



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**RECUPERACIÓN DE PETRÓLEO UTILIZANDO BIOSURFACTANTES
SINTETIZADOS POR CEPAS BACTERIANAS NATIVAS DEL ESTADO DE
TABASCO, MÉXICO**

PRESENTA

FATIMA GARCÍA FRÍAS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

**M.C REYNA LOURDES
FOCIL MONTEERRUBIO
DIRECTOR**

**DR. MIGUEL ÁNGEL
HERNÁNDEZ RIVERA
CO-DIRECTOR**

VILLAHERMOSA, TABASCO

2023



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN

Villahermosa, Tab., a 21 de Junio de 2023


ASUNTO: Autorización de Modalidad de Titulación

C. LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON
JEFE DEL DEPTO. DE CERTIFICACIÓN Y TITULACION
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTE

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado, informo a usted, que en base al reglamento de titulación vigente en esta Universidad, ésta Dirección a mi cargo, autoriza a la **C. FÁTIMA GARCÍA FRÍAS** egresada de la Maestría en **CIENCIAS AMBIENTALES** de la División Académica de **CIENCIAS BIOLÓGICAS** la opción de titularse bajo la modalidad de Tesis de Maestría denominado: **"RECUPERACIÓN DE PETRÓLEO UTILIZANDO BIOSURFACTANTES SINTETIZADOS POR CEPAS BACTERIANAS NATIVAS DEL ESTADO DE TABASCO, MÉXICO"**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para saludarle afectuosamente.

A T E N T A M E N T E


DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

U.J.A.T.
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

C.c.p. - Expediente Alumno de la División Académica
C.c.p.- Interesado



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN**

JUNIO 21 DE 2023

**C. FATIMA GARCÍA FRÍAS
PAS. DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS AMBIENTALES
P R E S E N T E**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales titulado: **"RECUPERACIÓN DE PETRÓLEO UTILIZANDO BIOSURFACTANTES SINTETIZADOS POR CEPAS BACTERIANAS NATIVAS DEL ESTADO DE TABASCO, MÉXICO"**, asesorado por la M. en C. Reyna Lourdes Focil Monterrubio y Dr. Miguel Angel Hernández Rivera, sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado integrado por la Dra. Erika Escalante Espinosa, Dra. Marcia Eugenia Ojeda Morales, M. en C. Reyna Lourdes Focil Monterrubio. Dr. Juan Gabriel Álvarez Ramírez y MCA. Rosa Mathá Padrón López.

Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE**

**DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR**

**U.J.A.T.
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



DIRECCIÓN

C.c.p.- Expediente del Alumno.
C.c.p.- Archivo

**KM. 0.5 CARR. VILLAHERMOSA-CÁRDENAS ENTRONQUE A BOSQUES DE SALOYA
Tel. (993) 358-1500 Ext. 6400 y 6401, e-mail: direccion.dacbiol@ujat.mx**

Usar papel reciclado economiza energía, evita contaminación y despilfarro de agua y ayuda a conservar los bosques

www.ujat.mx

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

CARTA AUTORIZACIÓN


El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis de Maestría denominado: **“RECUPERACIÓN DE PETRÓLEO UTILIZANDO BIOSURFACTANTES SINTETIZADOS POR CEPAS BACTERIANAS NATIVAS DEL ESTADO DE TABASCO, MÉXICO”**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el día 21 de junio del dos mil veintitrés

AUTORIZO



FÁTIMA GARÍA FRÍAS



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División Académica
de Ciencias Biológicas.

Jefatura de Posgrado.



Villahermosa, Tabasco a 19 de junio de 2023

C. FATIMA GARCÍA FRÍAS

EGRESADA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTE

En cumplimiento de los lineamientos de la Universidad, y por instrucciones de la Dirección de Posgrado, se implementó la revisión de los documentos recepcionales (tesis), a través de la plataforma Turnitin iThenticate para evitar el plagio e incrementar la calidad en los procesos académicos y de investigación en esta División Académica. Esta revisión se realizó en correspondencia con el Código de Ética de la Universidad, el Reglamento General de Estudios de Posgrado, el Código Institucional de Ética para la Investigación y con los requerimientos para los posgrados en el SNP-CONAHCyT.

Por este conducto, hago de su conocimiento las observaciones y el reporte de originalidad de su documento de tesis. Con el objetivo de fortalecer y enriquecer el programa de posgrado, el responsable del programa realizó la revisión del documento en la plataforma iThenticate, obteniendo el reporte de originalidad, el índice de similitud y emitió las siguientes sugerencias y recomendaciones para dar seguimiento en el documento de tesis del proyecto de investigación: **"Recuperación de petróleo utilizando biosurfactantes sintetizados por cepas bacterianas nativas del Estado de Tabasco, México"**.

OBSERVACIONES:

1. **El índice de similitud obtenido fue de 02%**, el cual se ubica dentro del estándar de tolerancia de acuerdo a las Políticas y Lineamientos para el uso y manejo del Software Antiplagio de la UJAT. Se demuestra el nivel de originalidad del documento y de la investigación.

C.c.p. ARCHIVO



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División Académica
de Ciencias Biológicas.

Jefatura de Posgrado.



2. Las coincidencias detectadas en su mayoría corresponden con elementos del método aplicado en esta investigación. No obstante, se recomienda revisar los párrafos con coincidencias mayores a 30 palabras, en específico con las fuentes prezi.com y repositorio.tecnm.mx
3. **Se adjunta el informe de originalidad de la tesis** obtenido a través de la herramienta Turnitin iThenticate.
4. Finalmente, se le solicita a la C. Fátima García Frías, integrar en la versión final del documento de tesis, este oficio y el informe de originalidad con el porcentaje de similitud de Turnitin iThenticate.

Sin otro particular al cual referirme, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"

DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR DACBIOL

U.J.A.T.
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

C.C.P. Mtra. Reyna Lourdes Fócil Monterrubio. Directora de Tesis.
C.c.p. ARCHIVO

KM. 0.5 CARR. VILLAHERMOSA-CÁRDENAS ENTRONQUE A BOSQUES DE SALOYA

Tel. (993) 358-1500 Ext. 6407. Correo e: posgrado.dacbiol@ujat.mx



Recuperación de petróleo utilizando biosurfactantes sintetizados por cepas bacterianas nativas del Estado de Tabasco, México

INFORME DE ORIGINALIDAD

2%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	www.scribd.com Internet	67 palabras — < 1%
2	Jaimes Sánchez Adriana Isabel. "La inversión extranjera en Pemex producción del 2000 al 2010", TESIUNAM, 2014 Publicaciones	48 palabras — < 1%
3	Ramírez Pacheco Carlos. "Nuevo surfactante en el control e inhibición de asfaltenos en un pozo-yacimiento", TESIUNAM, 2010 Publicaciones	36 palabras — < 1%
4	prezi.com Internet	36 palabras — < 1%
5	repositorio.ucsg.edu.ec Internet	35 palabras — < 1%
6	repositorio.tecnm.mx:8080 Internet	33 palabras — < 1%
7	research.library.mun.ca Internet	28 palabras — < 1%
8	es.scribd.com	

Internet

25 palabras — < 1%

- 9 Infante Suárez Ernesto. "Uso de la metodología Nelson y McNeil para el desarrollo de una prueba piloto de recuperación de aceite con inyección de aire, utilizando simulación numérica", TESIUNAM, 2014
Publicaciones

23 palabras — < 1%

- 10 Rodríguez García Martina Alejandra. "Calidad de vida en pacientes con hipertensión arterial atendidos en la Unidad de Medicina Familiar no. 70 en General Zuazua N. L.", TESIUNAM, 2019
Publicaciones

23 palabras — < 1%

- 11 idoc.pub
Internet

20 palabras — < 1%

- 12 Stefanie P. Glaeser, Peter Kämpfer. " ", Wiley, 2021
Crossref

18 palabras — < 1%

- 13 doczz.net
Internet

18 palabras — < 1%

- 14 dspace.espol.edu.ec
Internet

15 palabras — < 1%

- 15 teses.usp.br
Internet

15 palabras — < 1%

- 16 Sergio González, Edwin Hernández. "Impactos indirectos de los precios del petróleo en el crecimiento económico colombiano", Lecturas de Economía, 2016
Crossref

14 palabras — < 1%

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores de tesis por su paciencia, tiempo y dedicación para orientarme en este trabajo de investigación

A la Dra. Marcia Eugenia Ojeda M. Por darme la oportunidad de ser parte de su equipo y brindarme su apoyo incondicional, por enseñarme lo hermosa que es la vida y por nunca desistir de los sueños

Al laboratorio de biotecnología por regalarme tantos momentos de aprendizaje

A mis compañeros y amigos quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento, alegrías y tristezas y a todas aquellas personas que durante estos años me brindaron su apoyo y lograron que este sueño se haga realidad

México.

DEDICATORIA

Con todo mi amor y cariño a mi esposo Uri Marcial por estar siempre a mi lado, por impulsarme y motivarme para cada día confiar y creer en mí

A mi amado hijo Elias Marcial por ser mi fuente de motivación e inspiración para así poder luchar para que la vida nos depara un mejor futuro

A mis padres por los valores fomentados, por regalarme el privilegio a la educación y por que con sus palabras de aliento me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos

A mi abuelo por guiarme y protegerme, por su increíble fortaleza, por sus consejos que los llevare siempre en mi corazón, gracias siempre por tu amor incondicional

CONTENIDO	
CAPITULO I.....	10
1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL	11
1.2 OBJETIVOS.....	12
1.2.1 Objetivo general	12
1.2.2 Objetivos específicos.....	12
1.3 REVISIÓN DE LITERATURA	13
1.3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES	13
1.3.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL PETRÓLEO.....	14
1.3.3 PROBLEMÁTICA AMBIENTAL	15
1.3.4 PRODUCCIÓN EN MÉXICO Y EN TABASCO.....	17
1.3.5 RECUPERACIÓN PRIMARIA Y SECUNDARIA DE PETRÓLEO	19
1.3.5.1 Métodos de recuperación primaria	19
1.3.5.2 Métodos de recuperación: secundaria.....	21
1.3.5.3 Recuperación terciaria por métodos mejorados (EOR).....	21
1.3.6 Recuperación mejorada de petróleo asistida por microorganismos (MEOR).....	24
1.3.7 Los biosurfactantes en la recuperación mejorada de petróleo.....	27
1.3.7.1 Características y clasificación general de los biosurfactantes	27
1.3.8 EQUIPOS EMPLEADOS EN LA RECUPERACIÓN MEJORADA DE PETRÓLEO ESCALA LABORATORIO	31
1.3.8.1 Uso del core flooding.....	31
1.3.8.2 Uso de la celda de Amott.....	32
1.3.8.3 Uso de las columnas empacadas con arena (sand pack column).....	33
1.3.9 REFERENCIAS	35
CAPÍTULO 2.....	43
CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SURFACTANTE DE MOLÉCULAS ANFIFÍLICAS SINTETIZADAS POR <i>Raoultella</i> <i>planticola</i>	44
RESUMEN	44
2.1 INTRODUCCIÓN	44
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
2.2.1 SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES.....	46
2.2.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	46
2.2.3 OBTENCIÓN DEL CALDO BACTERIANO LIBRE DE CÉLULAS.....	47

2.2.4 SELECCIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES	47
2.2.4.1 Prueba de ensayo hemolítico	47
2.2.4.2 Prueba de gota colapsada.....	48
2.2.4.3 Dispersión de aceite.....	48
2.2.4.4 Índice de emulsión (E24).....	48
2.2.5 CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA BACTERIANA: MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS AISLADAS, TINCIÓN DE GRAM, TAMAÑO CELULAR Y PRUEBAS BIOQUÍMICAS API 20 E	49
2.2.6 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL BIOSURFACTANTE.....	49
2.2.7 IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS POLARES Y GRUPOS FUNCIONALES...	50
2.2.8 TENSIÓN SUPERFICIAL (TS) Y CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA (CMC)	50
2.3 RESULTADOS	50
3.2.1 Selección de cepas productoras de biosurfactantes.....	50
3.2.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	51
3.2.4 SELECCIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES	54
3.2.4.1 Prueba de ensayo hemolítico.....	54
3.2.4.2 Prueba de la gota colapsada.....	56
3.2.4.3 Dispersión de aceite.....	56
3.2.4.4 Índice de emulsión (E24).....	56
3.2.5 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS AISLADAS.....	56
3.2.6 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL BIOSURFACTANTE.....	58
3.2.7 IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS POLARES Y GRUPOS FUNCIONALES DE LÍPIDOS ASOCIADOS A ACCIÓN SURFACTANTE.....	59
3.2.8 TENSIÓN SUPERFICIAL (TS) Y CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA (CMC)	59
2.4 DISCUSIÓN	60
4.2.1 SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES.....	60
4.2.2CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	61
4.2.4 SELECCIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES	62
4.2.4.1 Ensayo hemolítico	62
4.2.4.2 Gota colapsada.....	62
4.2.4.3 Dispersión de aceite.....	63

4.2.4.4 Índice de emulsificación	63
4.2.5 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS AISLADAS.....	64
4.2.6 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL BIOSURFACTANTE.....	65
4.2.7 IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS POLARES Y GRUPOS FUNCIONALES...	66
4.2.8 TENSIÓN SUPERFICIAL (TS) Y CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA (CMC)	66
2.5 CONCLUSIÓN.....	67
2.6 REFERENCIAS	68
CAPITULO 3.....	77
EVALUATION OF OIL RECOVERY IN A SAND-PACKED COLUMN USING A BIOSURFACTANT PRODUCED BY THE BACTERIAL STRAIN <i>Raoultella planticola</i>	78
EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE PETRÓLEO EN COLUMNA EMPACADA CON ARENA EMPLEANDO UN BIOSURFACTANTE PRODUCIDO POR LA CEPA BACTERIANA <i>Raoultella planticola</i>	78
RESUMEN	78
3.1 INTRODUCCIÓN	78
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
3.2.1 CEPA BACTERIANA PRODUCTORA DE BIOSURFACTANTE.....	79
3.2.2 OBTENCIÓN DEL CALDO CRUDO LIBRE DE CÉLULAS	79
3.2.3 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD API DEL PETRÓLEO.....	80
3.2.4 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL PETRÓLEO	80
3.2.5 EFECTO DEL BIOSURFACTANTE EN LA VISCOSIDAD Y DENSIDAD DE LAS EMULSIONES PETRÓLEO-CALDOCRUDO	81
3.2.6 ENSAYO DE RECUPERACIÓN EN COLUMNAS EMPACADAS CON ARENA	81
3.3 RESULTADOS	84
3.3.1 CEPAS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES	84
3.3.3 DETERMINACIÓN DELA DENSIDAD API DEL PETRÓLEO.....	84
3.3.4 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL PETRÓLEO	84
3.3.5 EFECTO DEL BIOSURFACTANTE EN LA VISCOSIDAD Y DENSIDAD DE LAS EMULSIONES PETRÓLEO-CALDO CRUDO	86
3.3.6 ENSAYO DE RECUPERACIÓN EN COLUMNAS EMPACADAS CON ARENA	87
3.4 DISCUSIÓN.....	89
3.4.1 CEPAS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES	89

3.4.4 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL PETRÓLEO	91
3.4.4 EFECTO DEL BIOSURFACTANTE EN LA VISCOSIDAD Y DENSIDAD DE LAS EMULSIONES PETRÓLEO-CALDO CRUDO	91
3.4.6 ENSAYO DE RECUPERACIÓN EN COLUMNAS EMPACADAS CON ARENA	92
3.1 CONCLUSIÓN.....	94
3.1 REFERENCIAS	94
CONCLUSIONES GENERALES.....	100

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1	Clasificación del petróleo con base en grados API	13
Tabla 2	Diámetro del halo en el ensayo hemolítico de las cepas C1, C2, C3 y C4 con caldo libre de células de nitrofoska (N) a diferentes tiempos de cultivo	55
Tabla 3	Resultados de las pruebas para estimar el tiempo de mayor producción de biosurfactantes	55
Tabla 4	Descripción morfológica de las Unidades Formadoras de Colonias	57
Tabla 5	Concentraciones de hidrocarburos de la fracción media identificados de una muestra del petróleo usado.	85
Tabla 6	Hidrocarburos de la fracción ligera identificados en la muestra hidrocarburos	86
Tabla 7	Resumen de los resultados de MEOR haciendo uso de una columna empacada con arena. Las columnas se presentan en promedios	89
Fig. 1	Producción de hidrocarburos por entidad federativa 2015-2019. Fuente: SENER, 2020. (AT = aguas territoriales).	18
Fig 2	Producción de petróleo por tipo a nivel nacional. Fuente: SENER, 2020	19
Fig. 3	Métodos de recuperación de petróleo. Fuente: Speigh, 2016	20
Fig. 4	Etapas de recuperación de petróleo. (bbl: barriles diarios), los porcentajes corresponden a la recuperación de petróleo por cada etapa. Fuente: Speight, 2016.	23
Fig. 5	Diagrama que muestra el incremento del precio del barril de petróleo según la técnica de EOR empleada. Fuente: Tatar, 2018.	25

Fig. 6	Estructura de un ramnolípido con dos moléculas de ramnosa y dos unidades de ácido b-hydroxydecanoico. Fuente: Sajna <i>et al.</i> , 2015.	28
Fig. 7	Molécula del principal isómero de la surfactina (Lipopéptido). Fuente: Yang et al., 2020.	29
Fig.8	Estructura anfifílica representativa de la familia iturina. Fuente: Ambricio y Trupo, 2017.	29
Fig. 9	Estructura una molécula de liposan. Fuente: Sajna <i>et al.</i> , 2015.	30
Fig. 10	Representación esquemática de un equipo para ensayo de coreflooding. Fuente: Darvishi <i>et al.</i> , 2011.	32
Fig. 11	Celda de Amott y proceso de imbibición espontánea. Fuente: Ramírez, 2010	33
Fig. 12	Diseño de una columna empacada con arena.	34
Fig. 13	Modelo estándar de recuperación de petróleo en una columna empacada con arena	35
Fig. 14	Cepa bacteriana C1 y C2 positiva con α hemólisis, Cepa bacteriana C3 y C4 positiva con β hemólisis	51
Fig. 15	Crecimiento de las cepas bacterianas (C1 ■, C2 ♦, C3 ▲, C4●) en medio con nitrofoska. Las curvas se obtuvieron por turbidimetría a una OD600nm	52
Fig. 16	Crecimiento de las cepas bacterianas (C1■, C2 ♦, C3 ▲, C4 ●) en medio con triple 17. Las curvas se obtuvieron por turbidimetría a una OD600nm.	53
Fig. 17	Interacción entre las cepas C1, C2, C3 y C4, y el medio mineral con base de nitrógeno nitrofoska ▲ y triple 17 ■ cada 6 horas, por 96 h.	54
Fig. 18	Micrografías electrónicas de las cepas bacterianas C1 y C3	57
Fig. 19	Pruebas bioquímicas API E20 para la identificación de la cepa bacteriana C3.	58
Fig. 20	Análisis por cromatografía en capa fina del biosurfactante dando positivo para glucolípidos b) Imagen del espectro FT-IR de los grupos funcionales del biosurfactante producido por la cepa <i>Raultella planticola</i>	59
Fig. 21	Medición de la disminución de la TS haciendo uso de un biosurfactante glucolípidos de <i>Raoultella planticola</i> .	60
Fig. 22	Cromatograma de la muestra JKL-	85
Fig. 23	Efecto del caldo crudo en la viscosidad ■ y densidad ● de la emulsión petróleo/caldo crudo	87
Fig. 24	Saturación de la columna con salmuera	88
Fig. 25	Saturación de la columna con petróleo	88

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

CAPITULO I

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El petróleo, también denominado petróleo crudo, es un término que se usa con el fin de definir a un conjunto de sustancias ricas en hidrocarburos que se haya bajo la corteza terrestre a diferentes profundidades, en depósitos o reservorios (Niu *et al.*, 2020; Kögler *et al.*, 2021) El aumento de la demanda de petróleo, sobre todo en los países industrializados (con un crecimiento anual mayor al 1.5 % para el periodo 2020-2030) trae como consecuencia la necesidad de hallar nuevas fuentes de energía, o de buscar nuevas tecnologías que permitan un mejor porcentaje de recuperación de petróleo (Safdel *et al.*, 2017).

En un yacimiento, entre el 55-66 % del petróleo original en el lugar (2/3 partes aproximadamente) queda atrapado en los poros de la roca (El-Sheshtawy *et al.*, 2015), por lo que métodos de recuperación convencionales que hacen uso de polímeros sintéticos, así como de otras sustancias químicas, ponen en riesgo el equilibrio de los ecosistemas y la salud de las poblaciones humanas (Bachman *et al.*, 2014; Kögler *et al.*, 2021).

Ante estos retos ambientales, el uso de tecnologías como la la recuperación mejorada de petróleo asistida por microorganismos, MEOR, por sus siglas en inglés, consisten en una alternativa viable en lo económico y ambiental, ya que hace uso de moléculas orgánicas naturales productos del metabolismo de cepas microbianas como *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Azospirillum*, entre otras (Ojeda-Morales *et al.*, 2016; Geetha *et al.*, 2018; Saravanan *et al.*, 2020). La más importante de esas moléculas son los biosurfactantes, descritos como moléculas anfifílicas de superficie activa, capaces de reducir la tensión superficial e interfacial entre el agua y el aceite, lo que puede mejorar la movilidad de los hidrocarburos en un proceso de recuperación. Comparados con los surfactantes químicos, los biosurfactantes son sustancias menos tóxicas, son biodegradables y son estables a condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Varjani y Upasani, 2017; Jahan *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021). No obstante, una de sus principales desventajas es su elevado costo de producción, lo que depende directamente de su porcentaje de pureza; sus costos pueden variar desde los 10 USD/mg de surfactina al 98 % de pureza, hasta las 2-4 USD/kg cuando forman emulsiones. (Sharma *et al.*, 2020; Dhanya, 2021)

La recuperación mejorada de petróleo es de importancia en México, ya que es uno de los principales países productores de petróleo, ocupando el 11° lugar (The World Factbook, 2020). De acuerdo con cifras reportadas por PEMEX (2020), en México se producían 20,143 000 barriles diarios acumulados de hidrocarburos líquidos a lo largo de todo el año 2019. De ese total 12,739 es petróleo crudo pesado, 5,789 es petróleo crudo ligero y 1,615 es petróleo crudo superligero. En reportes publicados por la SENER (2020), Tabasco fue el principal productor en tierra con 2, 480 922.17 barriles diarios de acumulado anual, y un promedio mensual de 190 840.167 barriles diarios, lo cual abre la puerta a la posibilidad de obtener un beneficio extra al explotar una cantidad adicional en pozos que productivamente están inactivos.

Dada la importancia mencionada, se pueden emplear diferentes métodos para medir la capacidad de recuperación de petróleo adicional en condiciones de laboratorio. Diferentes investigaciones (Castorena-Cortés *et al.*, 2012; Bi *et al.*, 2019; Hadia *et al.*, 2019; Alkan *et al.*, 2020; Haq *et al.*, 2020) menciona el uso de la tecnología de coreflooding, la cual, aunque es muy precisa puede ser compleja y las réplicas continuas de alto costo económico, además los núcleos vivos requieren almacenamiento especial. En cambio, otras tecnologías como las columnas empacadas con arena (Gudiña *et al.*, 2013; Ashis, 2018; Ibrahim, 2018; Elakkiya *et al.*, 2020; Phulpoto *et al.*, 2020; Kögler *et al.*, 2021) son mucho más económicas en comparación, y simulan las condiciones de pozo a escala de laboratorio, permitiendo el diseño de réplicas continuas y simultáneas. Además, proporciona un método apropiado para estudiar la capacidad de microorganismos y sus metabolitos asociados en la recuperación de petróleo en campo (Gudiña *et al.*, 2013).

Ante la escasez de trabajos al respecto en los yacimientos mexicanos, en esta investigación se propone trabajar con bacterias nativas petrofilicas del estado de Tabasco capaces de producir biosurfactantes, los cuales podrían modificar favorablemente las condiciones de extracción de hidrocarburos en campos petroleros maduros en México, con la ventaja además de no afectar el medio ambiente.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad de los biosurfactantes impuros producidos por cepas bacterianas nativas del estado de Tabasco, México, en la recuperación mejorada de hidrocarburos en condiciones de laboratorio.

1.2.2 Objetivos específicos

- Seleccionar un conjunto de cepas productoras de biosurfactantes a partir de un cepario de bacterias petrofilicas.
- Evaluar la producción, purificación y caracterización del biosurfactante producido por las cepas bacterianas.
- Determinar el efecto de la emulsión sobre la viscosidad y densidad del petróleo crudo
- Evaluar la recuperación de petróleo en una columna empacada con arena, con diferentes protocolos de inyección usando diversos tipos de biosurfactantes y un surfactante químico.

