Oscar Arath Grageda-Cabrera, Sarahyt Santamaría González-Figueroa, José Antonio Vera-Nuñez, Juan Francisco Aguirre-Medina, Juan José Peña-Cabriales (2018). Efecto de los biofertilizantes sobre la asimilación de nitrógeno por el cultivo de trigo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas volumen 9 número 2 15 de febrero - 31 de marzo, 2018*.
- PEMEX (2013). Anuario Estadístico 2013. México: Petróleos Mexicanos.
- PEMEX (2014). Anuario Estadístico 2003-2013. México: Petróleos Mexicanos.
- PEMEX (2018). Anuario Estadístico 2017-2018. México: Petróleos Mexicanos.
- Rahman P. y Gakpe. (2008). Production, Characterisation and Applications of Biosurfactant Review. *Biotechnology*. 7 (2), 360-370.
- Ramírez (2001). Manual de Prácticas de Microbiología General. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
- Ramírez Arrieta, Olga Maria; Rivera Rivera, Angela Patricia; Arias Marin, Lida; Rojano, Benjamín Alberto; Ruiz, Orlando; Cardona Gallo, Santiago Alonso. (2012). Biorremediación de un suelo con diesel Mediante el uso de microorganismos autóctonos *Gestión y Ambiente*, vol. 15, núm. 1, febrero-mayo, 2012, pp. 27-39.
- Raza Z., Khan M. y Khalid Z. (2011). Physicochemical and surface active properties of biosurfactant tension superficial produced using molasses by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Journal of environmental Science and Health part*. 42, 73-80. doi 10.1080/10934520601015784.
- Riojas G., Torres B., Mondaca F., Balderas C., Gortares D. y Moroyoqui P. (2010). Efectos de los surfactantes en la biorremediación de los suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Química Viva*. 3, 121-137.
- Rodríguez C. (1982). Improved médium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 44, 990-991.
- Rodríguez L., Teixeira J., Oliveira R. y Van der Mei H. (2006). Response surface optimization of the medium componen for the production of biosurfactant by probiotic bacteria. *Process Biochem*. 41, 1-10.
- Rojas, Carlos, Rincón, Nancy, Díaz, Altamira, Colina, Gilberto, Behling, Elisabeth, Chacín, Elsa, & Fernández, Nola. (2008). Evaluación de una unidad de flotación con aire disuelto para el tratamiento de aguas aceitosas. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 31(1), 50-57.
- Ron E. y Rosemberg E. (2002). Biosurfactantension superficial and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. 13, 249-252.

- Ron E. y Rosenberg E. (2001). Minireview: natural roles of biosurfactantension superficial. Environ. Microbiol. 3, 229-236.
- Rosenberg E., Schwartz Z., Tenenbaum A., Rubinovitz C., Legmann R. y Ron E. (1989). A microbial polymer that changes the surface properties of limestone: Effect of biodispersan in grinding limestone and making paper. J. Disper. Sci. Technol. 10, 241-250.
- Satter, A. y Iqbal, G. M. (2016). Enhanced oil recovery processes: termal, chemical, and miscible floods. Recervoir Enginnering. The Fundamentals, Simulation, and Management of Conventional and Unconventional Recoveries: 313-337. Doi.org/10.1016/B978-0-12-800219-3.00017-6.
- Schramm L. (2000). Surfactantension superficial: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry. Cambridge University Press. Cambridge, RU. 621 pp.
- Soberón G., Lépine F. y Déziel E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol Biotechnol. 68, 718-725.
- Solís-Castro, Y; Zúñiga-Zúñiga, L; Mora-Alvarado, D. (2018). La conductividad como parámetro predictivo de la dureza del agua en pozos y nacientes de Costa Rica. Tecnología en Marcha. Vol. 31-1. Pág 35-46. DOI: 10.18845/tm.v31i1.3495.
- Sulbarán M., Bahsas A., Velásquez W., y Rojas L. (2005). Caracterización de Biosurfactantes producidos por *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de emulsiones de petróleo pesado. Maracaibo, Venezuela. Ciencia 13(2), 228-239.
- Suwansukho P., Rukachisirikul V., Kawai F., H-Kittikun A., (2008). Production and applications of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4. Songklanakarin J. Sci. Technol. 30, 87e93.
- Tang X., Zhu Y. y Men Q. (2007). Enhanced crude oil biodegradability of *Pseudomonas aeruginosa* ZJU after preservation in crude oil-containing medium. World J. Microb. Biot. 23, 7-14.
- Thavasi R., Subramanyam V., Jayalakshmi S., Balasubramanian T. y Banat I. (2009). Biosurfactant Production by *Azotobacter Chroococcum* Isolated From The Marine Environment. Mar Biotechnol. 11, 551-556. doi: 10.1007/s10126-008-9162-1.
- Thies S., Schübel B., Kovacic F., Rosenau F., Hausmann R. y Jaeger K. (2014). Heterologous production of the lipopeptide biosurfactant *serrawettin* W1 in *Escherichia coli*. J Biotechnol. 181, 27-30.
- Tristán López J. D., Sánchez Meraz W., Mariel Cárdenas J., González Amaro A. M., Gutiérrez Cantú F. J., Mariel Murga H. (2015). Evaluación de carga bacteriana en brackets metálicos versus brackets cerámicos. Revista mexicana de ortodoncia. Vol. 3, Núm. 4. Pp 228-232.
- Van Bogaert I., Saerens K., De Muynck C., Develter D. y Soetaert W. (2007). Microbial Production and Application of Sophorolipidos. Appl Microbiol Biotechnol. 76, 32-43.
- Vidali M. (2001). Bioremediation: an overview. Pure Appl. Chem. 73, 1163-1172.
- Wei Li, Ruben Orozco, Natalia Camargos, and Haizhou Liu (2017). Mechanisms on the Impacts of Alkalinity, pH, and Chloride on Persulfate-Based Groundwater Remediation Department of Chemical and Environmental Engineering, University of California, Riverside, California 92521,