1.3 REVISIÓN DE LITERATURA

1.3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

El petróleo es una mezcla de compuestos carbonados que de acuerdo con su punto de ebullición puede ser separado por destilación en diferentes fracciones de pesos moleculares variables. Es un término que se usa con el fin de definir a un conjunto de sustancias ricas en hidrocarburos que se haya bajo la corteza terrestre, a diferentes profundidades, en depósitos o reservorios. Desde el punto de vista etimológico significa “aceite de roca”. Cuando está en estado líquido (crudo) normalmente no es un material uniforme, su composición será diferente con base en la geología de su formación, localización, edad del yacimiento lo mismo que la profundidad del reservorio. De hecho, dos pozos adyacentes no producirán el mismo tipo de petróleo con las mismas características. Por ejemplo, algunos pozos producen gasolinas naturales que pueden usarse como combustibles para motores pesados, mientras que otros producirán asfaltos. Cada tipo de crudo es único con una mezcla de miles de componentes. Las propiedades físico-químicas de cualquier tipo de hidrocarburo no sólo están relacionadas con el número de átomos de carbono, sino con el tipo de enlaces y la presencia de unidades cíclicas (Jafarinejad, 2017).

En lo que respecta a la industria del petróleo, se le puede clasificar según la localización geográfica del reservorio, como es el caso del West Texas Intermedio, Brent, Oman, Maya, Olmeca, entre otros. Incluso por el contenido de azufre, el cual es un elemento no deseado dentro de la mezcla de hidrocarburos, cuando el contenido de azufre es $<1\%$ se le llama petróleo crudo dulce, pero cuando contiene $>1\%$ recibe el nombre de petróleo crudo amargo (Jafarinejad, 2017).

Los diferentes compuestos de petróleo también se clasifican conforme a su volatilidad. Al calentarse los más ligeros se evaporan con facilidad, de tal manera que los más pesados se quedan al tener un punto de ebullición más alto. La Tabla 1 indica una clasificación de los tipos de petróleo según su densidad $^{\circ}\text{API}$. El IMP (2016) divide a los hidrocarburos en ligero, pesado, gas húmedo o seco. En tanto que la industria mundial los clasifica de acuerdo a su densidad API, un parámetro internacional del Instituto Americano del Petróleo, que diferencia las calidades del crudo.

Tabla 1. Clasificación del petróleo con base en grados API

Aceite crudo	Densidad (g/cm^3)	Densidad API
Extra pesado	>1.0	<10.0
Pesado	1.0 - 0.92	10.0 - 22.3
Mediano	0.92 - 0.87	22.3 - 31.1

Ligero	0.87 - 0.83	31.1 – 39
Super ligero	< 0.83	> 39

Fuente: IMP, 2016.

Por lo común el petróleo crudo está compuesto por 4 tipos familias de hidrocarburo. Los alcanos o parafinas, representan entre 15 y 60 % del petróleo crudo; los naftenos o cicloparafinas, entre 30-60 %; los aromáticos, entre 3-30 %; mientras que las resinas y los asfaltenos componen el resto. Los porcentajes relativos de cada uno de los componentes, varía de petróleo a petróleo, lo cual determina sus propiedades (Jafarinejad, 2017). Todos los fluidos del petróleo son el resultado de los procesos termoquímicos que han originado al querógeno, y la composición de los mismos refleja su origen común.

1.3.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL PETRÓLEO

El petróleo, como recurso natural no renovable, a partir del cual se genera la principal fuente de energía a nivel mundial, sigue teniendo un impacto importante en la economía de importaciones y exportaciones en las naciones. Por ejemplo, en las economías donde la importación de petróleo es de suma importancia para su desarrollo, un aumento en los precios del barril por lo general significa malas noticias, ya que no sólo incrementan los precios de los combustibles y los insumos domésticos, sino que también se asocia con el pago de impuestos e intereses a las naciones que exportan el recurso. Ese aumento en los precios del petróleo implica un incremento en la incertidumbre en materia económica y financiera, lo cual tiende a reducir las inversiones, así como el consumo de productos de importación tales como automóviles, alimentos, etc. Pero, por otro lado, desde el punto de vista de los países exportadores de hidrocarburos, un incremento en los precios afecta de forma positiva los ingresos del gobierno, lo cual estimula el crecimiento económico (Charfeddine y Barkat, 2020).

El petróleo es considerado como un producto energético de gran importancia y que además es básico en el desarrollo de la economía a nivel mundial, ya que representa aproximadamente el 40 % del consumo de energía total en el planeta. Tan sólo por dar un ejemplo, alrededor del 94 % de la energía usada en el transporte proviene de la quema de los combustibles basados en hidrocarburos, lo cual resalta aún más su importancia no sólo a nivel económico (Mo *et al.*, 2019).

Después de las crisis económicas que se han generado en la historia de países desarrollados, los economistas se han dado a la tarea de analizar y determinar las causas que las generan, por lo que han establecido una relación entre las fluctuaciones de los precios del petróleo y variables de crecimiento económico como el Producto Interno Bruto, el consumo privado, entre otros. Y aunque parece existir un nexo causal entre las crisis económicas y el aumento

de los precios del petróleo, las pruebas no son completamente concluyentes, sobre todo en las economías de los países desarrollados (González y Hernández, 2016).

El incremento del petróleo tiene un efecto directo, por ejemplo, en los productos derivados del petróleo usados en el sector transporte, afectando con el tiempo los precios de las gasolinas, diésel y otros combustibles. Esto, como un efecto dominó, impacta en los costos de producción, lo que conduce a una reducción en la demanda general de bienes y servicios, lo cual involucra la economía completa de un estado. El aumento en los costos del transporte altera también la cadena de los sistemas de distribución.

Del mismo modo, el aumento de la población mundial, o visto a nivel país, aumentará también la demanda de los sistemas de transporte, lo que implica mayor consumo de combustibles, especialmente de las energías derivadas de la transformación de los hidrocarburos. El aumento de este consumo, en especial de gasolina y diésel en el sector transporte requerirá al mismo tiempo de grandes cantidades de productos derivados del petróleo, si es que se quiere mantener el mismo ritmo de crecimiento en el futuro (Solaymani y Kar, 2019).

En un mundo globalizado es imposible no tener efectos directos o indirectos por causa de las fluctuaciones en el precio del petróleo. Debido a que los combustibles usados en el transporte son los más consumidos; se espera que haya un impacto directo en el aumento de los precios, sobre todo en los países que importan esos productos en los próximos años, lo cual está directamente relacionado con el aumento de la población (Solaymani y Kar, 2019).

1.3.3 PROBLEMÁTICA AMBIENTAL

El petróleo y sus derivados pueden generar episodios de contaminación, y por lo tanto provocar un impacto ambiental, el cual puede definirse como el efecto de las actividades humanas, industrias, negocios o proyectos en los ecosistemas naturales. La contaminación y la generación de desechos están asociadas a la industria del petróleo en sus diferentes actividades y procesamiento de la materia prima, a través de la exploración, desarrollo y producción. Emisiones al aire, agua y desechos sólidos pueden generarse en estos sectores y pueden tener efectos potencialmente deletéreos en los seres vivos. Además, los derrames de petróleo son otra forma de contaminación que puede tener efectos destructivos sobre la vida marina y la zona de costa. Adicional a esto, los procesos de extracción de petróleo generan contaminación por ruido, que, aunque ha sido minimizado por la lejanía con las poblaciones humanas, igualmente afecta a la flora y fauna de la región (Speight, 2016).

El aumento de la demanda de hidrocarburos aumenta todos los días, y con ello causa su escasez, así como los riesgos de contaminación provocados por su explotación y transporte. Las fracciones de petróleo que pueden llegar a ser contaminantes son compuestos recalcitrantes considerados de máxima prioridad. El petróleo crudo está sujeto a varios procesos de intemperización tales como dispersión, evaporación, infiltración, disolución, emulsificación, fotooxidación, formación de perlas, biodegradación. Estos procesos

dependen de factores ambientales como la temperatura, corrientes oceánicas y otras condiciones del clima. La resistencia de los hidrocarburos contaminantes a la biodegradación en suelo o en agua dependen del tipo, así como del peso molecular de la fracción del petróleo o el número de anillos en la estructura (Varjani, 2017).

Algunos de los efectos que provoca en seres vivos destacan sofocación, anoxia, trastornos en el crecimiento, disfunciones en las reacciones metabólicas, así como un desbalance en el contenido hormonal. A corto plazo puede ocasionar muerte por necrosis aguda, hipotermia y sensación de ahogo. Mientras que los efectos a largo plazo incluyen desarrollo de anormalidades en los animales marinos como la reducción de las mandíbulas, carencia de pigmentación y malformaciones en el cráneo. Estas alteraciones provocan cambios entre las especies de una población y con el tiempo cambios más complejos dentro de los ecosistemas. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos, específicamente tienen la capacidad de inducir a la formación de tumores malignos que primeramente afectan la piel para después extenderse por los demás tejidos epiteliales, teniendo gran afinidad por macromoléculas como el ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN) y las proteínas (Varjani, 2017).

Por otro lado, durante la explotación de los yacimientos de petróleo, se producen gases de efecto invernadero, siendo el principal gas el CH_4 , seguido de CO_2 y NO_2 . La industria contribuye a la emisión de estos gases a través de procesos relacionados a la combustión, fugas de los equipos, y fugas de materiales no emisivos (caminos de asfalto, destilación de combustibles, lubricantes, naftas especiales). Éstas pueden ocurrir de varias formas, por ejemplo, cuando se sintetizan plásticos o caucho sintético a partir de materias primas derivadas del petróleo (Jafarnejad, 2017).

En cuanto a los derrames, los factores clave que influyen sobre el impacto generalmente destacan: el derrame mismo de petróleo, la magnitud del desastre, las características físicas del ambiente marino o del suelo, la biología marina o del suelo, la salud de la sociedad, la economía y la política. Los derrames pueden impactar directamente a través de la ingestión, absorción e inhalación y causar cambios en el comportamiento u obligar a los organismos que busquen otras fuentes de alimentos en lugares lejano. Afecta los ecosistemas oscureciendo el entorno, por medio de una toxicidad química (lo que resulta en efectos letales causando deterioro celular) y por medio de cambios ecológicos como la desaparición de especies claves y la invasión de hábitats por especies oportunistas (Jafarnejad, 2017).

La producción de petróleo ha traído muchas consecuencias relacionadas con el mal manejo durante su extracción, transporte y almacenamiento, con un impacto ambiental negativo. En 2013, el 92.6 % de los derrames o fugas de petróleo que se acumularon en el suelo tabasqueño fue debido principalmente a fugas en ductos, impactando los ecosistemas tropicales (PROFEPA, 2013).

1.3.4 PRODUCCIÓN EN MÉXICO Y EN TABASCO

En la actualidad para continuar con la tasa de producción de petróleo la mejor estrategia reside en hacer más eficientes los procesos de recuperación en los yacimientos que ya se hallan en producción, sobre todo en los campos maduros donde la extracción prácticamente ha finalizado. Hay que tomar en cuenta que por cada barril de petróleo que se lleva a la superficie dos de ellos permanecen atrapados en los poros de la roca, lo que se traduce en un 33 % de eficiencia. Sin embargo, este porcentaje suele variar dependiendo de la naturaleza geológica del yacimiento, así como de la profundidad, de manera que puede haber diferencias incluso de un pozo a otro (Huc, 2011).

El petróleo es un recurso natural no renovable y de mucha importancia para la mayoría de las naciones ya que su economía descansa en la extracción, transformación y comercialización de sus derivados. Para el año 2018, la producción promedio fue de 1,833,000 barriles diarios, dejando ver una reducción muy sustancial del 24.5 % con respecto al año 2015, por lo que los procesos de recuperación se hacen sumamente importantes ante la baja en la producción neta (PEMEX, 2018; The World Factbook, 2020). En la actualidad, el petróleo crudo pesado constituye la mayoría de las reservas mundiales. Se estima que globalmente se han extraído alrededor de 1 trillón de barriles petróleo, quedando sin extraer alrededor de dos y cuatro trillones de barriles en los reservorios, por lo que se puede inferir que aproximadamente el 67 % del petróleo aún está atrapado en las rocas reservorio (Hernández, 2016).

En México se cuantifica a la fecha un total de 260 billones de barriles de petróleo residual en campos maduros y sin explotar. El 90 % de tal volumen está confinado en un conjunto de reservorios localizados, lo que permite que se implementen técnicas de recuperación, principalmente terciarias en atención a los problemas de contaminación ambiental, ya que el uso de métodos térmicos y químicos no son métodos compatibles con el medio ambiente. Por ejemplo, en los campos petroleros de Cantarell y Ku-Maloob-Zaap, en la sonda de Campeche, se encuentran disponibles 30 billones de barriles de petróleo en la zona menos permeable de la roca. Si los métodos de recuperación llegan a ser más eficientes y se extrae tan sólo un 10 % del petróleo residual se dispondría de aproximadamente 26 billones de barriles adicionales de petróleo crudo (Hernández, 2016).

En el año 2018, de los 1,814,000 barriles diarios de hidrocarburos líquidos que se produjeron en México, 1,073,000 corresponden a petróleo crudo pesado maya, 553,000 es ligero istmo y 188,000 es súper ligero olmeca. Estas cantidades no incluyen los condensados ni los líquidos del gas (PEMEX, 2018). Para 2019, la producción disminuyó aproximadamente un 8 % con respecto al año anterior, pues la producción mensual fue de 1,677,000 barriles diarios (nuevamente sin tomar en cuenta los condensados ni los líquidos del gas). Del total de la producción 482,000 correspondieron a petróleo ligero Istmo, 1,061,000 a petróleo pesado maya y 134,000 a petróleo super ligero Olmeca (SENER, 2020).

De acuerdo con los datos de producción de crudo por entidad federativa aportados por la SENER (2020), Tabasco es el primer productor de petróleo a nivel nacional en tierra, con

200 000 barriles diarios en 2018, seguido por Veracruz, Chiapas, Puebla, Tamaulipas y San Luis Potosí, los cuales en total suman 318 000 de barriles diarios en comparación a los 1,516 000 barriles diarios que se producen en aguas territoriales. Pero en 2019 la producción fue ligeramente menor, con casi 191 000 barriles diarios para Tabasco. En la figura 1 se muestra la producción anual de petróleo desde 2015 a la fecha.

En México se cuantifica a la fecha un total de 260 billones de barriles de petróleo residual en campos maduros y sin explotar (Hernández, 2016). La figura 2 muestra la producción anual por tipo de petróleo.

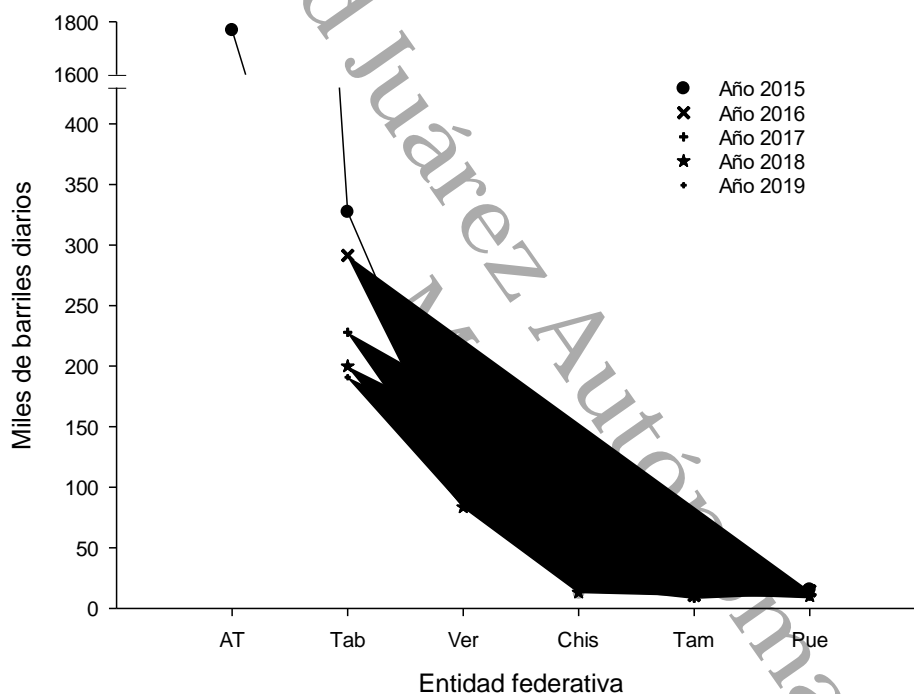


Figura 1. Producción de hidrocarburos por entidad federativa 2015-2019. Fuente: SENER, 2020. (AT = aguas territoriales). Sólo se muestra la producción de aguas territoriales de 2015.

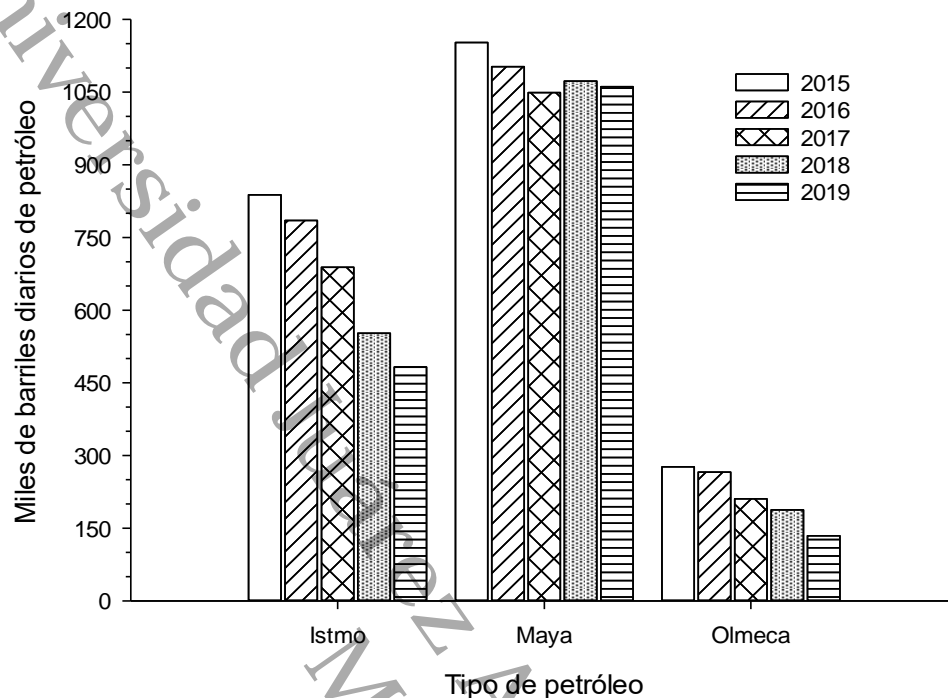


Figura 2. Producción de petróleo por tipo a nivel nacional. Fuente: SENER, 2020.

1.3.5 RECUPERACIÓN PRIMARIA Y SECUNDARIA DE PETRÓLEO

Es necesario reiterar que, la extracción de petróleo, en la actualidad sólo se puede extraer del 10 al 30 % del petróleo original en el lugar, lo cual dependerá de factores como la naturaleza geológica del yacimiento, la densidad del aceite atrapado en la roca, entre otros (Vishnyakov *et al.*, 2019). Las reservas de petróleo existen típicamente como reservas que se encuentran atrapados dentro de una roca que funciona como depósito original. Un reservorio puede definirse como una estructura geológica la cual contiene hidrocarburos a diferentes densidades, por lo que puede ser petróleo crudo convencional, petróleo crudo pesado y gas natural, que bajo condiciones de pozo aún conserva cierto grado de movilidad, lo que finalmente dependerá de sus propiedades (Speigh, 2016).

1.3.5.1 Métodos de recuperación primaria

La recuperación inicial en un pozo está directamente relacionada con la energía de la que el pozo por sí mismo ya dispone. Tan pronto como un pozo es abierto, la energía contenida en el gas o en el agua que, debido a la diferencia entre la presión atmosférica del reservorio, los fluidos emergen a la superficie (Vishnyakov *et al.*, 2019).

Esta primera etapa se caracteriza por la ocurrencia de algunos acontecimientos como la expansión del petróleo y del gas que se halla disuelto, un desplazamiento por la propagación natural de agua presurizada y un drenaje que ocurre desde las zonas de mayor elevación hasta las profundidades del pozo. La expulsión de los hidrocarburos depende de las propiedades del fluido y de la roca, así como de la estructura geológica y la geometría del reservorio. Empero, todas estas características son aplicables a hidrocarburos que debido a su densidad aún pueden fluir por las paredes de la roca, sin embargo, para el petróleo crudo pesado no es aplicable, ya que la recuperación primaria no tiene efecto sobre él debido a su alta densidad (Vishnyakov *et al.*, 2019). En la figura 3 se muestran los diferentes métodos de recuperación de petróleo incluyendo la recuperación primaria.

Durante la recuperación primaria es suficiente la fuerza que viene con el esparcimiento del gas y del petróleo ligero o con una pequeña ayuda a través de un equipo de bombeo, a pesar de que la eficiencia de la recuperación primaria es particularmente baja cuando depende de la expansión o de la evolución de la solución de gas. Sin embargo, hasta ese momento nada ha sido agregado al reservorio con el fin de aumentar o de mantener su energía y así sostener la eficiencia de barrido del petróleo hacia la salida del pozo, lo cual hace característico a este tipo de recuperación (Speigh, 2015).

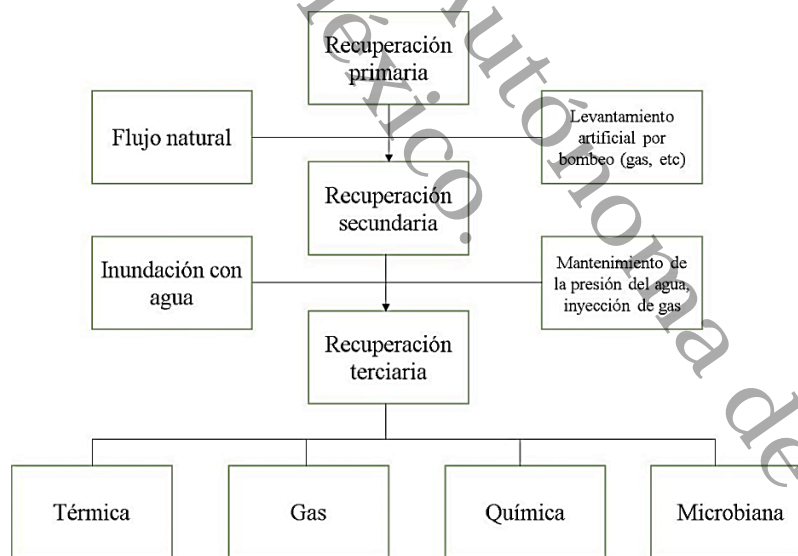


Figura 3. Métodos de recuperación de petróleo. Fuente: Speigh, 2016

Durante la vida útil del pozo, la presión caerá, y en algún momento habrá presión subterránea insuficiente para forzar el petróleo a la superficie. Si las operaciones de extracción son redituables, y con frecuencia lo son, el petróleo restante se recupera utilizando métodos secundarios de recuperación de petróleo.

1.3.5.2 Métodos de recuperación: secundaria

La recuperación secundaria se cataloga dentro de la categoría de recuperación mejorada, ya que hace uso de energía que no proviene del yacimiento. Los procesos de recuperación secundaria se llevan a cabo debido a que el petróleo crudo aún permanece en el pozo, sin embargo, la presión que había durante la etapa primaria de la recuperación se ha disipado por causas naturales, por lo que se hace necesario recurrir a otras técnicas que puedan extraer el petróleo remanente (Sheng, 2020).

Por lo común lo que se emplea es la inyección de fluidos, y lo ha sido por muchos años. Fluidos tales como el agua (técnica conocida como water flooding) y el gas natural, pese a que no es considerado un fluido natural dentro de un reservorio de petróleo, se inyectan a través de una serie de conductos con el fin de forzar el petróleo crudo a fluir con dirección de otras zonas donde pueda ser recuperado. No obstante, tiene que tomarse en cuenta que estas técnicas dependen de las propiedades del reservorio y de las propiedades del crudo (Sheng, 2020).

Sin embargo, de todos los fluidos pueden ser usados como métodos de recuperación secundaria, el agua es el más empleado ya que en comparación al gas u otras sustancias, es mucho más económico. En este proceso de water flooding, el agua se bombea a través de un proceso de inyección (Speigh, 2016). El proceso de water flooding es la mayor técnica usada en la recuperación secundaria, entendiéndose por mayor el hecho de que es la más socorrida, aunque puede no ser la mejor. De hecho, se estima que casi la mitad de todo el petróleo producido en recuperado por medio de esta técnica. En la recuperación secundaria, el fluido inyectado debe desalojar el petróleo e impulsarlo hacia los pozos de producción. (Vishnyakov *et al.*, 2019).

1.3.5.3 Recuperación terciaria por métodos mejorados (EOR)

De acuerdo con los datos que han sido reportados a lo largo de las investigaciones a nivel mundial, la capacidad de recuperación en las diferentes etapas varía de acuerdo con la naturaleza geológica del yacimiento y con las propiedades del aceite. Durante la etapa de recuperación primaria, el petróleo inicial se produce bajo presión natural (debido al gas natural), donde generalmente se recupera del 10 al 20 %. Después, la tasa de recuperación disminuye de manera notable debido a la reducción de la presión natural del depósito de petróleo, debiéndose utilizar tecnologías de recuperación secundaria para aumentar la producción (ver figura 5). Durante esta etapa se puede observar un aumento de la recuperación total de hasta el 40–50 % del petróleo original en el lugar (Geetha *et al.*, 2018). Para aumentar la tasa de recuperación de petróleo por encima de los valores indicados, se utilizan métodos de recuperación terciarios de hidrocarburos, llamados Recuperación Mejorada de Petróleo (EOR, por sus siglas en inglés). El propósito del uso de EOR es aumentar la recuperación final de petróleo incrementando la eficiencia bloqueando las zonas

saturadas de agua altamente permeables y redireccionando los fluidos a las zonas que se encuentran saturadas de petróleo. Del mismo modo, se pueden reducir las propiedades de superficie del reservorio, es decir: disminuir las fuerzas de tensión superficial entre el petróleo y el fluido inyectado; igualmente se mejora la recuperación modificando el efecto de las fuerzas de capilaridad, cambiando la mojabilidad de la roca, esto es: la capacidad de ésta de mantener adheridas las partículas de petróleo ligero o mediano (Vishnyakov *et al.*, 2019; Sheng, 2020).

Los métodos de recuperación terciaria de petróleo se llevan a cabo cuando los métodos primarios y secundarios no pueden obtener más, o cuando ya no son económicamente redituables. Esta es la causa de que muchos pozos sean abandonados y clausurados aun cuando la cantidad y calidad del petróleo en el yacimiento es alto. Sin embargo, a veces el abandono del pozo no es la mejor opción en muchos casos, de ahí la necesidad de los métodos terciarios. Y aunque estos métodos terciarios son caros y no siempre son operacionalmente viables, las técnicas han mejorado con el tiempo y la recuperación terciaria puede ser una opción siempre y cuando la demanda y el precio del petróleo sean lo suficientemente altos. Esta etapa se conoce como recuperación terciaria (Mohsenatabar y Saghafi, 2019).

La etapa terciaria de recuperación de petróleo (ver figura 5) se puede clasificar en cuatro técnicas principales: a). inundación química, b). inundación térmica, c). uso de fluidos miscible y d). uso de microbios. No obstante, cuando durante la recuperación se emplean productos químicos sintéticos, muchas veces derivados del petróleo, a la EOR también es llamada Recuperación Mejorada de Petróleo asistida con productos químicos sintéticos, CEOR, por sus siglas en inglés (Mohsenatabar y Saghafi, 2019).

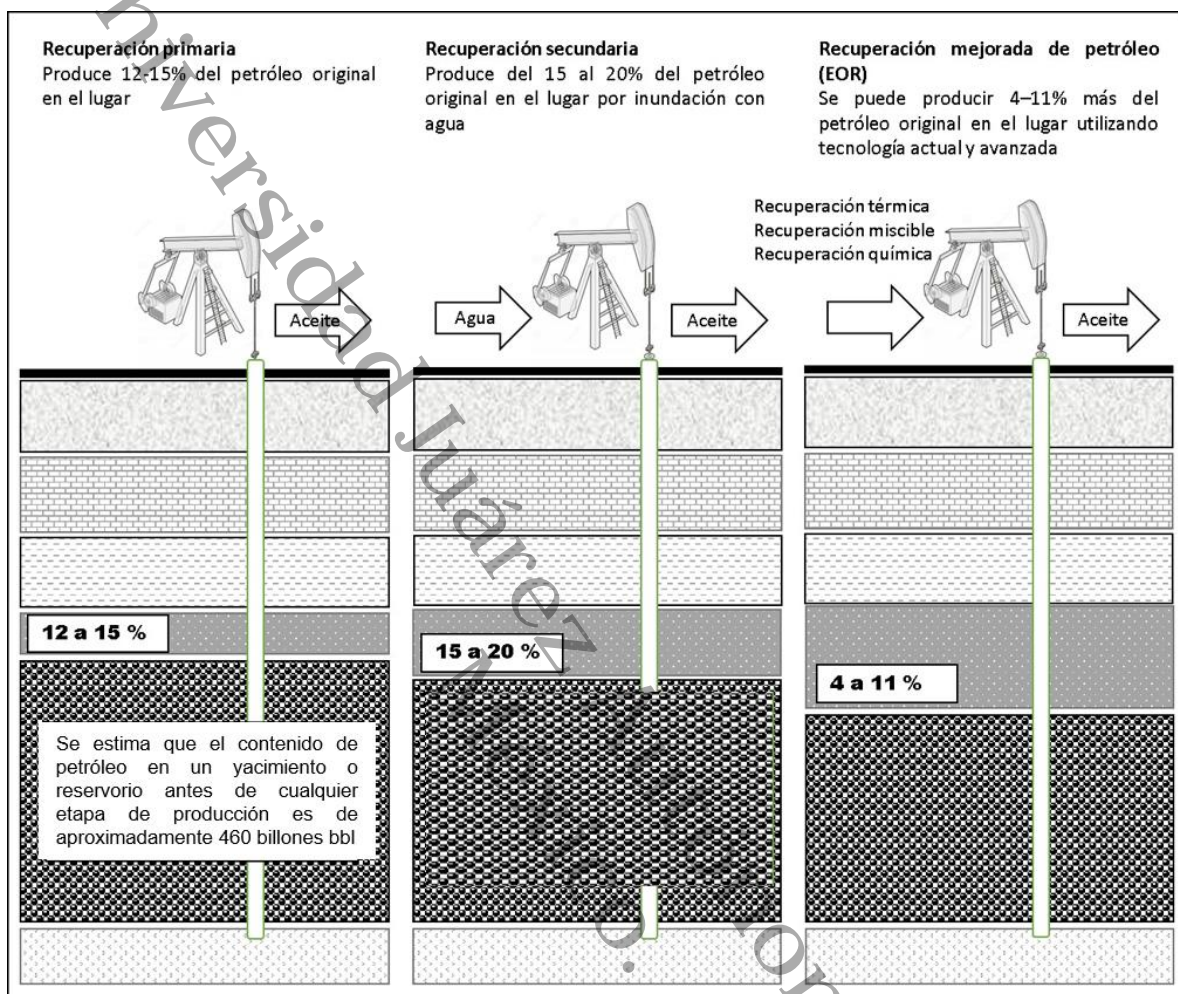


Figura 4. Etapas de recuperación de petróleo. (bbl: barriles diarios), los porcentajes corresponden a la recuperación de petróleo por cada etapa. Fuente: Speight, 2016.

El 11 % del proyecto EOR en todo el mundo se ve obligado a utilizar CEOR. Más del 77 % de estos métodos son inundaciones de polímeros y el 23 % son polímeros combinados con tensioactivos. Esta técnica puede incluir un polímero, modificación de un perfil de formación profundo utilizando polímeros, tensioactivos, álcalis, emulsiones o una mezcla de ellos. Estas técnicas son de importancia ya que aún después de las etapas de recuperación primaria y secundaria, aproximadamente el 50 % del petróleo permanece atrapado en el depósito. El porcentaje de recuperación en la etapa terciaria depende de las propiedades del aceite, la naturaleza geológica del yacimiento y de la subetapa de EOR específica que se aplique al yacimiento, pero por lo general el promedio es entre un 10 – 15 % (Geetha *et al.*, 2018). Aunque Speight (2016) propone un porcentaje menor.

El hecho de que existan estas técnicas de recuperación no significa que todos los yacimientos son candidatos para ello. Las propiedades poco favorables de los fluidos y las características específicas de la roca de almacenamiento pueden limitar el éxito de la recuperación. Los depósitos que son candidatos principales para EOR incluyen, entre otros: a). depósitos de petróleo pesado donde la viscosidad es bastante alta y el petróleo no es móvil, b). depósitos de petróleo convencionales donde hay saturación residual elevada de aceite debido a la tensión interfacial entre el petróleo y el agua, c). reservorios heterogéneos con variaciones significativas donde la inyección de gas u otros fluidos puede provocar una mayor recuperación (Sater e Iqbal, 2016; Mohsenatabar y Saghafi, 2019).

La mayor parte de la inundación química se ha aplicado en depósitos donde prevalecen los arenitos, es decir SiO_2 y materiales cementantes que mantienen unidos los granos de arena. Pero la inundación de polímeros no está limitada a este tipo de roca. Sin embargo, la inundación de polímeros tiene otras limitaciones: viscosidad del petróleo crudo (<200 cp), temperatura (<120 ° C), salinidad (<20.000 ppm) y permeabilidad (> 30 md), su uso sigue siendo generalizado (Geetha *et al.*, 2018).

En la inundación térmica la recuperación se basa en un principio en la reducción de la viscosidad al someter al petróleo pesado a un aumento de la temperatura con el fin de reducir la viscosidad y así aumentar la movilidad en el depósito. A medida que se introduce la energía térmica en el depósito también se producen otros procesos en el depósito que mejoran la recuperación de petróleo pesado. Los métodos de recuperación térmica se aplican tanto a los depósitos convencionales como a los no convencionales. Se puede emplear inundación de vapor, inyección de vapor cíclico, presión con agua caliente y combustión in situ (Sater e Iqbal, 2016).

1.3.6 Recuperación mejorada de petróleo asistida por microorganismos (MEOR)

Como parte de las técnicas de recuperación mejorada de petróleo, el uso de microorganismos ha sido relativamente reciente. El uso de los microorganismos da como resultado la Recuperación Mejorada de Petróleo asistida por Microorganismos (MEOR, por sus siglas en inglés), dentro de la cual se pueden dar algunos resultados como: a). que los microorganismos interactúen con los fluidos del reservorio generando surfactantes; y b). que los microorganismos interactúen con los fluidos del depósito para producir polímeros (Safdel *et al.*, 2017).

La MEOR es una de las categorías de recuperación terciaria de petróleo. Lo es cualquier proceso que utilice microorganismos y/o sus productos metabólicos, como biosurfactantes, biomasa, biopolímeros, bioácidos, biosolventes, biogás y enzimas para mejorar la producción de petróleo de depósitos maduros, clausurados o agotados. Así como se lleva a cabo la inundación con agua o con polímeros, gas o CO_2 , durante la MEOR se lleva a cabo una inundación microbiana que puede incluir sólo a la comunidad microbiana, los microbios y sus productos o sólo los productos de su metabolismo (Tatar, 2018).

La MEOR puede definirse como un proceso biotecnológico que se emplea en la recuperación de petróleo. Sin embargo, a pesar de que forma parte de la recuperación terciaria es un método al que no se le había puesto suficiente atención, ya que diversos estudios de campo han demostrado que algunos microorganismos tienen la capacidad de llevar a cabo sus funciones metabólicas en condiciones extremas, tanto como a 2,200 m de profundidad y hasta 207 atmósferas (21 MPa) de presión, temperaturas superiores a los 80 °C y salinidad $>16 \times 10^3$ mg L⁻¹, y aun así generar productos, los cuales tienen la capacidad de desplazar el aceite que se encuentra atrapado en los poros de las rocas por mecanismos como inmiscibilidad o imbibición espontánea (Bachman *et al.*, 2014; Safdel *et al.*, 2017; Tatar, 2018).

En las etapas iniciales de recuperación por medio de la EOR, su uso suele ser redituable en lo económico, pero a largo plazo tienen desventajas ya que muchas de las sustancias que se emplean en estas etapas llevan riesgos ambientales inherentes; por ejemplo, el óxido de etileno usado en la producción de surfactantes no iónicos puede ser altamente contaminante al ambiente. Por lo que la técnica de la MEOR es una excelente alternativa ya que además de ser ecológicamente amigable, en lo económico es altamente redituable (ver figura 6) (Patel *et al.*, 2015; Safdel *et al.*, 2017).

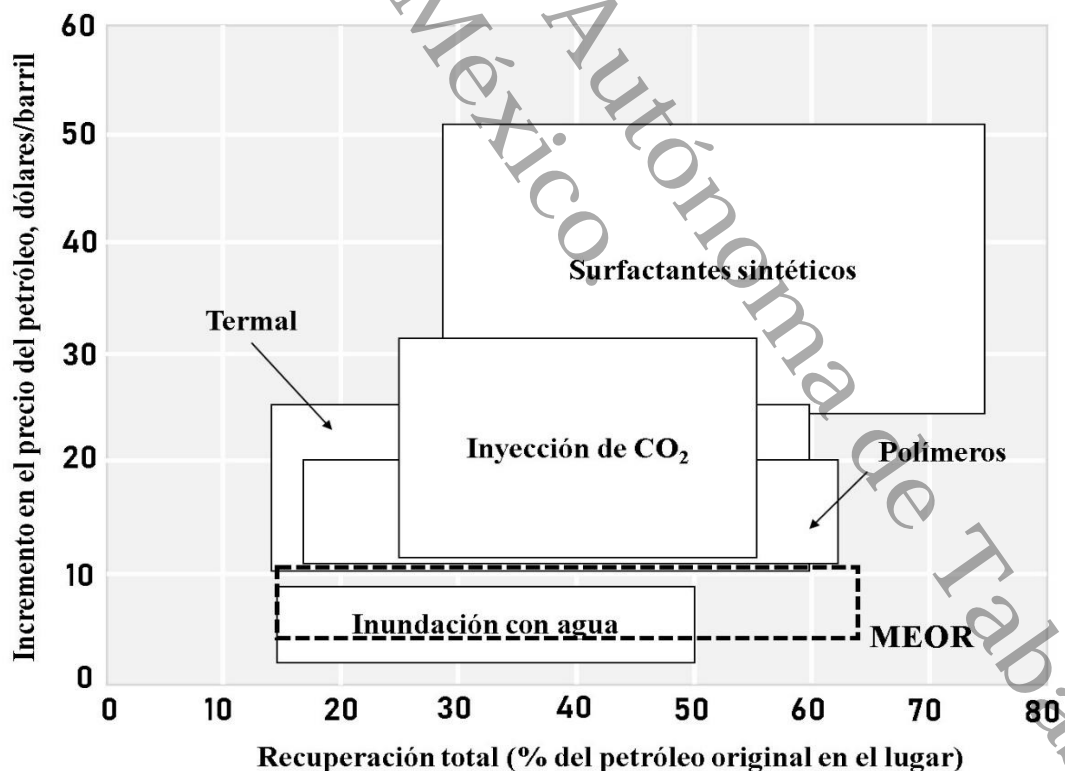


Figura 5. Diagrama que muestra el incremento del precio del barril de petróleo según la técnica de EOR empleada. Fuente: Tatar, 2018.

La MEOR, de forma general puede dividirse en 2 categorías: *in situ* y *ex situ*. Este se caracteriza porque los bioproductos deseados que se emplean durante la recuperación se producen fuera del pozo, mientras que cuando es *in situ* la producción de todos esos productos suceden dentro del pozo. El método *ex situ* hace uso de organismos autóctonos que ya se hayan adaptados a las condiciones de campo, pero también ofrece la posibilidad de diseñar la cepa microbiana, modificarla para que lleve a cabo el objetivo deseado. Así, los productos de interés tales como los biosurfactantes (los cuales son los de uso más extendido en la MEOR) se extraen en condiciones de laboratorio y se mezclan con otras sustancias para su uso posterior en ensayos en campo (Patel *et al.*, 2015).

Ambos métodos tienen puntos favorables y sus respectivas limitaciones. Aparentemente el método *in situ* debería ser mejor porque hace uso de los microorganismos que ya existen dentro del yacimiento, y el hecho de usar fuentes de carbono provenientes de materias primas de bajo costo implica un efecto costo-efectivo alentador, sin embargo, no siempre es así. No se tiene la certeza de que la población microbiana autóctona sea productora de alguno de los bioproductos que pueden mejorar la recuperación, y en caso de que lo fueran eso no garantiza que los produzcan, incluso podrían pasar años antes de que esto ocurriera, ya que las cepas microbianas están sujetas a una serie de requerimientos ambientales que de no cumplirse puede afectar directamente el metabolismo microbiano. Además, el aumento de la biomasa celular (sobre todo de tipo fúngica) puede causar taponamiento de los poros de la roca de almacenamiento e interrumpir el flujo de los hidrocarburos (Patel *et al.*, 2015; Fooladi, 2016; Varjani y Upasani, 2017).

Por otro lado, el método *ex situ* a pesar de que requiere más tiempo y recursos técnicos para su optimización en el laboratorio, por lo menos se tiene la certeza de que la cepa es productora de los metabolitos deseados para llevar a cabo una correcta MEOR. Incluso, el método *ex situ* no sólo puede hacer uso de las células totales, sino que puede inyectarse sólo los bioproductos haciendo más eficiente la recuperación al quedar libre el fluido inyectado del efecto de los factores ambientales, los cuales no influyen sobre metabolitos como los biosurfactantes que son termoestables y halotolerantes, además de soportar altos niveles de presión atmosférica, pH y salinidad (Patel *et al.*, 2015; Fooladi, 2016; Varjani y Upasani, 2017).

No obstante, toda la evidencia científica disponible sobre la MEOR y su importancia como método terciario de recuperación, las inconsistencias entre los resultados de laboratorio y las pruebas de campo han sido una razón principal para que no se convierta en una tecnología de uso más común. Además, la falta de comprensión científica y conocimiento sobre la base y los detalles de los diferentes enfoques de MEOR también limitan su uso a una escala más importante. Las nuevas tecnologías tienen el objetivo de proporcionar una mayor información que elimine las restricciones que pesan sobre este método y se convierta en un futuro inmediato en una forma de recuperar petróleo sin poner en riesgo el equilibrio de los ecosistemas naturales (Tatar, 2018).

1.3.7 Los biosurfactantes en la recuperación mejorada de petróleo

La MEOR, forma parte de los métodos de recuperación terciaria de petróleo. Sin embargo, en la MEOR no siempre es viable el uso de las células totales, sino que sus metabolitos secundarios purificados o en extracto crudo también forman parte de la recuperación. En condiciones óptimas, las cepas microbianas pueden producir biosurfactantes, bioácidos, biopolímeros, biosolventes, biogases, bioemulsificantes y biomasa en general, pero esto dependerá de las condiciones en que la comunidad microbiana se desarrolle y de los elementos químicos de los que disponga (Safdel *et al.*, 2017).

De todos los metabolitos los biosurfactantes son los más empleados en la industria no sólo petrolera, sino en muchas otras ya que tienen diversidad de aplicaciones. Se puede asegurar que son indispensables en nuestra vida diaria, ya que actúan como detergentes, agentes espumantes, agentes humectantes, emulsionantes, dispersantes y lubricantes (Joy *et al.*, 2017).

Los biosurfactantes son metabolitos secundarios que son sintetizados por una amplia multiplicidad de cepas microbianas, y esto ocurre en la fase estacionaria de su curva de crecimiento, pero estos no se producen sino hasta el momento en que las cepas son puestas en contacto con sustancias que son insolubles en agua, tal como sucede con los hidrocarburos líquidos y sólidos (Varjani y Upasani, 2017).

1.3.7.1 Características y clasificación general de los biosurfactantes

Los biosurfactantes son moléculas que, en términos generales, contienen una región que es afín al agua y otra que no lo es. De sus características principales destacan su capacidad para disminuir la tensión superficial del agua en un intervalo generalizado que va de 72 mN/m hasta 30 mN/m o menos, ya que los valores son variables de acuerdo al tipo de organismos, la composición molecular de biosurfactante y la materia prima de la cual fue sintetizado. Del mismo modo, tienen la capacidad de modificar la tensión interfacial de una mezcla de agua-n-hexadecano desde un valor de 43 mN/m a 1 mN/m, en promedio, porque los valores finales también están sujetos a los mismos parámetros que la tensión superficial (Bachman *et al.*, 2014; Oluwaseun *et al.*, 2017).

Los biosurfactantes son considerados superiores a los surfactantes sintéticos. Entre sus ventajas más notables destacan su diversidad estructural, una selectividad mayor de sustratos, así como una baja concentración micelar crítica, lo cual es muy importante en términos económicos, ya que al ser bajo este parámetro (mg/L) la cantidad de biosurfactante que debe emplearse es menor para romper la tensión superficial e interfacial. Esto supone un gasto menor de recursos y un mayor rendimiento en los ensayos a nivel campo. Además, los biosurfactantes son biodegradables y de baja toxicidad, por lo que el impacto al ambiente es sensiblemente menor (Gao *et al.*, 2016; Mondal *et al.*, 2017; Safdel *et al.*, 2017).

De acuerdo con su estricta estructura bioquímica, los biosurfactantes pueden clasificarse de una forma más completa, según la carga superficial y la masa molecular. Así, los biosurfactantes se clasifican ampliamente en cinco grupos principales.

1. Los **glucolípidos** (ramnolípidos, soforolípidos, trehalolípidos) son los biosurfactantes más conocidos, se encuentran entre las cuatro clases de biosurfactantes, están compuestos de ácidos grasos alifáticos de cadena larga o ácidos hidroxilalifáticos y carbohidratos; generalmente son producidos por cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Son complejos de carbohidratos y ácidos grasos, presentan un enlace éter o un grupo éster. Están formados por uno o dos ácidos grasos β -hidroxidecanoico, C_8 a C_{16} , conectados por el extremo carboxilo a una o dos moléculas de ramnosa conocidas como monoramnolípido y diramnolípido, respectivamente (Sajna, *et al.*, 2015; Oluwaseun *et al.*, 2017; Varjani y Upasani, 2017). La figura 6 muestra un ejemplo de un biosurfactante glucolípidos.

En el caso de los soforolípidos, estos han sido descrito ampliamente en cepas fúngicas de las especies *Torulopsis bombicola*, *Torulopsis petrophilum* y *Torulopsis apicola*. Están constituidos principalmente por un carbohidrato dimérico soforosa, el cual está unido a una larga cadena de ácidos grasos por medio de un enlace glucosídico (Sobrinho *et al.*, 2014).

Los trehalolípidos son el tercer grupo de biosurfactantes dentro de la categoría mayor de los glucolípidos. Han sido sintetizados de cepas microbianas del género *Rhodococci* y tienen importantes propiedades biológicas y fisicoquímicas. Están constituidos principalmente por el disacárido trehalosa en la cual dos moléculas de glucosa están unidas por medio de un enlace α, α -1,1- glucosídico. La trehalosa es el componente principal de los glucolípidos de la pared celular es cepas de *Mycobacteria*, *Nocardia* y *Corynebacteria*. Del mismo modo han sido aislados de *Rhodococcus erythropolis* (Shoeb *et al.*, 2013).

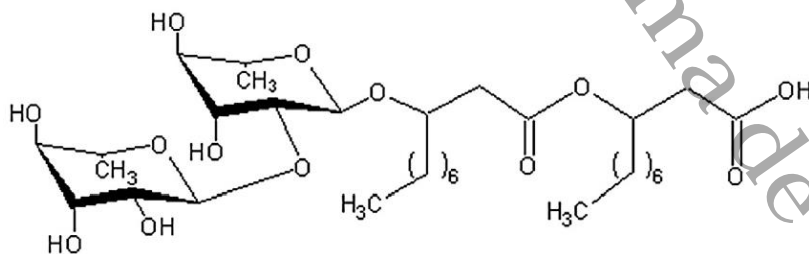


Figura 6. Estructura de un ramnolípido con dos moléculas de ramnosa y dos unidades de ácido β -hydroxydecanoico. Fuente: Sajna *et al.*, 2015.

2. Por otro lado, entre los **lipopéptidos** (surfactinas, liqueninas, iturinas, fengicina) producidos por cepas bacterianas, principalmente del género *Bacillus*, se destaca la surfactina, la cual es un tipo de biosurfactante que tiene una amplia actividad de superficie. Es un lipopéptido cíclico que contiene ácidos grasos β -hidroxilos y residuos D-/L-aminoácidos. Este tipo de biosurfactante está compuesto por una estructura anillada de 7

aminoácidos (L-asparagina, L-Leucina, ácido Glutámico, L-leucina, L-valina y 2 D-leucinas) acoplada a una cadena de ácidos grasos unidos por una molécula de lactona (Sajna *et al.*, 2015; Marques *et al.*, 2020). En la figura 7 se muestra la estructura de algunos biosurfactantes lipopéptidos.

En lo referente a la liquenisina, ésta es un biosurfactante lipopéptido producido típicamente por la cepa *Bacillus licheniformis*, los cuales exhiben buena estabilidad ante cambios extremos de temperatura, salinidad y presión. Tiene una secuencia primaria de aminoácidos L-Gln-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Ile (Sajna *et al.*, 2015).

Y en cuanto a las iturinas, éstas son producidas por bacterias del género *Bacillus*. La iturina A contiene ácidos grasos β -amino (14-17 átomos de carbono) rodeados de siete aminoácidos: L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser, y esta estructura anfifílica especial le confiere una actividad antimicrobiana de amplio espectro (Xu *et al.*, 2019).