United States Program of Environmental Toxicology, University of California, Riverside, California 92521, United States.

Yajuan Shi, Fangyou Yan, Qingzhu Jia, Qiang Wang (2019). Norm descriptors for predicting the hydrophile-lipophile balance (HLB) and critical micelle concentration (CMC) of anionic surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. Elsevier. doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123967.

Zeng G., Zhong H., Huang G. y Fu H. (2005). Physicochemical and microbiological effect on the remediation of HOC-contaminated soil. *Prog. Nat. Sci.* 15, 577-585.

BP (2015). BP Statistical Review of World Energy, June 2015. Disponible en <http://www.bp.com/en/global/corporate/about-bp/energy-economics/statistical-review-of-world-energy.html>

Rodríguez, M. (2024). Avances en Técnicas de Recuperación Mejorada de Petróleo. *Inspenet*. <https://inspenet.com/articulo/avances-tecnicas-de-recuperacion-mejorada-de-petroleo/>

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
México.

Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional	
Título de Tesis:	BIOSURFACTANTES SINTETIZADOS POR MICROORGANISMOS PROVENIENTES DE AGUA CONGÉNITA CON POTENCIALES APLICACIONES EN LA INDUSTRIA PETROLERA
Autores de la Tesis:	Ing. Jesús Octavio Macías Mendoza. Dr. Miguel Ángel Hernández Rivera
ORCID:	https://orcid.org/0000-0002-3459-5722 https://orcid.org/0000-0002-8007-7221
Resumen de la Tesis:	<p>Los microorganismos originan una diversidad de compuestos bipolares, anfipáticos, con actividad superficial e interfacial; los biosurfactantes son partes de la membrana celular de bacterias y hongos. En la actualidad los biosurfactantes están obteniendo mayor interés con respecto a los surfactantes químicos debido a las grandes ventajas que representan para el medio ambiente, los biosurfactantes tienen un amplio campo de aplicación, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas pueden ser utilizados en las diferentes industrias, incluyendo la biorremediación de ecosistemas contaminados con hidrocarburos. Los surfactantes químicos, no son ecológicos, tienen baja eficiencia a la biodegradación y son considerados altamente tóxicos. Sin embargo, la información de análisis fisicoquímicos de biosurfactantes es escasa.</p> <p>En el presente trabajo se aisló microorganismos de agua congénita proveniente de baterías de separación, obteniendo ocho cepas bacterianas y siete fúngicas. Para la selección de los microorganismos se sembraron las cepas en Agar nutritivo con petróleo estéril como única fuente de carbono; de este proceso se seleccionaron seis cepas; para la producción de biosurfactante se empleó medio mineral líquido comercial, el mismo que fue separado</p>

	<p>de la masa microbiana, mediante la centrifugación y filtración. Los metabolitos fueron evaluados fisicoquímicamente. Los resultados obtenidos indicaron que los biosurfactantes son lipopéptidos de acuerdo a la cromatografía en capa fina y espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier, disminuyen tensión superficial del agua hasta 45 mN m^{-1}. Por lo tanto, los biosurfactantes tienen posibilidad de aplicación en las diferentes industrias.</p>
<p>Palabras Claves de la Tesis:</p>	<p><i>Palabras clave:</i> Biosurfactantes, petróleo, tensión superficial, concentración micelar crítica.</p>
<p>Referencias citadas:</p>	<p>De la pagina 106 a la 112</p>

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco México.