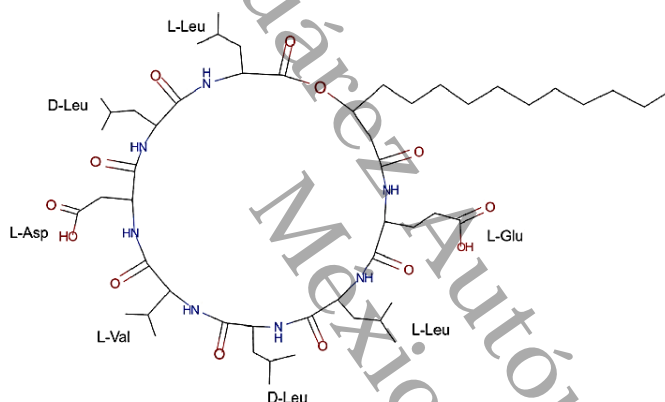


Figura 7. Molécula del principal isómero de la surfactina (Lipopéptido). Fuente: Yang et al., 2020.

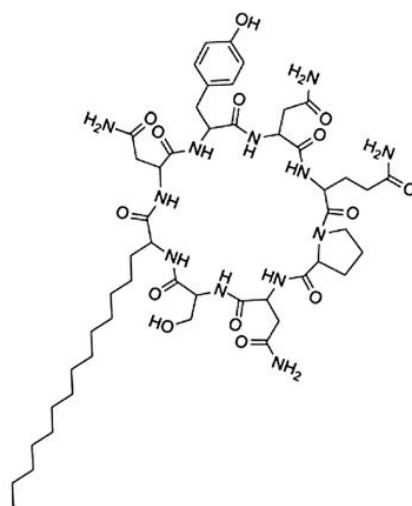


Figura 8. Estructura anfifílica representativa de la familia iturina. Fuente: Ambricio y Trupo, 2017.

3. Los **fosfolípidos, ácidos grasos y lípidos neutros** (Fosfatidiletanolamina, Corinomolólicos) son sintetizados por muchas cepas bacterianas que producen biosurfactantes de naturaleza ácidos grasos y fosfolípidos, específicamente cuando el hidrocarburo es un n-alcano por ejemplo, la cepa *Rhodococcus erythropolis* es capaz de crecer en sustratos compuestos por n-alcanos, causando la disminución de la tensión interfacial en una mezcla de agua-n-hexadecano hasta valores inferiores a 1 mN/m y una concentración micelar crítica de 30 mg/L (Sobrinho *et al*, 2014; Sajna *et al.*, 2015).

4. Los **biosurfactantes poliméricos** (emulsan, liposan) son compuestos de alto peso molecular con actividad emulsificante. Entre ellos se encuentra el emulsán, *Acinetobacter calcoaceticus*, (figura 9) y el liposán. El primero es un complejo microbiano, un lipopolisacárido y ácidos grasos unidos por enlaces covalentes. Es un biopolímero de alto peso molecular formado por D-galactosa-mina y D-galactosa-minurónico. Mientras tanto, el liposán es producido principalmente por *Candida lipolytica* o *Yarrowia lipolytica*, compuesto por 83 % de polisacáridos y 17 % de proteínas. Tiene propiedades emulsificantes y en la estabilidad de la emulsión, (Sajna *et al.*, 2015).

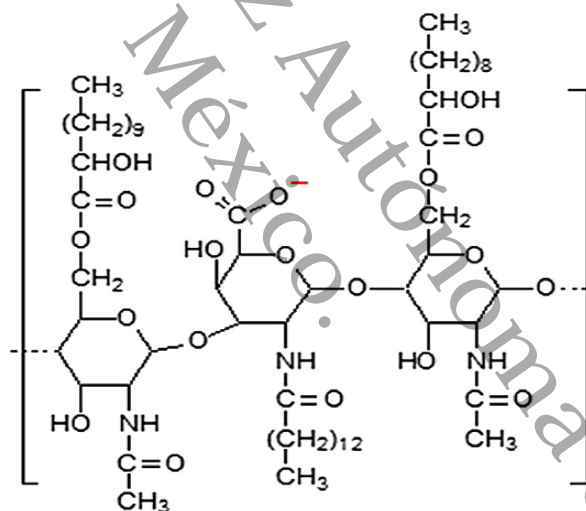


Figura 9. Estructura una molécula de liposan. Fuente: Sajna *et al.*, 2015.

5. Finalmente, los **biosurfactantes particulados** forman la última categoría de biosurfactantes. Son de dos tipos, vesículas extracelulares y células microbianas totales. Las vesículas de membrana extracelular dividen los hidrocarburos para formar microemulsiones, que juegan un papel importante en la captación de hidrocarburos. A veces el total de la célula bacteriana en sí misma puede funcionar como biosurfactante (Tadros, 2014; Sajna *et al.*, 2015).

1.3.8 EQUIPOS EMPLEADOS EN LA RECUPERACIÓN MEJORADA DE PETRÓLEO ESCALA LABORATORIO

Los ensayos de recuperación mejorada de petróleo asistida por microorganismos tienen formas *in situ* y *ex situ* para llevar a cabo la recuperación. Una vez aislados, se someten a diferentes pruebas o protocolos con el fin de seleccionar aquellas que tengan las mejores características para cumplir con los objetivos de la investigación. Por ejemplo, mayor porcentaje de recuperación, mejor curva de crecimiento, selección de sustratos para producción industrial, mejor índice de emulsificación. Las cepas seleccionadas extraídas del pozo son cultivadas en condiciones controladas de laboratorio, haciendo un riguroso proceso de selección con base en su temperatura de crecimiento, tolerancia a diferentes rangos de salinidad, entre otros (Geetha *et al.*, 2018).

1.3.8.1 Uso del core flooding

El primer método que se describe recibe el nombre de **inundación de núcleo** (core flooding assay, en inglés). Se trata del método más complejo y que requiere los aditamentos tecnológicos más sofisticados. También es el más costoso en términos económicos. Para su funcionamiento utiliza un fragmento de roca con un volumen de poro promedio. Ese fragmento recibe el nombre de **núcleo**, y puede ser extraído durante el proceso de perforación del yacimiento. Necesita ser del mismo yacimiento porque su naturaleza geológica afecta directamente el proceso de recuperación de petróleo. Sin embargo, en ocasiones se utilizan núcleos diseñados por industrias químicas, que son fabricadas según los requerimientos del laboratorio que lleva a cabo el ensayo (García *et al.*, 2019).

En cuanto al equipo (figura 10), este se encuentra constituido por una bomba de inyección continua, un horno para el control de la temperatura, cilindros de transferencia, un manómetro para monitorear la presión interna del equipo, un transductor de presión diferencial, un software para la interpretación de la información y una celda de acero inoxidable que contiene el núcleo (García *et al.*, 2019).

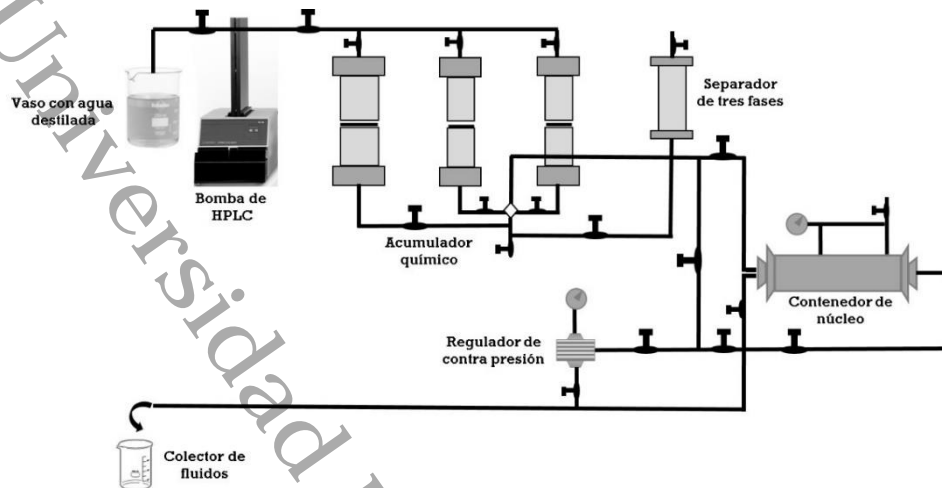


Figura 10. Representación esquemática de un equipo para ensayo de coreflooding. Fuente: Darvishi *et al.*, 2011.

El método de inundación de núcleo puede variar de una investigación a otra debido a que cada yacimiento y su correspondiente contenido de petróleo tiene sus propias características, pero en términos generales se sigue la misma metodología. Por ejemplo, Castorena-Cortés *et al.*, (2012) indican que el núcleo primero se satura con una solución de salmuera (previo vacío) con un contenido de NaCl a 15 g/L para después ser saturado con petróleo a un 75.5%. Posteriormente se hace vacío por segunda vez al núcleo con el fin de extraer el aire remanente y mejorar la impregnación de petróleo en la roca. Los resultados deben medirse y compararse con otras investigaciones similares con el fin de evaluar su eficiencia.

1.3.8.2 Uso de la celda de Amott

El método de la celda de Amott guarda algunas similitudes con el anterior método del coreflooding. En la figura 11 se puede ver la estructura que se emplea para este método (García *et al.*, 2019). Ambos tienen un protocolo de impregnación similar y también ambos hacen uso de una roca o núcleo que puede ser natural, directamente del yacimiento o de diseño comercial. Este método funciona a través del proceso de imbibición espontánea. Éste es un proceso en donde un fluido que satura un medio capilar es desplazado por otro fluido, y es espontánea cuando el fluido desplazante penetra el medio capilar únicamente bajo la acción de las fuerzas capilares.

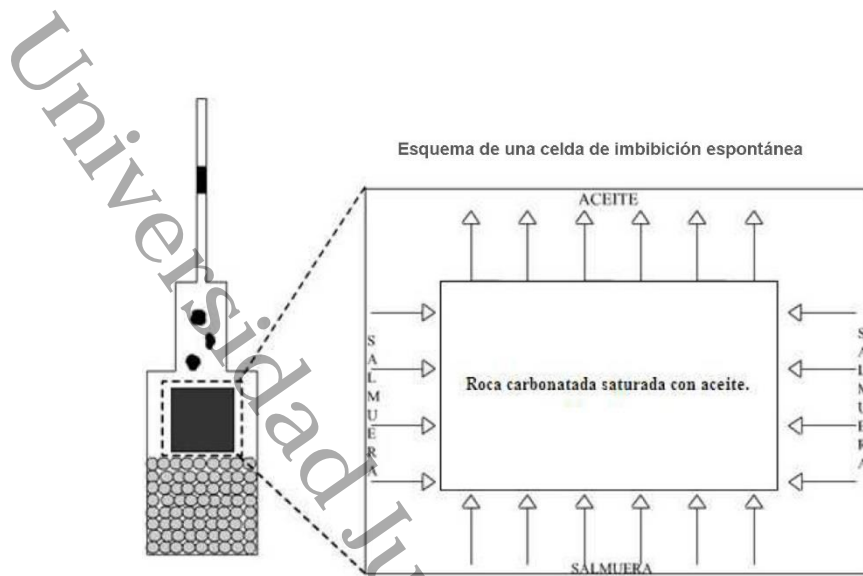


Figura 11. Celda de Amott y proceso de imbibición espontánea. Fuente: Ramírez, 2010.

En la celda de Amott se mide la cantidad de aceite expulsado del núcleo (previamente saturado con aceite) por el efecto de imbibición de la salmuera con y sin caldo microbiano. En la figura 11 se muestra un esquema de celda de imbibición espontánea. A diferencia del ensayo de coreflooding, la celda simula las condiciones físicas de un pozo, ya que se trata de una columna donde las condiciones son estáticas, no así el coreflooding donde el sistema es dinámico (García *et al.*, 2019).

Los volúmenes de aceite expulsado se miden en el tubo capilar graduado cada 24 h hasta el momento en que el aceite deja de fluir. El periodo de confinamiento con el metabolismo del microorganismo que se está evaluando, pero puede ir de 5 a 10 días, siempre en condiciones controladas de laboratorio.

1.3.8.3 Uso de las columnas empacadas con arena (sand pack column)

Como el método anterior que hace uso de la celda de Amott, las columnas empacadas con arena (sand pack columns, en inglés) también simulan las condiciones estructurales en un pozo petrolero. Si bien es el más sencillo de los tres, los resultados de su uso son confiables. Permite el uso de réplicas en condiciones estáticas a diferencia del ensayo de coreflooding, sólo que no usa un núcleo sólido, sino que emplea arena de un tamaño específico, por lo que está orientado más hacia los yacimientos cuya composición mineral es similar a los arenitos, y no carbonatos. La diferencia en densidad entre ambas clases de yacimientos es lo que lleva a la existencia de este método, principalmente. También es el de menor costo de los tres y el más sencillo de diseñar. Debido a ello es posible conectar una serie de dispositivos de manera simultánea (García *et al.*, 2019).

Las columnas empacadas con arena son de uso típico en el laboratorio. Gudiña *et al.*, (2013) hacen una descripción del equipo. Es una columna orientada en forma vertical de acrílico con un volumen de 250 mL. Sin embargo, por el hecho de ser de diseño sencillo las dimensiones y los materiales pueden ser variados. Las columnas empacadas con arena pueden estar hechas de plástico de pvc, o de vidrio, todo depende de las condiciones económicas de los materiales, y el volumen va en función a los objetivos de recuperación en los ensayos de investigación. La figura 12 muestra las características físicas de la columna.

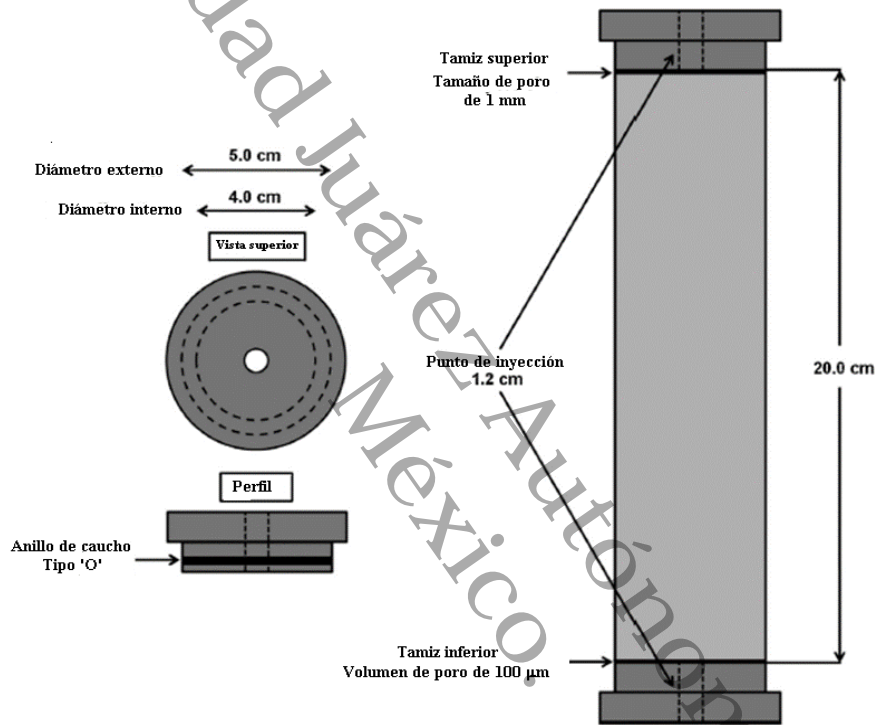


Figura 12. Diseño de una columna empacada con arena.

Fuente: Gudiña *et al.*, 2013.

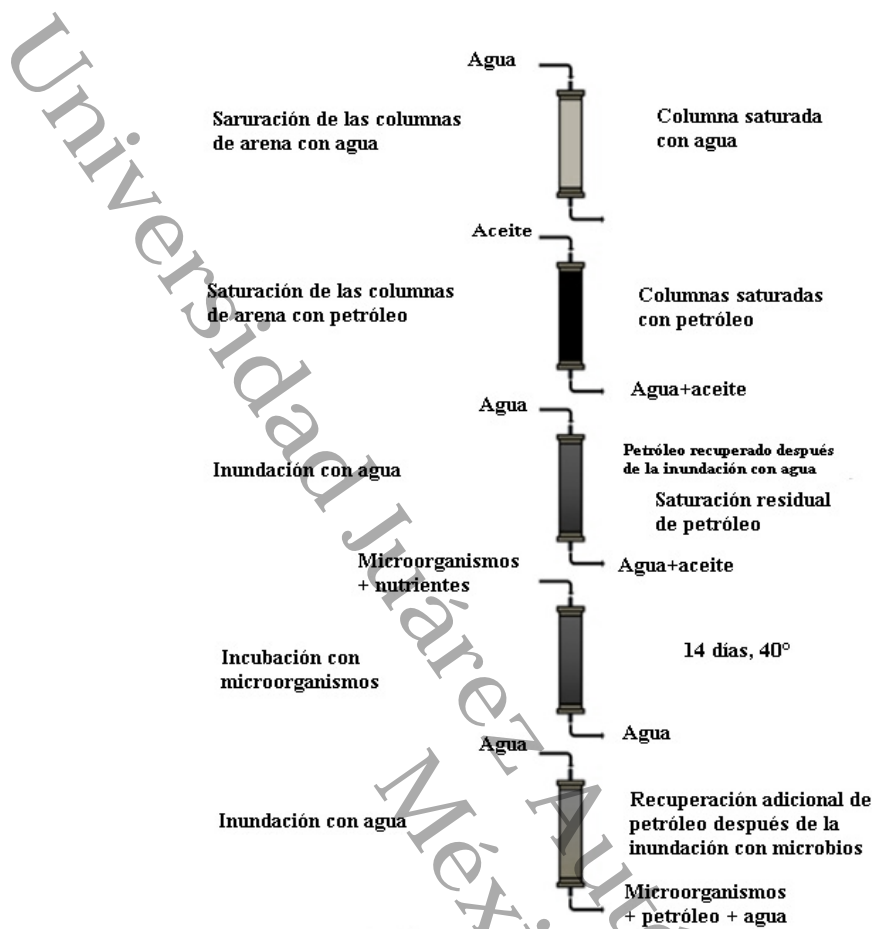


Figura 13. Modelo estándar de recuperación de petróleo en una columna empacada con arena. Fuente: Gudiña *et al.*, 2013.

Las columnas empacadas con arena son de fácil diseño y de bajo costo y no requieren de almacenamientos especiales como el núcleo usado en el coreflooding y la celda de Amott. El uso de microorganismos y sus metabolitos asociados como los biosurfactantes, bioácidos, biosolventes, biopolímeros, bioemulsificantes y biomasa, son una alternativa en la recuperación mejorada de petróleo ya que son de baja toxicidad e impactan menos al medio ambiente en comparación con los métodos terciarios convencionales (García *et al.*, 2019)

1.3.9 REFERENCIAS

Alkan, H., S. Mukherjee and F. Kögler. 2020. Reservoir engineering of in-situ MEOR; impact of microbial community. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. (195). 107928. DOI:10.1016/j.petrol.2020.107928

Amato, M., L. Fantacci and J. G. Speight. 2015. An Introduction to Petroleum Technology, Economics, and Politics. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons. 1-30 p. ISBN: 978-1-118-19254-2

Ambrico, A. and M. Trupo. 2017. Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus subtilis* ET-1, an Iturin A producer strain, on biocontrol of green and gray mold. *Postharvest Biology and Technology*. (134):5-10. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.08.001>

Ashish, M. D. 2018. Application of biosurfactant produced by an adaptive strain of *C.tropicalis* MTCC230 in microbial enhanced oil recovery (MEOR) and removal of motor oil from contaminated sand and water. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. (170):40–48. DOI:10.1016/j.petrol.2018.06.034

Bachmann, R. T., A. Clemens J. and R. G.J. Edyvean. 2014. Biotechnology in the petroleum industry: An overview *International Biodeterioration & Biodegradation*. (86):225-237. DOI:10.1016/j.ibiod.2013.09.011

Bi, Y., J. Xiu and T. Ma. 2019. Application Potential Analysis of Enhanced Oil Recovery by Biopolymer-Producing Bacteria and Biosurfactant-Producing Bacteria Compound Flooding. *Appl. Sci.* (9): 5119. DOI:10.3390/app9235119

Castorena-Cortés G., I. Zapata-Peñasco, T. Roldán-Carrillo, J. Reyes-Avila, M. Mayol-Castillo, S. Román-Vargas and P. Olguín-Lora. 2012. Evaluation of indigenous anaerobic microorganisms from Mexican carbonate reservoirs with potential MEOR application. *Journal of Petroleum Science and Engineering* (81):86–93. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2011.12.010>

Charfeddine, L. and K. Barkat. 2020. Short- and long-run asymmetric effect of oil prices and oil and gas revenues on the real GDP and economic diversification in oildependent economy. *Energy Economics*. ENEECO 104680. DOI: 10.1016/j.eneco.2020.104680

Darvishi, P., S. Ayatollahi, D. Mowla y A. Niazi. 2011. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPP1-2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (84):292–300. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.01.011>

Dhanya, M. S. 2021. Chapter 10 - Biosurfactant-enhanced bioremediation of petroleum hydrocarbons: potential issues, challenges, and future prospects. *Bioremediation for Environmental Sustainability, Toxicity, Mechanisms of Contaminants Degradation, Detoxification, and Challenges*. 215-250. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820524-2.00010-9>

Difiglio, C. 2014. Oil, economic growth and strategic petroleum stocks. *Energy Strategy Reviews*. Pages 48-58 <https://doi.org/10.1016/j.esr.2014.10.004>

Elakkiya, V. T., P. S. Kumar, N. S. Alharbi, S. Kadaikunnan, J. M. Khaled and M. Govindarajan. 2020. Swift production of rhamnolipid biosurfactant, biopolymer and synthesis of biosurfactant-wrapped silver nanoparticles and its enhanced oil recovery. *Saudi Journal of Biological Sciences* (27):1892–1899. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.04.001>

Fooladi, T., N. Moazami, P. Abdesahian, A. Kadier, H. Ghojavand, W. M. Wan Yusoff and A. A. Hamid. 2016. Characterization, production and optimization of lipopeptide biosurfactant by new strain *Bacillus pumilus* 2IR isolated from an Iranian oil field. *Journal of Petroleum Science and Engineering* (145):510–519. DOI:10.1016/j.petrol.2016.06.015

Gao, H., H. Lai, J. Zhang y Q. Xue. 2017. Effects of bacterial cell density and alternating microbial- and enzymolysis-enhanced oil recovery on oil displacement efficiency. *Chemical Engineering Journal* (327) 28–38. DOI:10.1016/j.cej.2017.06.083

García, F. F., R. L. Fócil M., M. E. Ojeda M., M. A. Hernández R. y U. M. Ojeda M. 2019. Métodos ex situ de recuperación terciaria de petróleo empleando microorganismos. *Kuxulkab´. 25(51):25 – 32*. DOI: <https://doi.org/10.19136/kuxulkab.a25n51.2908>

Geetha, S. J., I. M. Banat and S. J. Joshi. 2018. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (14):23–32. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.010>

González, S. y E. Hernández. 2016. Impactos indirectos de los precios del petróleo en el crecimiento económico colombiano. *Lecturas de Economía*, (84). Pp. 103-141 doi: 10.17533/udea.le.n84a04

Gudiña, E. J., J. F.B. Pereira, R. Costa, J. A. P. Coutinho, J. A. Teixeira and L. R. Rodrigues. 2013. Biosurfactant-producing and oil-degrading *Bacillus subtilis* strains enhance oil recovery in laboratory sand-pack columns. *Journal of Hazardous Materials* (261) 106– 113. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.071>

Guo, K., H. Li and Z. Yu. 2016. In-situ heavy and extra-heavy oil recovery: A review. *Fuel*. (185):886–902 DOI:10.1016/j.fuel.2016.08.047

Hadia, N. J., C. Ottenheim, S. Li, N. Q. Hua. L. P. Stubbs H. C. Lau. 2019. Experimental investigation of biosurfactant mixtures of surfactin produced by *Bacillus Subtilis* for EOR application. *Fuel*. (251):789-799. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.03.111>

Hernández, R. M. A., Ojeda M.U., Martinez M.A. 2016. Factores que afectan la Recuperación Mejorada de Petróleo empleando microorganismos. Monografía. COPPER-Universidad Federal de Río de Janeiro. Brasil 1-50 p. DOI: <https://doi.org/10.19136/jobs.a5n15.3569>

Huc, A.Y. 2011. Part 1, Heavy Crude Oils. In: Alain-Yves Huc (comp). Heavy Crude Oils. From Geology to Upgrading, an Overview. T Editions TECHNIP 25 rue Ginoux, 75015 Paris, France. France ISBN 2-7108-0890-9

Ibrahim. H. M. M. 2018. Characterization of biosurfactants produced by novel strains of Ochrobactrum anthropi HM-1 and Citrobacter freundii HM-2 from used engine oil-contaminated soil. Egyptian Journal of Petroleum. (27):21–29. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2016.12.005>

IMP. 2016. Tipos de Petróleo. Instituto Mexicano del Petróleo. [<http://www.imp.mx/petroleo/?imp=tipos>]. Fecha de Consulta: 21 de mayo del 2016.

Jafarnejad, S. 2017. Petroleum Waste Treatment and Pollution Control. Cap 1. Introduction to the Petroleum Industry. ELSEVIER—Butterworth-Heinemann. Paperback ISBN: 9780128092439 eBook ISBN: 9780128094983

Jahan, R., A. M. Bodratti, M. Tsianou and P. Alexandridis. 2020. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. Advances in Colloid and Interface Science. (275). 102061. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>

Joy, S., P. K. S. M. Rahman and S. Sharma. 2017. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. Chemical Engineering Journal (317):232–241. DOI:10.1016/j.cej.2017.02.054

Kögler, F., E. Mahler, N. Dopffel, D. Schulze-Makuch, A. Borovina, F. Visser, A. Herold and H. Alkan. 2021. The Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) potential of Halanaerobiales under dynamic conditions in different porous media. Journal of Petroleum Science and Engineering. (196). 107578. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2020.107578>

Liu, Q., J. Niu, Y. Yu, C. Wang, S. Lu, S. Zhang, J. Lv and B. Peng. 2021. Production, characterization and application of biosurfactant produced by Bacillus licheniformis L20 for

microbial enhanced oil recovery. Journal of Cleaner Production. (307). 127193. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127193>

Marques, A. V., C. Reis G., D. Jurelevicius, L. Vieira A. de C., J. Sampaio de S., F. Faria da M., D. Maria G. F. and L. Seldin. 2020. Microbial enhanced oil recovery potential of surfactin-producing *Bacillus subtilis* AB2.0. Fuel (272):117730. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117730>

Merdrignac, I., D. Espinat, I. Henaut and J-F. Argillier. 2011. Cap. 2. Propertis and composition. In: Alain-Yves HUC (comp). Heavy Crude Oils. From Geology to Upgrading, an Overview. T Editions TECHNIP 25 rue Ginoux, 75015 Paris, France. France ISBN 2-7108-0890-9;

Mo, B., C. Chen, H. Nie and Y. Jiang. 2019. Visiting effects of crude oil price on economic growth in BRICS countries: Fresh evidence from wavelet-based quantile-on-quantile tests. Energy. (178):234-251. DOI: 10.1016/j.energy.2019.04.162

Mohsenatabar Firozjahi, A. y H. R. Saghafi. 2019. Review on chemical enhanced oil recovery using polymer flooding: Fundamentals, experimental and numerical simulation. In Press, Corrected Proof. DOI:10.1016/j.petlm.2019.09.003

Mondal, M.H., A. Sarkar, T. K. Maiti and B. Saha. 2017. Microbial assisted (*pseudomonas sp.*) production of novel bio-surfactant rhamnolipids and its characterisation by different spectral studies. Journal of Molecular Liquids (242) 873–878. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.07.089>

Niu, J., Q. Liu a, J. Lv b and B. Peng. 2020. Review on microbial enhanced oil recovery: Mechanisms, modeling and field trials. Journal of Petroleum Science and Engineering Volume (192). 107350. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2020.107350>

Ojeda-Morales, M. E., M. Domínguez-Domínguez, M. A. Hernández-Rivera and J. G. Álvarez-Ramírez. 2016. Biosurfactant Synthesized by *Azospirillum lipoferum* ALM1B2: Characterization and Application for Environmental Protection. Water Air Soil Pollut 227, 181. DOI:10.1007/s11270-016-2871-6

Oluwaseun A. C., O. J. Kola, P. Mishra, J. Ravinder Singh, A. K. Singh, S. S. Cameotra and B. Oluwasesan Micheal. Characterization and optimization of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* C1501 with novel biosurfactant activities. Sustainable Chemistry and Pharmacy (6):26–36. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2017.07.001>

Patel, J., S. Borgohain, M. Kumar, V. Rangarajan, P. Somasundaran and R. Sen. 2015. Recent developments in microbial enhanced oil recovery. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. (52):1539–1558. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.135>

Petróleos Mexicanos (PEMEX). 2018. Anuario Estadístico. Gobierno del Estado. 241 pág. (<https://www.pemex.com/ri/Publicaciones/Paginas/Anuarioestadístico.aspx>).

Petróleos Mexicanos (PEMEX). 2020. Anuario Estadístico. Gobierno del Estado. 141 pág. (<https://www.pemex.com/ri/Publicaciones/Paginas/Anuarioestadístico.aspx>).

Phulpoto, I. A., B. A. Jakhrani, A. H. Phulpoto, A. A. Panhyar, N. A. Kanhar, S. Ahmed and M. A. Qaz. 2020. Enhanced Oil Recovery by Potential Biosurfactant-Producing Halotolerant Bacteria Using Soil Washing and Sand-Packed Glass Column Techniques. *Curr Microbiol* (77):3300–3309. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02172-3>

Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA). 2013. Informe anual. México. 125 pág.

Ramírez, P. C. 2010. Nuevo surfactante en el control e inhibición de asfaltenos en un pozoyacimiento. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México. 61 pág.

Safdel, M., M. Amin Anbaz, A. Daryasafar and M. Jamialahmadi. 2017. Microbial enhanced oil recovery, a critical review on worldwide implemented field trials in different countries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (74):159–172 <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.02.045>

Sajna, K. V., R. Höfer, R. K. Sukumaran, L. D. Gottumukkala and A. Pandey. 2015. White Biotechnology in Biosurfactants, chapter 14. In: Pandey, A., R. Höfer, C. Arroche, M. Taherzadeh, and K. M. Nampoothiri (editors). Elsevier-Book Aid International. USA. 499-517

Saravanan, A., P. Senthil Kumar, K. Harsha Vardhan, S. Jeevanantham, S. Babu Karishma, P. Ragini Yaashikaa and P. Vellaichamy. 2020. A review on systematic approach for microbial enhanced oil recovery technologies: Opportunities and challenges. *Journal of Cleaner Production*. (258). 20777. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120777>

Satter, A. and G. M. Iqbal. 2016. Cap 17. Enhanced oil recovery processes: thermal, chemical, and miscible floods. *Reservoir Engineering, The Fundamentals, Simulation, and Management of Conventional and Unconventional Recoveries*. DOI:10.1016/B978-0-12-800219-3.00017-6

Secretaría de Energía (SENER). 2020. <https://www.gob.mx/sener> .

Sharma, S. and L. M. Pandey. 2020. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* RSL-2 isolated from sludge and biosurfactant mediated degradation of oil. *Bioresource Technology* (307). 123261. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123261

Sheng, J. J. 2020. Other enhanced oil recovery methods. *Enhanced Oil Recovery in Shale and Tight Reservoirs*, 457–467. eBook ISBN: 9780128162712 Paperback ISBN: 9780128159057

Shibulal, B., S. N. Al-Bahry, Y. M. Al-Wahaibi, A. E. Elshafie, A. S. Al-Bemani and S. J. Joshi. 2014. Microbial Enhanced Heavy Oil Recovery by the Aid of Inhabitant Spore-Forming Bacteria: An Insight Review. *The Scientific World Journal*. Article ID 309159. 1-12. <https://doi.org/10.1155/2014/309159>

Shoeb, E., F. Akhlaq, U. Badar, J. Akhter and S. Imtiaz. 2013. Classification and industrial applications of biosurfactants. *Natural and Applied Sciences*. VOL 4 N 3 4(3):243-252. ISSN-L 2223-9444

Solaymani. S. and F. Kari. 2019. Environmental and economic effects of high petroleum prices on transport sector. *Energy* (60):435–441. DOI:10.1016/j.energy.2013.08.037

Speight, J. 2016. Introduction to enhanced recovery methods for heavy oil and tar sands. Part I. *Reservoirs and Reservoir Fluids*. Second Edition. U.S.A. Paperback ISBN: 9780128499061 eBook ISBN: 9780128018750

Speight, J. G. 2015. *Enhanced Oil Recovery Handbook: A Guide to Heavy Oil*. Cap. 1. Definitions. Gulf Publishing Company. USA.

Tadros, T. F. 2014. *An Introduction to Surfactants*. De Gruyter. Germany. ISBN: 978-3-11-031212-6.

Tatar, A. 2018. *Microbial Enhanced Oil Recovery: Microbiology and Fundamentals*. Chapter 10. Fundamentals of Enhanced Oil and Gas Recovery from Conventional and Unconventional Reservoirs DOI:10.1016/B978-0-12-813027-8.00010-2

The World Factbook, 2020. <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/rankorder/2241rank.html>. Fecha de consulta:

Varjani, S. J. 2017. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology* (223):277–286. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.10.037

Varjani, S. J. and V. N. Upasani. 2017. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource Technology* (232):389–397.

Xu, Y., D. Cai, H. Zhang, L. Gao, Y. Yang, J. Gao, Y. Lib, C. Yang, Z. Ji, J. Yu, S. Chen. 2019. Enhanced production of iturin A in *Bacillus amyloliquefaciens* by genetic engineering and medium optimization. *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.017>

Yang, Z., Y. Zu, J. Zhu, M. Jin, T. Cui and X. Long. 2020. Application of biosurfactant surfactin as a pH-switchable biodemulsifier for efficient oil recovery from waste crude oil. *Chemosphere*. (240):1-8. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124946

Vishnyakov, V., B. Suleimamov and E. Zeynalov. 2019. Primer on enhanced oil recovery. Gulf Professional Publishing. United Kingdom. Paperback ISBN: 9780128176320 eBook ISBN: 9780128176337

CAPÍTULO 2

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE SURFACTANT ACTIVITY OF AMPHIPHILIC MOLECULES SYNTHESIZED BY *Raoultella planticola*

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SURFACTANTE DE MOLÉCULAS ANFIFÍLICAS SINTETIZADAS POR *Raoultella planticola*

RESUMEN

En el presente trabajo fueron reactivadas catorce cepas bacterianas, preservadas en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. De las cuales cuatro fueron seleccionadas a través de una prueba de ensayo hemolítico que permitió conocer con alfa (α) o beta (β) hemólisis posible presencia de biosurfactantes. Las cepas seleccionadas fueron inoculadas en dos medios minerales con base de nitrógeno (nitrofoska y triple 17), la absorbancia fue medida con un espectrofotómetro de UV-VIS cada 6 h por 96 h para conocer la cinética de crecimiento. Para estimar el tiempo de máxima producción de biosurfactante se emplearon diferentes pruebas como gota colapsada, índice de emulsificación y dispersión de aceite. Con base a estos resultados se identificó por medio de pruebas bioquímicas a la cepa *Raoultella planticola*, que acorde a los análisis de cromatografía en capa fina y FT-IR es productora de glucolípidos. El rendimiento de la producción de biosurfactantes para *R. planticola* fue de 3.22 g L⁻¹.

PALABRAS CLAVE: Biosurfactante, *Raoultella*, MEOR, petróleo

2.1 INTRODUCCIÓN

El petróleo es la principal fuente de energía a nivel mundial. Debido a la importancia que reviste como fuente de energía, se han desarrollado diversas técnicas para incrementar el factor de recuperación, algunas de las cuales emplean sustancias que resultan tóxicas para el medio ambiente. Los métodos químicos emplean sustancias como: NaOH, Na₂SiO₃ y Na₂CO₃; también utilizan polímeros como poliacrilamidas; los procesos miscibles utilizan alcoholes y gases como CO₂, C₃H₈, mezclas de C₃H₈-C₄H₁₀ y gases ricos en C₂H₆, C₃H₈, C₄H₁₀ y C₅H₁₂; mientras que la inundación con polímeros-surfactantes hace uso de surfactantes sintéticos que no son biodegradables, lo cual altera la composición final del petróleo (Fooladi *et al.*, 2016; Speight, 2016; Khan *et al.*, 2021).

De los métodos terciarios disponibles, el microbiano es visto con gran interés comercial. El uso de surfactantes de origen microbiano (biosurfactantes) es posiblemente la mejor

alternativa puesto que éstas son moléculas de superficie activa capaces de mezclar sustancias inmiscibles, no son tóxicas al ambiente y son biodegradables. La producción de biosurfactantes es un proceso por lo general de alto costo, ya que también son empleados con fines biomédicos y alimenticios, pero en los procesos de recuperación mejorada de petróleo no es necesaria alta pureza debido a que no se usa en seres humanos o animales. Para esto, es suficiente el uso del caldo crudo libre de células que además de biosurfactantes contiene otros productos metabólicos que actúan sinérgicamente, lo cual incide directamente en la eficiencia de la recuperación de petróleo. La cantidad recuperada dependerá de la diversidad de moléculas que contenga el caldo libre de células (Bachmann *et al.*, 2014; Marques *et al.*, 2015; Soares Da Silva *et al.*, 2017; Hernández *et al.*, 2019; Janaghi *et al.*, 2022).

El uso del caldo libre de células, y el empleo de fuentes de carbono de bajo costo, como sucede con desechos agroindustriales de remolacha, melaza de caña de azúcar, cascarillas de trigo o arroz (Mohanty *et al.*, 2021; Cieurko *et al.*, 2022) o algunos fertilizantes industriales como el nitrofoska rojo (Hernández *et al.*, 2011) puede disminuir los costos de producción hasta en un 60 %, ya que la fuente de carbono y nitrógeno influyen en el tipo de biosurfactante producido (y los demás metabolitos secundarios), así como factores físicos y químicos como el pH, salinidad, temperatura y la cepa microbiana de la cual derivan (Soares Da Silva *et al.*, 2017; Das y Kumar., 2019; Jahan *et al.*, 2020) puede abaratar los costos de producción hasta en un 60 %, ya que la fuente de carbono y nitrógeno influyen en el tipo de biosurfactante producido (y los demás metabolitos secundarios), así como factores físicos y químicos como el pH, salinidad, temperatura y la cepa microbiana de la cual derivan (Soares Da Silva *et al.*, 2017; Das y Kumar., 2019; Jahan *et al.*, 2020).

El uso del caldo libre de células permite una mejor actividad de los metabolitos en el proceso de recuperación. La biomasa celular tiende a obstruir los capilares de la roca por donde el petróleo fluye una vez que la mojabilidad de la roca ha cambiado. El tamaño relativamente grande de las células bacterianas es una característica no deseable del caldo libre de células (Patel *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2017; Khubaib *et al.*, 2020). Peekate & Abu (2017) mencionan la importancia de no usar reactivos innecesarios en la producción de biosurfactantes, por lo que la determinación de la máxima producción de biosurfactantes con la menor cantidad de reactivos es requerida.

La demanda de petróleo a nivel mundial no ha disminuido, incluso se prevé que aumente hasta un 73 % para el año 2030. El 94 % de la energía utilizada para el transporte en forma de gasolinas, diesel o turbosinas, proviene de su transformación y quema (Ajona & Vasanthi., 2021; Hoang *et al.*, 2021). Por lo tanto, es necesario hallar cepas microbianas que permitan recuperar, mediante el uso de sus metabolitos, las reservas de petróleo que por su alta densidad no pueden ser extraídos por los métodos primarios y secundarios.

En este sentido es común reportar cepas como *Pseudomonas* y *Bacillus* como productoras de biosurfactantes. Sin embargo, existen otras como *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter sp.*, *Pantoea sp.*, *Burkholderia*, *Escherichia coli* que también han sido reportadas. Pero hay otras como las bacterias del género *Raoultella* (antes *Klebsiella*, Castillo-Macías *et al.*, 2018). que también tienen el potencial de producir biosurfactantes (principalmente ramnolípidos),

sin embargo, se reportan muy pocas veces. *Klebsiella sp* es capaz de usar diferentes fuentes de carbono (remolacha, sacarosa, xilosa, aceite de soja) que les permite producir biosurfactantes que pueden ser usados en biorremediación y en recuperación mejorada de petróleo (Ahmad *et al.*, 2021). No obstante, debido al efecto que ejerce la cepa microbiana sobre las propiedades del aceite, y éste sobre la actividad del microorganismo, es de suma importancia que éste sea autóctono del reservorio o campo petrolero donde se desea probar porque éstos se hallan adaptados a las condiciones de cada pozo particular. Estas condiciones físico-químicas y geoquímicas pueden llegar a ser extremas, ya que con la profundidad se modifican otros factores físicos característicos de un yacimiento (Varjani & Gnansounou., 2017; Alkan *et al.*, 2020; Kögler *et al.*, 2021). Por tal motivo esta investigación tiene como objetivo seleccionar un conjunto de cepas productoras de biosurfactantes a partir de un cepario de bacterias petrofílicas que puedan ser aplicados en la recuperación mejorada de petróleo.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES

En esta investigación se emplearon cepas bacterianas preservadas en el laboratorio de biotecnología de la División Académica de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, las cuales fueron reactivadas y purificadas en medio agar nutritivo por el método de siembra en placa propuesto por Madigan *et al.*, (2017).

Las cepas bacterianas reactivadas se sometieron a una prueba de ensayo hemolítico con el fin de conocer su potencial para producir biosurfactantes (Datta *et al.*, 2018). Las cepas fueron sembradas por estriado en una muestra de agar sangre al 5 %, a 30° C y mantenidas en incubación por tres días. La presencia de manchas verdes oscuras (α -hemólisis) o amarillo transparente (β -hemólisis) se consideró como positiva para la producción de biosurfactantes. La ausencia de estas indicó que no hubo hemólisis (Joy *et al.*, 2017; Ogunshe & Falode., 2021).

2.2.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas seleccionadas fueron inoculadas en dos medios minerales con fuente de nitrógeno diferentes. El primero está disponible en el mercado bajo el nombre comercial de Blaukorn classic, también conocido como nitrofoska azul, cuya composición es: 12 % de nitrógeno total, 8 % P₂O₅, 16 % K₂O, 10 % S, 3 % Mg, 0.06 % Fe, 0.02 % B y 0.01 % Zn. El segundo medio empleado es el conocido como triple 17, su composición es: nitrógeno 17 % + fósforo 17 % + potasio 17 %.

Durante la primera fase del crecimiento, las cuatro cepas crecieron en caldo nutritivo (g/L): 1.0 de extracto de carne, 2.0 de extracto de levadura, 5.0 de peptona y 5.0 de NaCl (Kanna, 2017). Las cepas alcanzaron una densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (OD600) de 0.3 y después fueron inoculadas en los medios minerales descritos. A partir de entonces se midió la absorbancia con un espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys 20, cada 6 h durante 96 h para determinar la cinética de crecimiento. Se establecieron 4 biorreactores por cada medio, por triplicado. Un volumen de 350 mL se preparó con nitrofoska, con una composición de (g/L): 0.5 de nitrofoska como fuente de nitrógeno y 1.175 de sacarosa como fuente de carbono. La relación C/N de este medio fue de 29.61. El segundo medio con triple 17 tuvo una composición de (g/L): 0.5 de triple 17 y 1.175 de sacarosa, cuya relación C/N fue de 21.07. Los biorreactores contaron con un sistema de aireación continuo, para asegurar la correcta distribución del aire. La tasa de flujo volumétrico fue de 1.21×10^{-4} m³/s a una temperatura promedio de 29.1 °C.

El análisis estadístico se realizó por medio de un diseño experimental con arreglo factorial 4x2. El factor A fue la cepa microbiana, con cuatro niveles: C1, C2, C3 y C4; el factor B el medio mineral con base de nitrógeno, con dos niveles: nitrofoska y triple 17. Se establecieron ocho tratamientos por triplicado, con 24 unidades experimentales. Los resultados fueron analizados con el paquete estadístico Statgraphics Centurion™ v.XVIII a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, empleando un análisis de varianza multifactorial para medidas repetidas en el tiempo, seguido de una prueba a posteriori de Tukey.

2.2.3 OBTENCIÓN DEL CALDO BACTERIANO LIBRE DE CÉLULAS

En condiciones controladas se estableció un bioensayo, éste fue inoculado con las cepas identificadas como: C1, C2, C3 y C4 en un medio mineral con base de nitrógeno para la obtención del caldo bacteriano libre de células. Se obtuvieron alícuotas de 30 mL cada 6 h durante los tiempos (h): 18, 30, 42, 54, 66, 78, 90 y 96. La fase estacionaria se estableció a partir de las 18 h de cultivo. Cada muestra de caldo libre de células fue centrifugada a 6,000 rpm por 20 minutos. Las muestras se almacenaron durante 24 h a 4 °C.

2.2.4 SELECCIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES

Para estimar el tiempo de máxima producción de biosurfactantes se emplearon las siguientes pruebas adicionales.

2.2.4.1 Prueba de ensayo hemolítico

Las muestras de agar base sangre al 5 % se prepararon en el laboratorio según lo propuesto por (Joy *et al.*, 2017), y con ayuda de un sacabocado, la superficie del agar fue perforado. De acuerdo con los tiempos de muestreo se realizaron ocho perforaciones que corresponden a los ocho tiempos de muestreo de la fase estacionaria, para cada una de las cuatro cepas bacterianas. Por otra parte, el caldo libre de células de los medios nitrofoska y triple 17 fue puesto a prueba; se agregaron aproximadamente 0.1 mL del caldo libre de células en cada perforación según los tiempos de muestreo, para observar la presencia de sustancias tensioactivas que provoquen hemólisis.

La presencia de halos verde oscuro (α -hemólisis) o amarillo-transparente (β -hemólisis) alrededor de cada perforación indica la probable presencia de biosurfactantes. El diámetro del halo se midió haciendo uso del programa FIJI de ImageJ win-32 versión 1.44o, y de acuerdo con estos resultados se estimó el tiempo de máxima producción de biosurfactantes.

2.2.4.2 Prueba de gota colapsada

En una superficie hidrofóbica, como una banda de parafilm, se colocaron 40 μ L de cada caldo bacteriano libre de células por cada tiempo de muestreo, y a continuación se observó la forma de la gota. La presencia de biosurfactante conduce a la reducción de la tensión interfacial entre la banda hidrofóbica de parafilm y la gota hidrofílica del caldo libre de células (Joy *et al.*, 2017). El diámetro de cada una de las gotas se midió con un vernier para posteriores comparaciones.

2.2.4.3 Dispersión de aceite

Para este ensayo se usaron cajas de petri de 90 x 10 mm. De acuerdo con Marques *et al.*, (2015) en cada caja se colocó un volumen de 50 mL de agua destilada y se añadieron 20 μ L de petróleo crudo pesado (15.18 °API) para formar una capa delgada y superficial de hidrocarburos. Posteriormente 10 μ L del sobrenadante libre de células se aplicaron sobre la capa de aceite. Los resultados se consideraron positivos cuando el caldo libre de células añadido formó una zona de aclaramiento sobre la película de aceite, a causa de la presencia de moléculas tensioactivas. El diámetro fue medido en la zona de aclaramiento con un vernier en cada una de las cajas cuyo resultado fue positivo para determinar el tiempo de mayor producción de biosurfactantes.

2.2.4.4 Índice de emulsión (E24)

En un tubo de ensayo se mezclaron 2 mL de n-hehexadecano y 2 mL de caldo libre de células, posteriormente se agitó en un vortex durante 2 minutos y se dejó reposar por 24 h. El índice

de emulsificación es la relación entre la altura de la capa de la emulsión y la altura total de la mezcla (Cooper & Goldenberg, 1987; Ja'afaru *et al.*, 2022).

2.2.5 CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA BACTERIANA: MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS AISLADAS, TINCIÓN DE GRAM, TAMAÑO CELULAR Y PRUEBAS BIOQUÍMICAS API 20 E

Para hacer esta caracterización se llevaron a cabo pruebas como la tinción de Gram, publicado en el Manual de Técnicas de Laboratorio de la Universidad Autónoma Metropolitana (Aquiahuatl & Pérez, 2004). Esta prueba clasifica de forma general a las bacterias según su capacidad de tinción, conforme a la estructura de la pared celular. También se identificó la forma de las UFC (unidades formadoras de colonias) (Kumar, 2012) con la técnica de siembra por superficie descrita por Madigan *et al.*, (2017). Del mismo modo se realizaron micrografías electrónicas según la guía de microscopía electrónica de González *et al.*, (2003) utilizando un microscopio HRTEM JEOL JEM 2100 a 200 Kv en modo de campo claro con pieza polar objetiva de alta resolución con filamento de LaB6. Usando el software GATA digital micrograph, calibrado con una muestra patrón de oro en el plano de 1.09 mm con un margen de error de ± 0.1 %.

La identificación de la cepa bacteriana se realizó con un análisis fenotípico del sistema API 20 E marca Bio-Merieux. Este análisis contiene 20 microtubos con sustancias deshidratadas como: glucosa, arginina dihidrolasa, ureasa y por ensayos de asimilación de D-glucosa, L-arabinosa, D-manosa, D-manitol, D-ribosa, Nacetil glucosamina, D-sorbitol y D-fructosa por mencionar algunas. En cada microtubo se agrega un inóculo bacteriano para rehidratar las sustancias, se incubó de 24 a 48 h, transcurrido este tiempo se observan los cambios de color y se compara con la tabla de identificación del sistema API 20 E.

2.2.6 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL BIOSURFACTANTE

Las cepas que dieron positivo en la producción de biosurfactantes fueron cultivadas nuevamente en 1,000 mL de medio mineral con base de nitrógeno y después de 90 h de incubación, el caldo se centrifugó a 6,000 rpm por 20 min para remover la biomasa celular. El sobrenadante fue separado en un vaso de precipitado de 1,000 mL para acidificar el medio libre de células. Se agregó HCl 2 N hasta lograr un pH 2.0, dejándose en agitación por 24 h a 4 °C. Transcurridas las 24 h se observó un precipitado en forma de polvo en el fondo del vaso. El caldo se centrifugó por segunda vez a 6,000 rpm por 20 min hasta concentrar el precipitado en el fondo del tubo. Posteriormente se separó el precipitado y se suspendió en agua destilada (pH 7.0) y se congeló hasta su posterior liofilización.

2.2.7 IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS POLARES Y GRUPOS FUNCIONALES

Cromatografía en capa fina. Las muestras de biosurfactante parcialmente purificado fueron analizadas en placas de sílica gel 60 F254 para la identificación de glucolípidos, lipopéptidos y fosfolípidos. Cada placa cromatográfica de 3.5 mm x 100 mm estaba cubierta con una capa de sílica gel de 0.25 mm. Se empleó una mezcla de solventes, constituido de cloroformo/acetona/metanol/ácido acético/agua destilada en una proporción de 6:8:2:2:1 v/v se emplearon tres soluciones reveladoras.

Para glucolípidos se disolvieron 2 g de difenilamina en 20 mL de etanol y se agregaron 100 mL de ácido clorhídrico al 38% de pureza y 80 mL de ácido acético a la solución; la placa se roció con difenilamina y después se calentó a 105°C en una estufa marca MEMMERT (Hamilton & Hamilton, 1992).

La solución reveladora de lipopéptidos se preparó ninhidrina al 2 % en etanol. La placa se roció con esta solución y después se calentó a 100 °C por espacios de 5 a 10 min.

Solución reveladora de fosfolípidos 0.1g de azul de bromotinol se disolvió en 100 mL de una solución de NaOH 0.01M. La placa se roció con esta solución y después se calentó la placa a 100°C.

Para la identificación de grupos funcionales se empleó un Espectrofotómetro marca Shimadzu, modelo IRAffinity-1 con un accesorio de reflexión total atenuada (ATR). El rango del análisis fue de 400 1/cm con una resolución de 2.0 1/cm. Espectroscopía del infrarrojo cercano con transformadas de Fourier (FT-IR). El FT-IR permite identificar la composición molecular del biosurfactante parcialmente purificado usando esferas de KBr grado espectral aplicando una fuerza de compresión de 5-6 ton/cm² por 10 minutos con ayuda de una prensa hidráulica.

2.2.8 TENSIÓN SUPERFICIAL (TS) Y CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA (CMC)

En un tensiómetro digital Krüs modelo K 10 ST se llevaron a cabo las mediciones de la TS y la CMC del biosurfactante puro producido por la cepa *Acinetobacter baumannii* (CC1). El equipo permite la medición de la TS e interfacial entre dos líquidos inmiscibles. El método empleado fue el del plato de Wilhelmy a una temperatura de 30 °C. En este método se mide la fuerza hacia abajo que sobre una placa lisa ejerce la superficie o interface a la cual se desea determinar la tensión cuando esta placa toca exactamente esa superficie o interface.

2.3 RESULTADOS

3.2.1 Selección de cepas productoras de biosurfactantes

Se utilizaron 14 cepas bacterianas que pertenecen al cepario del Laboratorio de Biotecnología de la División Académica de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (Ojeda-Morales *et al.*, 2016), las cuales fueron reactivadas, y purificadas por el método de siembra por estrías propuesto por Madigan *et al.*, (2017) tal como se muestra en la figura 1.

Las cepas purificadas y reactivadas cumplieron con la característica de ser hidrocarbonoclastas, con base a la información proporcionada por el laboratorio de biotecnología de la División Académica de Ingeniería y Arquitectura de la UJAT por lo que fueron aptas para su uso como posibles productoras de biosurfactantes, pero, como no todas las cepas bacterianas que degradan hidrocarburos producen sustancias tensioactivas (Datta *et al.*, 2018), se aplicó una prueba de ensayo hemolítico.

Un total de 14 cepas bacterianas fueron reactivadas, de las cuales el ensayo hemolítico permitió seleccionar cuatro, las cuales se denominaron: C1, C2, C3 y C4. La aparición de un halo blanco-amarillento o transparente (β -hemólisis), y verde oscuro (α -hemólisis) se tomó como positivo (Fig. 14).



Figura 14. Cepa bacteriana C1 y C2 positiva con α hemólisis, Cepa bacteriana C3 y C4 positiva con β hemólisis.

Figura 14. Bacterial strain C1 and C2 positive with α hemolysis, Bacterial strain C3 and C4 positive with β hemolysis.

3.2.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Los resultados de la cinética de crecimiento muestran el perfil del crecimiento de las cepas C1, C2, C3 y C4 en medio con nitrofoska a una temperatura ambiental promedio de 28 ± 1 °C y humedad ambiental del 51 % (fig. 15). Se observó un crecimiento acelerado durante las primeras 12 h y a las 18 h se alcanzó la fase exponencial. La cepa C4 tuvo un periodo de

adaptación más largo que las otras y su fase estacionaria llegó hasta las 54 h. En la fig. 16 se muestra el crecimiento en medio mineral triple 17 para las cepas evaluadas.

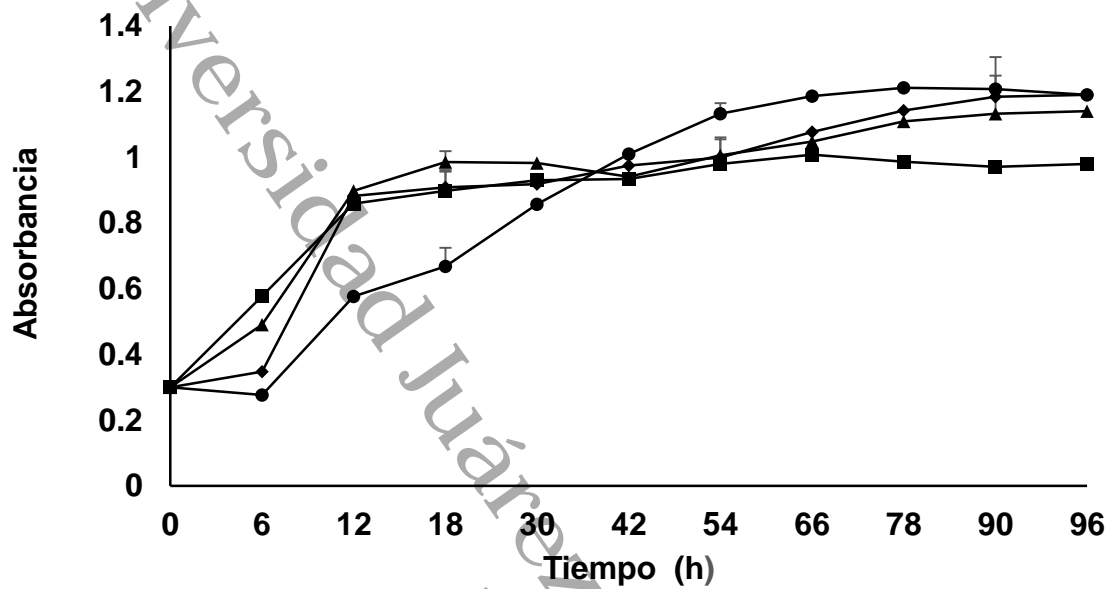


Figura 15. Crecimiento de las cepas bacterianas (C1 ■, C2 ◆, C3 ▲, C4●) en medio con nitrofoska. Las curvas se obtuvieron por turbidimetría a una OD600nm. Las barras de error representan la desviación estándar de tres mediciones.

Figura 15. Growth of the bacterial strains (C1 ■, C2 ◆, C3 ▲, C4●) in medium with nitrofoska. The curves were obtained by turbidimetry at OD600nm. The error bars represent the standard deviation of three measurements.

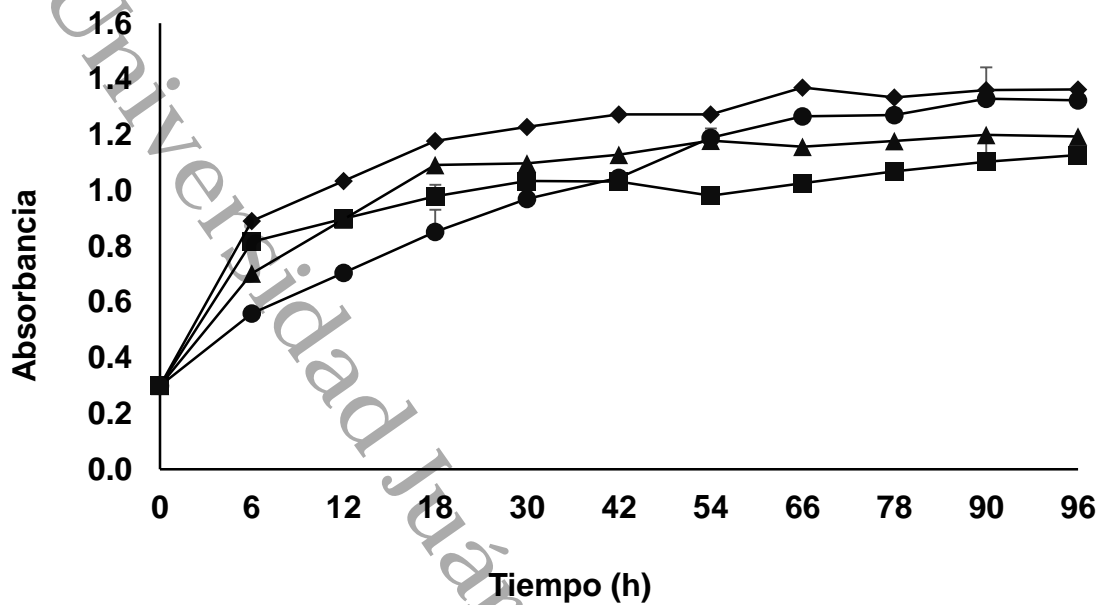


Figura 16. Crecimiento de las cepas bacterianas (C1■, C2 ◆, C3 ▲, C4 ●) en medio con triple 17. Las curvas se obtuvieron por turbidimetría a una OD600nm.

Figura 16. Growth of the bacterial strains in medium with triple 17. Where: C1■, C2 ◆, C3 ▲, C4 ● The curves were obtained by turbidimetry at OD600nm.

Los organismos no están aislados en el medio natural, sino que son afectados en su desarrollo y sobrevivencia por diferentes factores. La cepa C2 tuvo el cambio más significativo al pasar de nitrofoska (0.952) a triple 17 (1.275), mientras que C3 fue el segundo en cuanto al cambio de intensidad cuando cambió de medio de cultivo, de nitrofoska (0.952) a triple 17 (0.968), como se muestra en la fig. 17. Esto puede explicarse a que el medio mineral triple 17 contiene carbono, 7.90 % masa por cada 100 g, lo cual no acontece con el medio mineral nitrofoska. Debido a esto el crecimiento es mayor por la disponibilidad de una fuente de carbono mayor en triple 17. La única fuente de carbono en nitrofoska ha sido la sacarosa (2.366 g por cada 100 g), mientras que en triple 17 el aporte es por la sacarosa y el propio fertilizante (2.761 g por cada 100 g).

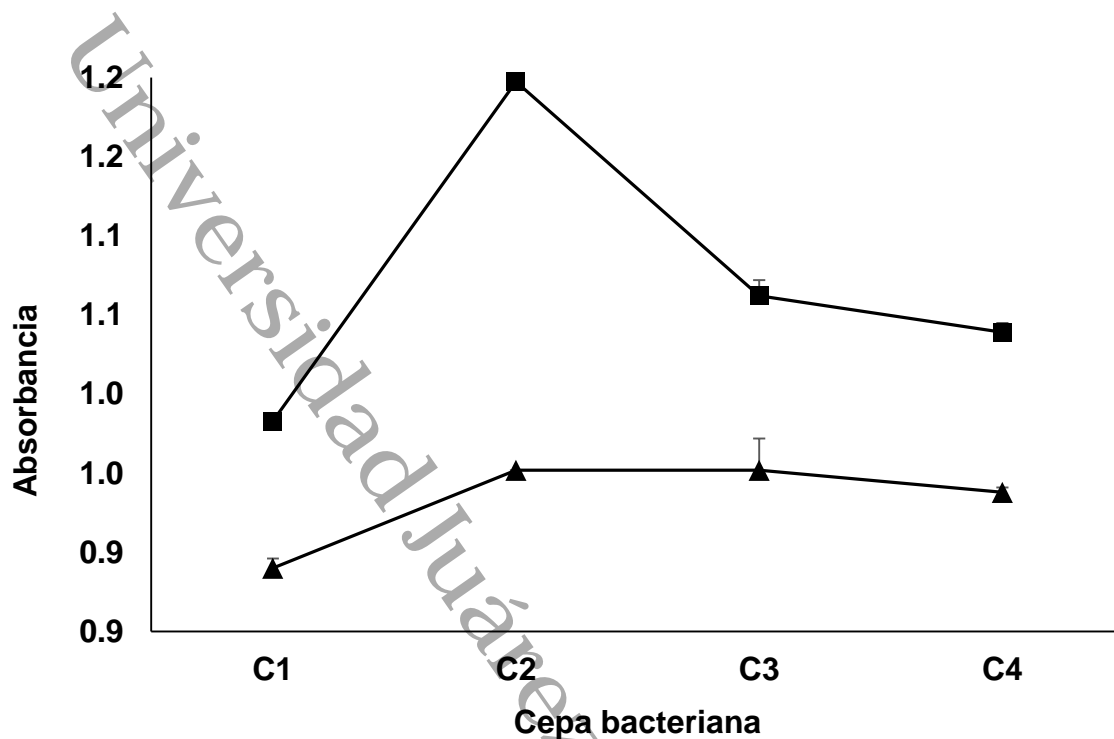


Figura 17. Interacción entre las cepas C1, C2, C3 y C4, y el medio mineral con base de nitrógeno nitrofoska ▲ y triple 17 ■ cada 6 horas, por 96 h. Se muestran los valores promedio de absorbancia de cada cepa.

Figura 17. Interaction between strains C1, C2, C3 and C4, and the Nitrofoska Nitrogen Base ▲ and Triple 17 ■ every 6 hours, for 96 h. The average absorbance values of each strain are shown.

3.2.4 SELECCIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES

3.2.4.1 Prueba de ensayo hemolítico

Como método, el ensayo hemolítico permite correlacionar la actividad hemolítica y la TS. De acuerdo a la estructura de la región hidrofóbica de los biosurfactantes, éstos por afinidad se unen a la membrana plasmática de las células sanguíneas provocando la lisis de los eritrocitos. Sin embargo, no es una prueba completamente determinante (Datta *et al.*, 2018). La tabla 2 muestra los resultados de hemólisis en medio con nitrofoska. Las pruebas permitieron hallar el mejor tiempo para la extracción del biosurfactante a partir del caldo libre de células. La hemólisis en triple 17 dio negativo en la mayoría de los casos. Esto se correlaciona con la fig. 4, donde se observa menor crecimiento bacteriano en ese medio.

Claro que el crecimiento bacteriano no garantiza la producción de biosurfactante, se demuestra con C2 y C4 en nitrofoska.

Tabla 2. Diámetro del halo en el ensayo hemolítico de las cepas C1, C2, C3 y C4 con caldo libre de células de nitrofoska (N) a diferentes tiempos de cultivo

Table 2. Halo diameter in the hemolytic assay of strains C1, C2, C3 and C4 with crude nitrophoska broth (N) at different culture times

Tiempo (h)	Diámetro (cm) del ensayo hemolítico			
	C1	C2	C3	C4
18	0	0	0.66 ± 0.04	0
30	2.95 ± 0.97	0	3.1 ± 0.9	0
42	2.78 ± 0.50	0	3.68 ± 0.75	0
54	3.2 ± 0.7	0	3.8 ± 0.9	0
66	1.74 ± 0.26	0	2.54 ± 0.55	0
78	2.2 ± 0.37	0	3.21 ± 1	0
90	4.32 ± 0.45	0	5.45 ± 0.20	0
96	3.18 ± 0.49	0	4.11 ± 0.8	0

Los resultados muestran que las cepas C2 y C4 no formaron halo, lo cual sugiere que esas cepas no son productoras de biosurfactantes. Estos resultados fueron corroborados con las pruebas de gota colapsada. Por este motivo estas cepas fueron descartadas. Las siguientes pruebas se continuaron sólo con las cepas C1 y C3, tal como lo muestra la tabla 3.

Tabla 3. Resultados de las pruebas para estimar el tiempo de mayor producción de biosurfactantes. C1 y C3 son las cepas que mejores resultados mostraron en medio nitrofoska. El medio con triple 17 no resultó propicio para producir biosurfactantes

Table 3. Results of the tests to estimate the time of greatest production of biosurfactants. C1 and C3 are the strains that showed the best results in nitrophoska medium. The medium with triple 17 was not conducive to producing biosurfactants

Tiempo (cm)	Ensayo hemolítico (cm)		Gota colapsada (cm)		Dispersión de aceite (cm)		IE 24 (%)	
	C1	C3	C1	C3	C1	C3	C1	C3
18	0.66 ± 0.05	0	0.42 ± 0.03	0.37 ± 0.04	0	0	0	0
30	3 ± 0.15	3.1 ± 0.05	0.38 ± 0.03	0.43 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.78 ± 0.02	0	0
42	2.78 ± 0.12	3.7 ± 0.2	0.42 ± 0.04	0.43 ± 0.01	0.3 ± 0.02	0.5 ± 0.13	0	0

54	2.3 ± 0.26	3.89 ± 0.01	0.43 ± 0.02	0.45 ± 0.02	0	0.61 ± 0.18	0	32 ± 0.57
66	1.7 ± 0.18	2.54 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.51 ± 0.04	0.5 ± 0.17	0.61 ± 0.11	27 ± 1	28 ± 1
78	3.21 ± 0.01	2.2 ± 0.05	0.44 ± 0.04	0.45 ± 0.04	0.4 ± 0.09	0.6 ± 0.12	25 ± 1	25 ± 1.69
90	4.32 ± 0.03	5.5 ± 0.25	0.46 ± 0.03	0.52 ± 0.11	0.7 ± 0.01	0.81 ± 0.03	31 ± 1.52	39 ± 1
96	3.2 ± 0.83	4.11 ± 0.05	0.44 ± 0.05	0.48 ± 0.04	0.41 ± 0.03	0.6 ± 0.07	30 ± 2	32 ± 1.66

Estas mediciones deben ser tomadas con cautela porque son mediciones que requieren realizar pruebas más específicas que muestren resultados concluyentes por lo que los resultados son parciales. El cambio en los diferentes ángulos indica la presencia de sustancias tensioactivas que tienen un efecto directo sobre la tensión interfacial, lo que permite la mezcla de dos sustancias inmiscibles (Hajibagheri *et al.*, 2018).

3.2.4.2 Prueba de la gota colapsada

Los resultados de la gota colapsada muestran variaciones del ángulo de contacto y cambio de mojabilidad. Se observa que el biosurfactante crudo presenta un ángulo de contacto externo entre 138° y 146°, lo que indica una condición de mojado al caldo. Se deduce que la superficie hidrofóbica presenta una afinidad hacia el fluido, por lo cual la gota de caldo libre de células se esparce fácilmente sobre la misma (Ding & Gao, 2021).

3.2.4.3 Dispersión de aceite

Por otro lado, se observó la dispersión de aceite fue positiva para la mayor parte de los tiempos de las cepas C1 y C3 con caldo libre de células de nitrofoska. El tiempo 18 h indican el inicio de la fase estacionaria, por lo que la ausencia de una zona de aclaramiento está dentro de los parámetros normales. A partir de las 30 h las zonas aclaradas crecen hasta las 90 h, que es el tiempo donde todos coinciden en los valores más altos.

3.2.4.4 Índice de emulsión (E24)

El biosurfactante producido por las cepas C1 y C3 en medio mineral de nitrofoska comenzó la emulsión a partir de las 54 h de cultivo usando n-hexadecano como fuente de carbono para llevar a cabo la emulsión, incrementando hasta alcanzar un porcentaje de emulsión de 39 % a las 90 h con la cepa C3. La emulsión de n-hexadecano fue estable durante las 24 h como lo indica la prueba

3.2.5 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS AISLADAS

Las pruebas empleadas para estimar el tiempo de mayor producción de biosurfactantes muestran que la cepa C1 dio negativo en los tiempos 18, 30, 42 y 54; lo mismo que en los tiempos 18 y 54 de la dispersión de aceite. En los resultados de las pruebas la cepa C3 fue superior casi en su totalidad. Además, el rendimiento fue tres veces mayor en C3 (un 68 %) que en C1. Por lo tanto, debido a esto se llegó a la conclusión de sólo continuar con la cepa C3, para lo cual se realizaron las pruebas correspondientes para su identificación

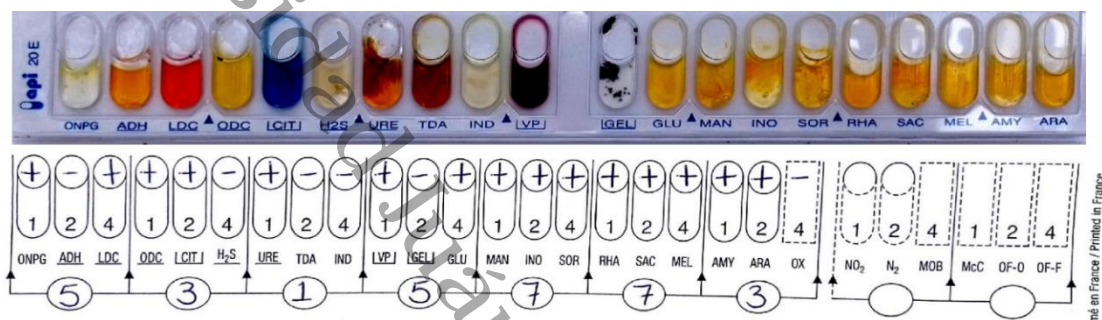


Figura 19. Pruebas bioquímicas API E20 para la identificación de la cepa bacteriana C3.

Los reactivos que dieron positivos fueron: galactopiranosida (+), L-lisina (+), L-omitina (+), citrato trisódico (+), urea (+), piruvato sódico (+), D- glucosa (+), D- manitol (+), inositol (+), D- sorbitol (+), L- ramnosa (+), D- sacarosa (+), D- melibiosa (+), amigdalina (+), L- arabinosa (+).

Figura 19. API E20 biochemical tests for the identification of the C3 bacterial strain. The reagents that were positive were: galactopyranoside (+), L-lysine (+), L-omitin (+), trisodium citrate (+), urea (+), sodium pyruvate (+), D-glucose (+), D- mannitol (+), inositol (+), D- sorbitol (+), L- rhamnose (+), D- sucrose (+), D- melibiose (+), amygdalin (+), L- arabinose (+)

Los datos obtenidos por el set de pruebas bioquímicas fueron procesados en el software VCGD para identificación del microorganismo (fig. 19), obteniendo con un 92.8 % de posibilidad de *Raoultella planticola*.

3.2.6 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL BIOSURFACTANTE

Las diferentes pruebas en la estimación de la máxima producción de biosurfactantes mostraron una tendencia hacia las 90 h de incubación en ambas cepas, siendo los valores más altos en este tiempo.

Por otro lado, luego de 96 h, al término de la curva de crecimiento, el pH del caldo crudo con base en nitrofoska fue de 4.5 de la cepa C1, mientras que para la cepa *Raoultella planticola* C3 fue de 4.9. El medio mineral con base en nitrógeno por sí mismo y sin inocular tuvo un

pH ligeramente ácido de 6.5. El rendimiento de los biosurfactantes fue de 1.02 y 3.22 g L⁻¹ para las cepas C1 y *R. planticola* C3, respectivamente.

3.2.7 IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS POLARES Y GRUPOS FUNCIONALES DE LÍPIDOS ASOCIADOS A ACCIÓN SURFACTANTE

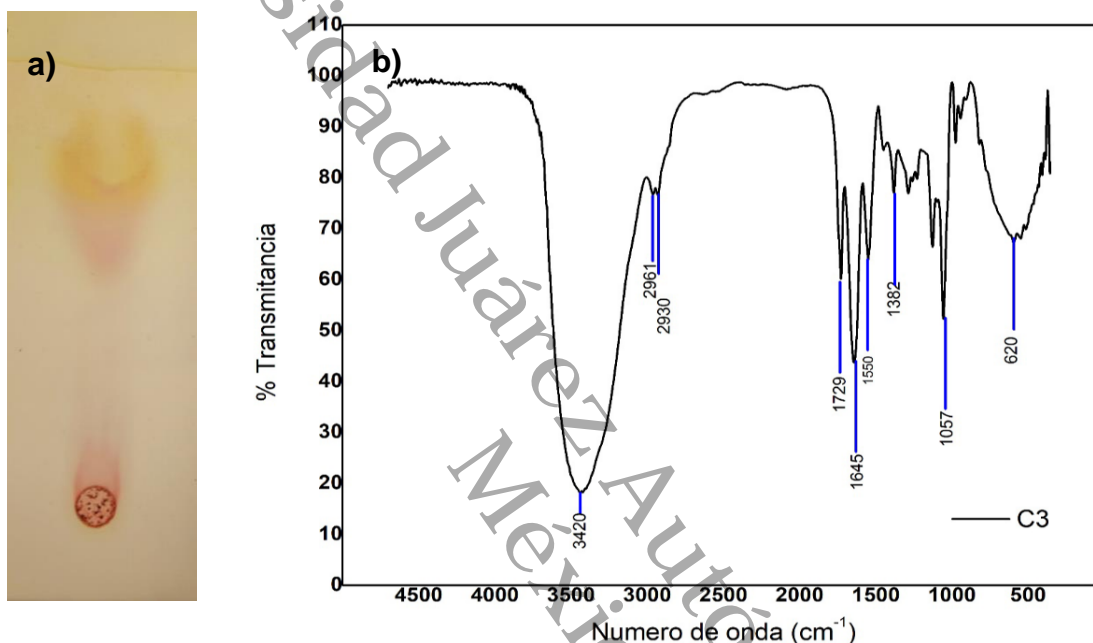


Figura 20. a) Análisis por cromatografía en capa fina del biosurfactante dando positivo para glucolípidos b) Imagen del espectro FT-IR de los grupos funcionales del biosurfactante producido por la cepa *Raultella planticola*

Figura 20. a) Analysis by thin layer chromatography of the biosurfactant giving positive for glycolipids b) Image of the FT-IR spectrum of the functional groups of the biosurfactant produced by the strain *Raultella planticola*

La espectroscopía FT-IR se utilizó para dilucidar los componentes moleculares del biosurfactante. En la fig. 20 se muestran los resultados del análisis que indicó la presencia de grupos funcionales glucosídicos, los cuales están relacionados con los biosurfactantes glucolípidos. Del mismo modo, el análisis cromatográfico reveló la presencia de lípidos polares, reforzando los resultados obtenidos por FT-IR.

3.2.8 TENSIÓN SUPERFICIAL (TS) Y CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA (CMC)

La medición de la TS es un parámetro importante para evaluar la actividad del biosurfactante. Para medirla se usó el caldo crudo libre de células. A partir de una concentración de 0.2 % (p/p) el valor más bajo fue 40 mN/m después de 96 h de incubación en medio mineral con base de nitrógeno (nitrofoska azul), bajo condiciones aerobias, tal como se muestra en la fig. 21. Los mg agregados para alcanzar la CMC fueron 152.5 mg/L. La TS del biosurfactante producido por la cepa bacteriana *Raoultella planticola* fue de 40 mL/L.

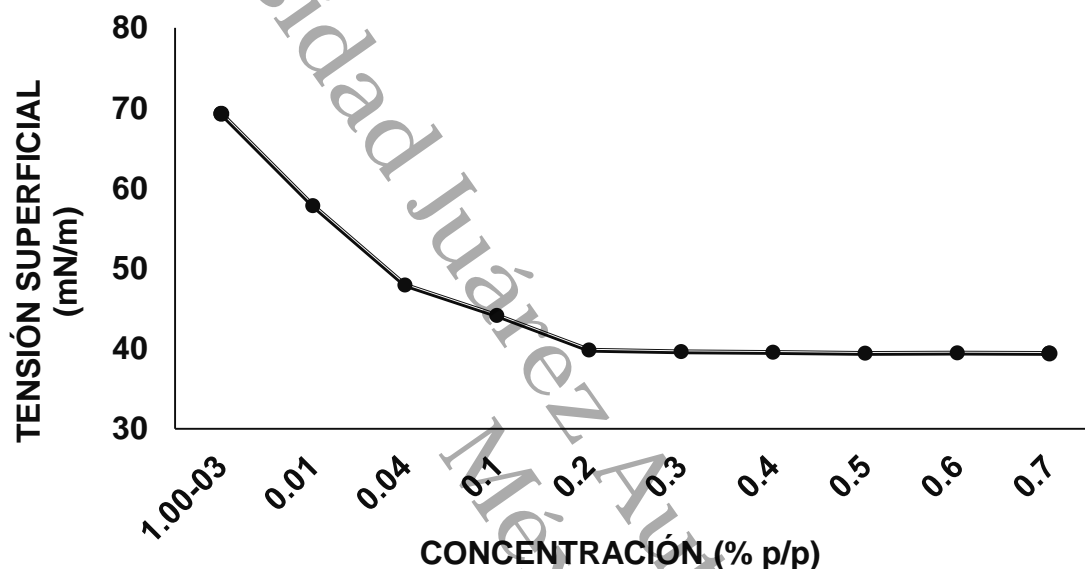


Figura 21. Medición de la disminución de la TS haciendo uso de un biosurfactante glucolípido de *Raoultella planticola*.

Figura 21. Measurement of the decrease in surface tension using a glycolipid biosurfactant from *Raoultella planticola*.

2.4 DISCUSIÓN

4.2.1 SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES

Para seleccionar las cepas productoras de biosurfactantes se llevó a cabo una prueba de ensayo hemolítico. Los resultados de esta prueba no son del todo concluyentes, porque existen otras moléculas en el caldo libre de células que pueden provocar lisis de los eritrocitos, y también la tasa de difusión de algunos biosurfactantes puede ser muy baja, por lo que su actividad hemolítica puede no ser evidente, sin embargo, el resultado de esta prueba es un indicativo de la probable presencia de los biosurfactantes. Claramente, si no existe lisis en las placas de agar sangre, la ausencia de sustancias tensioactivas es concluyente por sí misma (Marques *et al.*, 2015; Joy *et al.*, 2017; Datta *et al.*, 2018). Sin embargo, este tipo de ensayo puede excluir cepas microbianas que son buenas productoras de biosurfactantes, y del mismo modo seleccionar cepas que dieron un resultado positivo a la actividad hemolítica

que al final no producen biosurfactantes, por lo que pruebas adicionales se hacen necesarias para corroborar la presencia de sustancias tensioactivas (Ogunshe & Falode, 2021).

4.2.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas bacterianas fueron cultivadas inicialmente en caldo nutritivo con la finalidad de potenciar su crecimiento e inocularlas en medio mineral nitrofoska a una densidad óptica controlada. Esto explica la importancia de llegar a $OD_{600} = 0.3$ en el caldo nutritivo, ya que esto permite que la fase lag sea más corta y se alcance la fase estacionaria en menor tiempo. Una fase lag corta ahorra tiempo y gasto de reactivos, debido a que la producción de los biosurfactantes se produce en la fase estacionaria (Maier *et al.*, 2009).

De acuerdo con lo observado en las Figuras 15 y 16, el fertilizante triple 17 tuvo mayores valores de absorbancia, lo cual es consecuencia del comportamiento experimental en cada medio. Esto concuerda con Hernández *et al.*, (2011) quienes emplearon además sales de urea y sales puras. Sin embargo, el medio con triple 17 es deficiente en sales minerales y elementos que son esenciales en el metabolismo microbiano. Además de N, P y K, el medio con nitrofoska contiene azufre (forma parte de los aminoácidos), magnesio (cofactor en la transferencia de grupos fosfato), hierro (forma parte de los citocromos), boro (ayuda en el desarrollo bacteriano) y zinc (estabiliza compuestos enzimáticos) (Black, 2008). La presencia de microelementos presentes en el fertilizante nitrofoska puede darle una ventaja competitiva que no tiene el triple 17.

Claramente el crecimiento se ve favorecido en triple 17 (fig.17), pero la producción de biosurfactantes no depende tanto de la cantidad de biomasa sino del metabolismo de cada cepa microbiana. No todos los microorganismos pueden producirlos y los sintetizan dependiendo de las características de la fuente de carbono y nitrógeno de la que disponen. El carbono en un yacimiento lo constituyen los hidrocarburos del petróleo, y como se trata de una fuente que no está disponible para los microorganismos, los biosurfactantes se liberan al medio con la finalidad de hacerlos biodisponibles al cambiar la TS e interfacial entre el agua o la roca, y el petróleo (Sajna *et al.*, 2015; Tatar., 2018; Barakat *et al.*, 2017; Jahan *et al.*, 2020).

La fuente de carbono es de especial importancia en el crecimiento de las cepas microbianas. En medio mineral nitrofoska azul el contenido fue de 2.3 g/100 de sacarosa, lo cual influye directamente en la proporción carbono: nitrógeno (C:N), que alcanzó un valor de 29.61, mientras que el Triple 17 fue más bajo: 21.07. Esta variación en este parámetro tiene su influencia en la eficiencia de la cepa que debe metabolizar petróleo. La C:N es de importancia en la producción de biosurfactantes, ya que estas moléculas tienen la capacidad de modificar la mojabilidad de la roca. Heryani & Putra, (2017) mencionan a la sacarosa como un sustrato óptimo en la producción de biosurfactantes, ya que permite disminuir los costos de

producción y ha sido ampliamente usada en distintas investigaciones (Al-Ajlani *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2020). Mientras que la fuente de nitrógeno más comúnmente usada ha sido NH_4NO_3 . Los mejores resultados se han hallado con una C:N de 3-9, pero también se han obtenido buenos resultados con C:N = 11 (Fonseca *et al.*, 2007; Abasi *et al.*, 2013 (Heryani & Putra., 2017). Sin embargo, Peekate & Abu, (2017) trabajaron con una C:N = 20, con resultados óptimos en el rendimiento de biosurfactantes probaron tres proporciones C:N (20, 40 y 60) para optimizar la producción de biosurfactante a partir de *Pseudomonas fluorescens*, y encontraron que la proporción C:N de 20 fue la que generó una mayor producción, aunque indican que las otras proporciones también han funcionado en la producción de biosurfactantes. Si bien la C:N empleada con nitrofoska fue mayor al óptimo reportado en la literatura, aún está en el intervalo en el que se logra la producción de biosurfactante. La relación de estos elementos por sí misma no implica la producción de biosurfactantes, pero sí es un factor que puede optimizar su producción.

4.2.4 SELECCIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES

Los ensayos de gota colapsada, dispersión de aceite e índice de emulsión son más específicos en la determinación de la presencia de biosurfactantes. Estos se basan en su capacidad de reducir la TS, lo que es necesario en la formación de emulsiones cinéticamente estables. Al reemplazar las moléculas de agua o de aceite hay una reducción de las fuerzas intermoleculares entre las moléculas solventes. Es decir, los surfactantes reducen la energía libre superficial por unidad de área que se necesita para crear una nueva superficie (Jahan *et al.*, 2020).

4.2.4.1 Ensayo hemolítico

Márques *et al.*, (2015) reportaron un diámetro de halo de 74 mm. Los mejores resultados con la prueba de hemólisis se obtuvieron con las cepas C1 y C3 que generaron un halo de 4.32 cm y 5.45 cm de diámetro, respectivamente, después de 90 h de cultivo en nitrofoska. Sin embargo, el ensayo hemolítico es un método que permite correlacionar la actividad hemolítica y la TS. Según la estructura de la región hidrofóbica de los biosurfactantes, éstos por afinidad se unen a la membrana plasmática de las células sanguíneas provocando la lisis de los eritrocitos. No obstante, no es una prueba concluyente (Datta *et al.*, 2018).

4.2.4.2 Gota colapsada

El diámetro de la zona aclarada en la prueba de dispersión de aceite o de la gota colapsada depende de la actividad del biosurfactante. Controlar la proporción C: N hasta un nivel óptimo de producción puede acelerar la síntesis del biosurfactante y mejorar su actividad. La técnica de la gota colapsada se basa en la tensión interfacial entre la gota del sobrenadante y la superficie hidrofóbica del parafilm. Es un método confiable que determina la capacidad que tienen los bioproductos microbianos para alterar las propiedades de superficie. La gota puede colapsar y perder su forma, aumentando por lo tanto su diámetro, o puede presentar un achatamiento de su forma. En cualquiera de los dos casos dependerá de la capacidad del biosurfactante como agente de superficie activo (Ray *et al.*, 2021). De esta manera la presencia de moléculas surfactantes en el caldo crudo libre de células ocasionando el achatamiento de la gota en una superficie hidrofóbica tal como se observa en la tabla tal

El colapso de la gota sobre una superficie está relacionado con el cambio de mojabilidad de una superficie hidrofóbica. La mojabilidad constituye la característica de superficie más importante, y su modificación tiene influencia en la separación de las fases agua/aceite, lo que impacta directamente en los procesos de recuperación mejorada de petróleo (Ding & Gao, 2021).

4.2.4.3 Dispersión de aceite

La zona de aclaramiento tuvo diámetros mayores a 0.5 cm, como lo describen Ray *et al.*, (2021) y Montoya *et al.*, (2021). La zona aclarada con mayor diámetro fue hacia los 96 h. El tamaño de la zona de aclaramiento está en función de la actividad y concentración del biosurfactantes, así como de la mezcla de hidrocarburos. En este ensayo se usó un petróleo pesado, 15.18° API y una densidad de 0.9638 kg/ cm. Kaur *et al.*, (2022) hallaron un diámetro promedio de la zona de aclaramiento de 6.8 cm en *Klebsiella pneumoniae ssp. ozaenae BK34*, por encima de los 0.81 ± 0.03 cm de *R. planticola C3* a las 90 h. Sin embargo, ellos emplearon aceite de oliva y no petróleo, lo cual puede explicar las diferencias en actividad tensioactiva del biosurfactante. Esto concuerda con los reportados en la literatura (Barakat *et al.*, 2017; Patowary *et al.*, 2017; Varjani & Upasani., 2017; Astuti *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2020)

4.2.4.4 Índice de emulsificación

Es sabido que los mejores emulsionantes son los biosurfactantes de alto peso molecular, entre los que se encuentran los biosurfactantes poliméricos y los biosurfactantes particulados (Mondal *et al.*, 2017), además el índice de emulsión depende del tipo de aceite usado para el análisis (Diez *et al.*, 2022).

El E24 puede ayudar a dirigir el uso que se puede dar a un biosurfactante específico. La presencia de biosurfactantes en el caldo bacteriano libre de células permite la formación de microemulsiones entre moléculas de agua y de aceite. Entre más estable sea la emulsión, más eficiente es el biosurfactante durante la recuperación del petróleo. La optimización de la fuente de carbono y nitrógeno puede mejorar la producción, así como el nivel de emulsificación, sobre todo cuando se busca aplicarlo en depósitos de petróleo pesado (Mondal *et al.*, 2017; Kashif *et al.*, 2022). Kaur *et al.*, (2022) reporta un índice de emulsificación de 20% con *Klebsiella pneumoniae ssp. Ozaenae BK34*, quien produjo glicolipopéptidos, mientras que *R. planticola* C3 mostró hasta un 39 % de emulsificación luego de 90 h de incubación, lo cual destaca su actividad emulsificante.

4.2.5 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS AISLADAS

En general las cepas del género *Raoultella planticola* producen lipopéptidos y glucolípidos (Aydin & Içgen, 2020; Su *et al.*, 2022) pero la generación de productos metabólicos de los microorganismos depende de los nutrientes de los que dispone, en específico de la proporción (C:N) así como de los factores físicos y químicos presentes. Esto permite clasificarlos, a menudo según la especie que los sintetizan. Por ejemplo, se ha reportado que glucolípidos como los ramnolípidos y soforolípidos son sintetizados a partir de *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida lipolitica*, *Turolopsis bombicola*, entre otros; los lipopéptidos como la surfactina, iturina y polymixina, es común que sean sintetizadas por *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* o *B. polymixa*. Ambas clases de biosurfactantes son considerados de bajo peso molecular. En tanto que los de alto peso molecular, o biosurfactantes poliméricos, como el emulsan o alasan son producidos por otras cepas como *Acinetobacter calcoaceticus*. No obstante, los microorganismos suelen producir más de un tipo de biosurfactante en el mismo medio, sobre todo si las condiciones ambientales y de nutrientes, así como de la composición mineralógica del yacimiento, cambian en el tiempo (Peng *et al.*, 2018).

De acuerdo a los resultados obtenidos a través de la caracterización bioquímica por galerías API E20, la especie fue identificada como *Raoultella planticola*, la cual ha sido reconocida como una cepa bacteriana Gram-negativa, y que en general puede hallarse en el medio ambiente de forma libre. El género *Raoultella* es un grupo de bacterias que se clasificaba anteriormente como *Klebsiella*. En 1986 las especies *K. planticola* y *K. trevisani* fueron clasificadas en una sola especie: *K. planticola* debido a la homología de su ácido desoxirribonucleico, ADN-ADN. En 2001 el género *Klebsiella* se vio sujeta a una reclasificación a *Raoultella*, basados en el análisis del 16S rARN y en la secuenciación del gen *rpoB*, lo que dio como resultado el surgimiento de la especie *Raoultella planticola* (Castillo-Macías *et al.*, 2018).

4.2.6 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL BIOSURFACTANTE

El rendimiento en g/L ha sido reportado ampliamente en la literatura, pero las cantidades dependen del tipo de microorganismo, metabolismo, condiciones de cultivo y método de purificación. Al respecto, Ibrahim, (2018) reportó 4.1 y 4.9 g/L luego de 90 h de cultivo en una cepa marina de *Ochrobactrum anthropi*; Das & Kumar, (2019) obtuvieron un rendimiento de 0.9 g/L de una cepa de *Bacillus safensis*, en tanto que Durva *et al.*, (2020) obtuvieron 4.6 g/L en una cepa de *Bacillus cereus*. La biomasa de la cepa también es importante en el rendimiento de la producción de biosurfactante. La proporción C:N más adecuada para cada tipo de microorganismo también es fundamental para potenciar la producción y el rendimiento.

El rendimiento obtenido en esta investigación tuvo un costo de 52.00 USD para el total de gramos de biosurfactante producido por las cepas C1 (1.02 g/L) y C3 (3.22 g/L). A escala laboratorio, el reactivo con mayor costo es la sacarosa grado ACS (33 USD) por cada 500 g, y aunque ésta sólo se usa en una proporción de 0.5 g/L, la extensión de su vida útil compensa el precio a escala laboratorio, sin embargo, su uso a nivel industrial no es viable económicamente. Por este motivo es importante el uso de fuentes de carbono de bajo costo que puedan suplir a los reactivos de laboratorio. Das & Kumar, (2019) mencionan el uso del bagazo, y del mismo modo Yañez & Wong, (2013) hicieron una amplia revisión de los materiales agroindustriales de desecho que pueden ser reutilizados en México para la producción de biosurfactantes. Aunque los costos de producción hayan sido objeto de debate para su aplicación industrial, particularmente en la industria del petróleo, por su bajo rendimiento y altos costos de producción, la realidad indica que gracias al uso de sustratos más baratos y a la adopción de diversas estrategias de intensificación de procesos, esas especulaciones para su uso a nivel industrial en la recuperación mejorada de petróleo en pozo maduros o cerrados han quedado eliminadas (Dhanarajan *et al.*, 2017).

La purificación del biosurfactante es un paso necesario para su caracterización, pero su uso a nivel industrial no es viable en tal estado de pureza, por los costos de purificación involucrados, siendo ésta su principal desventaja, por tanto, el uso del caldo libre de células reduce los costos de producción, lo cual está en función de la materia prima empleada y la capacidad de la cepa microbiana como productora de biosurfactantes. Muy a pesar de las ventajas que tienen en comparación a los surfactantes sintéticos siguen siendo poco competitivos en costos de producción (Soares Da Silva *et al.*, 2017). Safdel *et al.*, (2017) mencionan que durante la fase de crecimiento microbiano se producen sustancias ácidas en el caldo crudo, como el ácido propiónico y ácido butírico, aunque no siempre se producen ácidos en el caldo crudo, ya que eso depende de la composición del medio y del microorganismo (Hernández *et al.*, 2019)

4.2.7 IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS POLARES Y GRUPOS FUNCIONALES

En el espectro en modo transmitancia se observa una banda ancha de absorción alrededor de 3420 cm^{-1} que corresponde a la vibración de estiramiento del grupo hidroxilo (O-H) en la estructura química del biosurfactante (Pornsunthorntawee *et al.*, 2008; Joy *et al.*, 2017; Ashitha, Radhakrishnan & Jyothis, 2020). Las bandas de absorción alrededor de 2961 y 2930 $1/\text{cm}$ corresponden a las vibraciones de estiramiento de $-\text{CH}_2-$ y CH_3- (Ashitha., Radhakrishnan & Jyothis., 2020; Pornsunthorntawee *et al.*, 2008). La presencia de la banda más importante a 1729 cm^{-1} corresponde al estiramiento $\text{C}=\text{O}$ en grupos éster de lípidos y ácidos grasos (Mani *et al.*, 2016; Singh & Tiwary, 2016; Ashitha *et al.*, 2020). La banda observada a 1645 $1/\text{cm}$ mostró la presencia de grupo carbonilo $\text{C}=\text{C}$ (Shalini *et al.*, 2017; Mani *et al.*, 2016; Bharali *et al.*, 2011; Arutchelvi & Doble., 2010). La banda en 1057 $1/\text{cm}$ (enlace glucosídico $\text{C}-\text{O}-\text{C}$) y las observadas alrededor de 600 $1/\text{cm}$ se asociaron con las vibraciones de estiramiento del enlace glucosídico que confirman la naturaleza glicolípida del biosurfactante (Ashitha *et al.*, 2020; Arutchelvi & Doble, 2010; Singh & Tiwary, 2016; Shalini *et al.*, 2017). Las bandas características observadas en 3420, 1729, 1645 y 1057 $1/\text{cm}$ confirmaron la presencia de un biosurfactante tipo glicolípido según los informes anteriores (Bharali, 2011).

Raoultella planticola es una bacteria que tiene el potencial de llevar a cabo procesos de biorremediación. También se ha identificado como productora de biosurfactantes (Toribio-Jiménez *et al.*, 2018), y en otras investigaciones como productora de ramnolípidos (Aydin & Içgen, 2020). En cuanto a los resultados de la cromatografía en capa fina, el R_f tuvo un valor de 0.77. Esto queda corroborado con los resultados de Aydin & Içgen, (2020) cuyo valor de R_f fue similar a este estudio, en un intervalo de 0.66 a 0.78, lo cual corresponde a un biosurfactante ramnolípido.

4.2.8 TENSIÓN SUPERFICIAL (TS) Y CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA (CMC)

Jahan *et al.* (2020) evidenciaron que cuando los biosurfactantes son producidos en un medio acuoso, la TS disminuye conforme aumenta la concentración del biosurfactante hasta que alcanza una CMC. En esta investigación, la TS alcanzó 40 mN/m , lo cual es bajo, si se compara con otras cepas como *Streptomyces sp DPUA1559*, que ha podido disminuir la TS del agua HPLC a 27.1 mN/m (Santos *et al.*, 2017), o *Bacillus sp.*, que la ha disminuido hasta 27 mN/m (Heriany & Putra, 2017) o incluso *Bacillus amyloliquefaciens SAS-1*, que puede reducirla hasta 22.9 mN/m (Al-Wahaibi *et al.*, 2014). Sin embargo, el valor de 40 mN/m se encuentra dentro de un rango que ha sido reportado como eficiente (Díez *et al.*, 2022).

La funcionalidad de un biosurfactante depende de su estructura molecular y composición. Es por eso que, las condiciones del cultivo tienen una influencia determinante en la calidad y eficiencia del biosurfactante. Por otra parte, Jahan *et al.*, (2020) y Jain *et al.*, (2013a) probaron

la influencia de diferentes fuentes de carbono como glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa, almidón y xilosa, lo cual promovió la producción de biosurfactantes, mientras que, cuando se utilizó la celulosa y glicerol, la producción de estas moléculas anfifílicas fue nula en bacterias del género *Klebsiella* sp. Cabe mencionar que, utilizando sacarosa como fuente de carbono, el rendimiento en la producción de biosurfactante por *Klebsiella* sp fue de 5.10 g/L, mientras que la reducción de TS fue hasta 44.06 mN/m, en comparación con *R. planticola*, quien tuvo un rendimiento de 3.22 g/L y reducción de la TS de hasta 40 mN/m. Sin embargo, Jain *et al.* (2013b) llevaron a cabo otra investigación donde esta vez emplearon fuentes de carbono no convencionales en *Klebsiella* sp RJ-03; el mejor resultado fue con harina de maíz (rendimiento de 15.40 g/L y reducción de TS hasta 44.03 mN/m), lo cual corrobora el rango de reducción de la TS en esta investigación con *R. planticola*. Incluso el biosurfactante sintetizado por *R. planticola* redujo la TS un 9.09 % más que el surfactante proveniente de la *Klebsiella* sp RJ-03. La diferencia en el rendimiento y reducción de la TS puede deberse a lo investigado por Jain *et al.* (2013a) quienes emplearon extracto de levadura, y de acuerdo con Montoya *et al.* (2021), el extracto de levadura contiene una gran variedad de aminoácidos libres y vitaminas, lo que influye de manera notable en la estructura y función del biosurfactante sintetizado. Además, Martínez-Trujillo *et al.* (2015) reportaron al extracto de levadura como un sustrato que mejora la producción de biosurfactantes.

Por otro lado, la CMC alcanzada por el biosurfactante proveniente de *R. planticola* es similar a lo reportado por otras cepas. Investigadores como Ahmad *et al.* (2021); registraron un glucolípido proveniente de *Pseudomonas* sp, que obtuvo una CMC de 200 mg/L y una TS en un rango de 36.3 a 29.0 mN/m. Mientras tanto, en el caso de la *Klebsiella* sp KOD36, el surfactante (glucolípido) evidenció una CMC de 124 mg/L y una TS de 38 mN/m. Y aunque la *Pseudomonas* sp es una cepa distinta a *Raoultella* sp y *Klebsiella* sp, las tres especies mencionadas produjeron biosurfactantes glucolípidos, los cuales son las moléculas que llevan a cabo el proceso de disminución de la TS.

2.5 CONCLUSIÓN

La selección y purificación de cepas productoras de biosurfactantes es importante para su aplicación a nivel industrial. El uso del caldo libre de células, así como de fuentes de carbono y nitrógeno de bajo costo hacen que los biosurfactantes sean económicamente competitivos con los surfactantes sintéticos. La cepa C3 fue identificada como *Raoultella planticola* y se comprobó su capacidad de sintetizar biosurfactantes glucolípidos, aunque también ha sido reportada como productora de lipopéptidos y glucolipopéptidos. Después de 90 h de cultivo con nitrofoska, se obtuvo un resultado positivo en el ensayo hemolítico, dispersión de aceite e índice de emulsificación. El rendimiento fue de *R. planticola* C3 fue de 3.22 g/L, lo cual es influenciado por la fuente de carbono y nitrógeno y de las condiciones de cultivo.

2.6 REFERENCIAS

Abasi M. R., Kader A. J. A., Khalil M. S., Hamid A. A. & Mohd M. H. 2013. Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 by Using Treated Palm Oil Mill Effluent (POME) as Fermentation Media. International Conference on Food and Agricultural Sciences IPCBEE vol.55. 87-93
URL: <http://www.ipcbee.com/vol55/017-ICFAS>

Ahmad Z. X., Imran H. Z., S. R. Zulekha, Ahmad G. I. & Coulon F. 2021. Production, functional stability, and effect of rhamnolipid biosurfactant from *Klebsiella* sp. on phenanthrene degradation in various medium systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 207. 111514. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111514>

Ajona M. & Vasanthi P. 2021. Bioremediation of petroleum contaminated soils – A review. *Materials Today: Proceedings*. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.01.949>

Al-Ajlani M. M., Sheikh M. A., Ahmad Z. & Hasnain S. 2007. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. *Microb Cell Fact* 6(17):1-8. DOI: 10.1186/1475-2859-6-17

Alkan H., Mukherjee S. & Kögler F. 2020. Reservoir engineering of in-situ MEOR; impact of microbial community. *Journal of Petroleum Science and Engineering* (195) 107928. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2020.107928>

Aquihuatl-Ramos M. A. & Pérez-Chabela M. L. 2004. Manual de prácticas de laboratorio de microbiología general. Universidad Autónoma Metropolitana. Departamento de biotecnología. México. P. 116

Arutchelvi J. & Doble M. 2010. Characterization of glycolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* CPCL isolated from petroleum-contaminated soil. *Letters in Applied Microbiology*. doi:10.1111/j.1472-765x.2010.02858.x

Ashitha A., Radhakrishnan E. K., & Jyothis M. 2020. Characterization of biosurfactant produced by the endophyte *Burkholderia* sp. WYAT7 and evaluation of its antibacterial and antibiofilm potentials. *Journal of Biotechnology*. 313: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.03.005>

Astuti D. I., Purwasena I. A., Putri R. E., Amaniyah M. & Sugai Y. 2019. Screening and characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. G3 and its

applicability for enhanced oil recovery. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology* doi.org/10.1007/s13202-019-0619-8

Aydin, D. C & B. Içgen. 2020. Monorhamnolipids Predominance among Kerosene Degraders. *J. Environ. Eng.*, 2020, 146(6): 04020036. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001710](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001710)

Bachmann R. T., Clemens A. J. & Edyvean R. G.J. 2014. Biotechnology in the petroleum industry: An overview *International Biodeterioration & Biodegradation*. (86) 225-237. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.09.011>

Barakat K.M., Hassan S. W.M., & Darwesh O. M. 2017. Biosurfactant production by haloalkaliphilic *Bacillus* strains isolated from Red Sea, Egypt. Vol. 43 205-211 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejar.2017.09.001>

Bezza F. A. & Chirwa E. M. N. 2015. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. *Biochemical Engineering Journal* (101). 168–178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.007>

Bharali P., Das S., Konwar B. K., & Thakur A. J. 2011. Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(5), 682–690. doi:10.1016/j.ibiod.2011.04.001

Black, J. G. 2008. *Microbiology, principles and explorations*. John Wiley & Sons, INC. USA. 7^a edition. 970 p. ISBN 978-0-470-10748-5

Castillo-Macías A., Flores-Aréchiga A., Llaca-Díaz J., Pérez-Chávez F. & CasillasVega N. 2018. Microbiología del género *Raoultella*, características clínicas y dificultades para su diagnóstico. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 56(4):486-90. ISSN: 0443-5117

Ciurko D. Z. Czynnikowska A. K., Łaba W. & Janek T. 2022. Sustainable Production of Biosurfactant from Agro-Industrial Oil Wastes by *Bacillus subtilis* and Its Potential Applications as Antioxidant and ACE Inhibitor. *Int. J. Mol. Sci.* 23. 10824. <https://doi.org/10.3390/ijms231810824>

Cooper D. G. & Goldenberg B. G. 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), 224–229. doi: 10.1128/aem.53.2.224-229.1987

Das A. J. & Kumar R. 2019. Production of biosurfactant from agro-industrial waste by *Bacillus safensis* J2 and exploring its oil recovery efficiency and role in restoration of diesel

contaminated soil. *Environmental Technology & Innovation* 16: 100450. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100450>

Datta P., Tiwari P. & Pandey L. M. 2018. Isolation and characterization of biosurfactant producing and oil degrading *Bacillus subtilis* MG495086 from formation water of Assam oil reservoir and its suitability for enhanced oil recovery. *Bioresource Technology*. 270: 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.047>

Dhanarajan G., Rangarajan V., Bandi C., Dixit A., Das S., Ale K. & Sen R. 2017. Biosurfactant-biopolymer driven microbial enhanced oil recovery (MEOR) and its optimization by an ANN-GA hybrid technique. *Journal of biotechnology*. 46-56. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.05.007

Diez M. A., Llafquen C., Fincheira P., Lamilla C., Briceño G. & Schalchli H. 2022. Biosurfactant Production by *Bacillus amyloliquefaciens* C11 and *Streptomyces lavendulae* C27 Isolated from a Biopurification System for Environmental Applications. *Microorganisms*. 10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101892>

Ding F. & Gao M. 2021. Pore wettability for enhanced oil recovery, contaminant adsorption and oil/water separation: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* 289:102377. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102377>

Durval I. J. B., Mendonça A. H. R., Rocha I. V., Luna J. M., Rufino R. D., Converti A. & Sarubbo L. A. 2020. Production, characterization, evaluation and toxicity assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 biosurfactant for marine oil spills bioremediation. *Marine Pollution Bulletin* 157: 111357. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111357>

Fonseca R. R., Silva A. J. R., De França F. P., Cardoso V. L. and Sérvulo E. F. C. 2007. Optimizing Carbon/Nitrogen Ratio for Biosurfactant Production by a *Bacillus subtilis* Strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 136–140 DOI: 10.1007/s12010-007-9073-z

Fooladi T., Moazami N., Abdesahian P., Kadier A., Ghojavand H., Wan Yusoff W. M. & Hamid A. A. 2016. Characterization, production and optimization of lipopeptide biosurfactant by new strain *Bacillus pumilus* 2IR isolated from an Iranian oil field. *Journal of Petroleum Science and Engineering* (145) 510–519. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.petrol.2016.06.015>

Gao H., Lai H., Zhang J. & Xue Q. 2017. Effects of bacterial cell density and alternating microbial- and enzymolysis-enhanced oil recovery on oil displacement efficiency. *Chemical Engineering Journal* (327) 28–38. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.083>

González G. S., Ruiz M. R. V., Hernández B E. M. 2003. Guía de microscopía electrónica. Universidad Nacional Autónoma de México. México

Hajibagheri F., Hashemi A., Lashkarbolooki M. & Ayatollahi S. 2018. Investigating the Synergic Effects of Chemical Surfactant (SDBS) and Biosurfactant Produced by Bacterium (*Enterobacter cloacae*) on IFT reduction and wettability alteration during MEOR process. *Journal of Molecular Liquids*. S0167-7322(17)35826-9. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.02.020>

Hernández R. M. A., Ojeda M U. M. & Martínez M A. 2019. Recuperación Mejorada de Petróleo Asistida por Microorganismos con Capacidad de Sintetizar Biosurfactantes. *Journal of Basic Sciences*, Vol. 5 (15), pp. 58-81. <http://revistas.ujat.mx/index.php/jobs> ISSN: 2448-4997

Hernández-Rivera M. A., Ojeda-Morales M. E., Martínez-Vázquez J. G., Villegas-Cornelio V. M. & Córdova-Bautista Y. 2011. Optimal parameters for the development of the hydrocarbonoclastic microorganism *Proteus* sp. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 11: 29-43 <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162011000100003>

Heryani H. & Putra M. D. 2017. Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*. (27):49–54. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.03.005>

Hoang S. A., Sarkar B., Seshadri B., Lamb D., Wijesekara H., Vithanage M., Liyanage C., Kolivabandara P. A., Rinklebe J., Lam S. S., Vinu A., Wang H., Kirkham M. B. & Bolan N. S. 2021. Mitigation of petroleum-hydrocarbon-contaminated hazardous soils using organic amendments: A review. *Journal of Hazardous Materials*. (416) 125702. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2022.e01357>.

Ibrahim H. M. M. 2018. Characterization of biosurfactants produced by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 from used engine oil-contaminated soil. *Egyptian Journal of Petroleum* (27) 21–29. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2016.12.005>

Ja'afaru M. I., Abbas T., Ajunwa O. M. & Olaifa K. 2022. Characterization and statistical optimization of biosurfactant production using *Bacillus subtilis* isolated from automotive oil-contaminated soil in Yola, Nigeria. *Scientific African* 17. e01357.

Jahan R., Bodratti A. M., Tsianou M. & Alexandridis P. 2020. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances*

in Colloid and Interface Science. 275: 102061. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>

Janaghi P., Amani H., Naseri A. & Kariminezhad H. 2022. Accurate prediction of enhanced oil recovery from carbonate reservoir through smart injection of nanoparticle and biosurfactant. Journal of Petroleum Science and Engineering. (216) 110772. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2022.110772>

Joy S., Rahman P. K. S. M. & Sharma S. 2017. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. Chemical Engineering Journal 317: 232–241. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.054>

Kanna R. 2017. Biological surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and probable application in Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). International Journal of Civil Engineering and Technology (IJCIET). 8 (10) 619-626

Kashif A., Rehman R., Fuwad A., Shahid M. K., Dayarathne H. N. P., Jamal A., Aftab M. N., Mainali B. & Choi Y. 2022. Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants – A critical review. Advances in Colloid and Interface Science (306) 102718. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102718>

Kaur H., Sangwan S., Sharma P. & Singh S. 2021. Biosurfactant production prospects of a Gram-negative bacterium-*Klebsiella pneumoniae* ssp. *Ozaenae* BK34. Environmental Monitoring and Assessment volume 194(374). <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10033-8>

Khan, A., S. Saxena, S. Baloni, M. Sharma & J. Kodavaty. 2021. Overview and methods in Enhanced Oil Recovery. Journal of Physics: Conference Series. doi:10.1088/1742-6596/2070/1/012061

Khubaib M. A., Raza Z. A., Abid S., Nazir A. & Tariq M. R. 2020. Cell-Free Culture Broth of *Pseudomonas aeruginosa*—An Alternative Source of Biodispersant to Synthetic Surfactants for Dyeing the Polyester Fabric. J Surfact Deterg. DOI: 10.1002/jsde.12485

Kogler F., Mahler E., Dopffel N., Schulze-Makuch D., Borovina A., Visser F., Herold A. & Alkan H. 2021. The Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) potential of Halanaerobiales under dynamic conditions in different porous media. Journal of Petroleum Science and Engineering. (196) 107578. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2020.107578>

Kumar, S. 2012. Textbook of Microbiology. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. ISBN : 978-93-5025-510-0

Liu J., Sheng J. J. & Tu J. 2020. Effect of spontaneous emulsification on oil recovery in tight oil-wet reservoirs. *Fuel*: 279. 118456. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118456>

Madigan M., Martinko J., Dunlap P., & Clark D. 2017. *Brock Biology of microorganisms*. 13a. Edition. Pearson Higher education. Madrid, España. ISBN-13: 978-0-321-64963-8

Maier R.M., Pepper I. L. & Gerba C. G. 2009. *Environmental microbiology*. Elsevier. Academic Press. 2^a edition. ISBN: 978-0-12-370519.8

Mani P., Dineshkumar G., Jayaseelan T., Deepalakshmi K., Ganesh-Kumar C., & Senthil-Balan, S. 2016. Antimicrobial activities of a promising glycolipid biosurfactant from a novel marine *Staphylococcus saprophyticus* SBPS 15. *3 Biotech*, 6(2). doi:10.1007/s13205-016-0478-7

Márques A. V., Jurelevicius D., Montezano M. J., Macedo de Souza P., Vieira de raújo L., Gonçalves B T., Mendonça A R. O., Guimarães F D. M. and Seldin L. 2015. *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for Microbial Enhanced Oil Recovery. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.08.046>

Mohanty S. S., Koul Y., Varjani S., Pandey A., Ngo H. H., Chang J. S., Wong J. W. C. & Bui X. T. 2021. A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production. *Microbial Cell Factories*. 20(120):1-13. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01613-3>

Mondal M. H., Sarkar A., Maiti T. K. & Saha B. 2017. Microbial assisted (*pseudomonas* sp.) production of novel bio-surfactant rhamnolipids and its characterisation by different spectral studies. *Journal of Molecular Liquids* (242)873–878. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.07.089>

Montoya V. C., Flórez R M. A., Guzmán D F. L. & Quintero D J. C. 2021. Production, characterization and kinetic model of biosurfactant produced by lactic acid bacteria. *Electronic Journal of Biotechnology*. 53:14–22. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.06.001>

Ogunshe A. A. O. & Falode O. A. 2021. The Intriguing Extrapolations of Haemolysis Assay as Screening Criterion for Selecting Biosurfactant-Producing Microorganisms in Petroleum Industries Process-Conditions. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*. 12(431):1-12. ISSN: 2157-7463

Ojeda-Morales M. E., Domínguez-Domínguez M., Hernández-Rivera M. A. & Álvarez-Ramírez, J. G. 2016. Biosurfactant Synthesized by *Azospirillum lipoferum* ALM1B2: Characterization and Application for Environmental Protection. *Water, Air, & Soil Pollution*. 227(6). DOI 10.1007/s11270-016-2871-6

Patel J., Borgohain S., Kumar M., Rangarajan V., Somasundaran P. & Sen R. 2015. Recent developments in microbial enhanced oil recovery. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. (52).1539–1558. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.135>

Patowary K., Patowary R., Kalita M. C. & Deka S. 2017. Characterization of Biosurfactant Produced during Degradation of Hydrocarbons Using Crude Oil As Sole Source of Carbon. *Frontiers in Microbiology*. doi.org/10.3389/fmicb.2017.00279

Peekate P. L. & Abu G. O. 2017. Optimizing C:N Ratio, C:P Ratio, and pH for Biosurfactant Production by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Advances in Microbiology*. 7(2) 1-14. DOI: 10.9734/JAMB/2017/38199

Peng F., Wang Y., Sun F., Liu Z., Lai Q. & Shao Z. 2018. A novel lipopeptide produced by a Pacific Ocean deep-sea bacterium, *Rhodococcus* sp. TW53. *Journal of Applied Microbiology*. (105).698–705. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03816.x>

Pornsunthorntawee O., Wongpanit P., Chavadej S., Abe M., & Rujiravanit R. (2008). Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. *Bioresource Technology*, 99(6), 1589–1595 [doi:10.1016/j.biortech.2007.04.020](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.020)

Ray M. V., Kumar C., Banerjee P., Gupta S., Singh & Singh A. 2021. Investigation of biosurfactants produced by three indigenous bacterial strains, their growth kinetics and their anthracene and fluorene tolerance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 208. 111621. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111621>

Safdel M., Anbaz M. A., Daryasafar A. & Jamialahmadi M. 2017. Microbial enhanced oil recovery, a critical review on worldwide implemented field trials in different countries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 74:159–172. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.02.045>

Sajna K. V., Höfer R., Sukumaran R. K., Gottumukkala L. D. & Pandey A. 2015. White Biotechnology in Biosurfactants, chapter 14. Elsevier-Book Aid International. USA. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00016-1>

Shalini D., Benson A., Gomathi R., John Henry A., Jerritta S., & Melvin Joe M. 2017. Isolation, characterization of glycolipid type biosurfactant from endophytic *Acinetobacter* sp. ACMS25 and evaluation of its biocontrol efficiency against *Xanthomonas oryzae*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 252–258. doi:10.1016/j.bcab.2017.07.013

Sharma S. & Pandey L. M. 2020. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* RSL-2 isolated from sludge and biosurfactant mediated degradation of oil. *Bioresource Technology* 307. 123261. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123261>

Singh P., & Tiwary B. N. 2016. Isolation and characterization of glycolipid biosurfactant produced by a *Pseudomonas otitidis* strain isolated from Chirimiri coal mines, India. *Bioresources and Bioprocessing*, 3(1). doi:10.1186/s40643-016-0119-3

Soares da Silva R. D. C., Alemida D. G., Meira H. M., Silva E. J., Farías C. B. B., Rufino R. D., Luna J. M. & Sarubbo L. A. 2017. Production and characterization of a new biosurfactant from *Pseudomonas cepacia* grown in low-cost fermentative medium and its application in the oil industry. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.09.004>

Speight, J. 2016. Introduction to enhanced recovery methods for heavy oil and tar sands. Part I. Reservoirs and Reservoir Fluids. Second Edition, U.S.A. ISBN 978-0-12-849906-1

Su H., Kuang X., Ren Y. & Luo L. 2022. Biostimulants promote biodegradation of n-hexadecane by *Raoultella planticola*: Generation of lipopeptide biosurfactants *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 10(5):108382. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108382>

Tatar A. 2018. Microbial Enhanced Oil Recovery: Microbiology and Fundamentals. Fundamentals of Enhanced Oil and Gas Recovery from Conventional and Unconventional Reservoirs. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813027-8.00010-2>

Toribio-Jiménez Y., Rodríguez-Barrera M. Á. M., Valdez Lucena A., Barrera Flores D., Segura V., Wilson-Corral E., Flores A. & Romero Y. 2018. Production of biosurfactants by bacteria isolated from a mine tailing zone in Southern Mexico and their resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology Research*. 6(4):23-31. DOI: 10.5897/JBR2013.0121

Varjani S. J. & Upasani V. N. 2017. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource Technology* (232).389–397. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.047>

Varjania S. J. & Gnansounou E. 2017. Microbial dynamics in petroleum oilfields and their relationship with physiological properties of petroleum oil reservoirs. *Bioresource Technology*. Vol. 245:1258-1265 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.028>

Yañez-Ocampo, G. & Wong-Villarreal A. 2013. Biosurfactantes microbianos, producción potencial con residuos agroindustriales de Chiapas. *BioTecnología*. 17(3): 12-2

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

CAPITULO 3

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

EVALUATION OF OIL RECOVERY IN A SAND-PACKED COLUMN USING A BIOSURFACTANT PRODUCED BY THE BACTERIAL STRAIN *Raoultella planticola*

EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE PETRÓLEO EN COLUMNA EMPACADA CON ARENA EMPLEANDO UN BIOSURFACTANTE PRODUCIDO POR LA CEPA BACTERIANA *Raoultella planticola*

RESUMEN

La cepa bacteriana previamente identificada como *Raoultella planticola* fue cultivada en medio mineral con base de nitrógeno (nitrofoska) para la obtención del caldo crudo libre de células. Se determinó el efecto de la emulsión (caldo bacteriano/petróleo crudo pesado) en la viscosidad y densidad del petróleo, para lo cual se empleó un viscosímetro Saybolt Furol y un picnómetro. Previo a esto, el petróleo crudo que se utilizó fue sometido a pruebas físico químicas para conocer la densidad API, cuyo valor fue de 15.18 y una densidad de 0.9638 g/mL. Por otro lado, para evaluar la eficiencia de recuperación de petróleo a nivel laboratorio se utilizó una columna empacada con arena con un volumen de 250 mL. *Raoultella planticola* tuvo una eficiencia de recuperación de 29.2 mL

PALABRAS CLAVE: Recuperación, columna empacada

3.1 INTRODUCCIÓN

El mejoramiento en la eficiencia de los métodos de extracción de petróleo constituye una alternativa viable con importantes efectos económicos y en el ambiente (Saravanan *et al.*, 2020). Durante la primera etapa de recuperación se hace uso de la presión natural del reservorio que impulsa el petróleo hacia la superficie, además el gas contenido en él se expande, permitiendo la migración del agua presurizada y mejorando el drenaje de la roca. En esta etapa se puede recuperar del 10 al 50 % dependiendo de la densidad API del aceite, pero puede ser tan bajo como un 15 % si el aceite es muy denso (Satter e Iqbal, 2016). En la recuperación secundaria se somete el pozo a un proceso de estimulación mediante la inyección de un fluido a presión con el fin de reponer la energía inicial proporcionada por la presión natural, y así aumentar el desplazamiento del petróleo y la eficiencia de barrido. Mientras tanto, la recuperación terciaria es la última etapa donde se recupera el hidrocarburo que no pudo obtenerse en las fases previas, y muestra la relativa ineficiencia de los métodos primarios y secundarios. Para este fin se hace uso de productos químicos como polímeros y surfactantes, gases como CO₂, nitrógeno o vapor (Saravanan *et al.*, 2020).

La profundidad de los pozos es un factor importante en el uso de los procesos de MEOR, porque la temperatura aumenta 2-3 °C por cada 100 m de profundidad. Por ejemplo, en el activo Samaria-Luna, Tabasco, México, la profundidad promedio va de 5,000 a 6,000 m, por lo que las condiciones micro ambientales son adversas para los microorganismos autóctonos.

Mientras que en otro pozo del activo Samaria-Luna (KM-KI), a 2,750 m de profundidad la temperatura llega a 126 °C, lo que es un factor limitante porque se ha reportado que las cepas microbianas empleadas en MEOR funcionan mejor con temperaturas menores a los 80 °C (Birkle. 2002; Rangel, 2012; Varjani & Gnansounou, 2017). Debido a esto es recomendable hacer uso del biosurfactante sin purificar, también llamado caldo crudo libre de células, en los procesos de recuperación mejorada de petróleo, en lugar de su presentación en estado puro, debido a que en la actualidad la producción de biosurfactantes es económicamente elevada (Varjani & Gnansounou, 2017). Por ejemplo, 100 g de ramnolípidos al 90 % (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. cepacia*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Serratia rubidaea*) tienen un precio de 233 USD, o 2,330 USD por cada kg; no obstante, otros biosurfactantes son más caros, como en el caso de la surfactina ≥ 98 % (HPLC) (*Bacillus subtilis*, *B. nealsoni*), la cual tiene un precio de 223 USD por 10 mg, o 22.3×10^6 USD por cada kg. Y si estos precios se comparan con un surfactante sintético, tal como un reactivo ACS dodecilsulfato de sodio, ≥ 99 % cuyo precio es de 146 USD por 100 g, o 1,460 USD por cada kg, la diferencia es notable (Sarubbo *et al.*, 2022). Sin embargo, antes de su aplicación en campo, es necesario que los ensayos de MEOR se lleven a cabo primero a escala laboratorio. Por estos motivos, esta investigación tuvo como objetivo evaluar la recuperación mejorada de petróleo haciendo uso de un biosurfactante crudo, libre de células, sintetizado por *Klebsiella planticola* en una columna empacada con arena a escala laboratorio.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 CEPA BACTERIANA PRODUCTORA DE BIOSURFACTANTE

La cepa bacteriana empleada en esta investigación fue *Raoultella planticola* cuyo biosurfactante mostró en un valor de Tensión Superficial de 40 mN/m mientras que la CMC se alcanzó a 152.5 mg/L, también mostró actividad superficial de acuerdo a los ensayos de gota colapsada (Joy *et al.*, 2017), dispersión de aceite (Marques *et al.*, 2015) e índice de emulsificación (Cooper & Goldenberg, 1987; Datta *et al.*, 2018).

3.2.2 OBTENCIÓN DEL CALDO CRUDO LIBRE DE CÉLULAS

En condiciones axénicas la cepa *Raoultella planticola* fue inoculada en medio mineral con base de nitrógeno, como fue descrito en el capítulo II. Se estableció un biorreactor de 1,000 mL durante 96 h, lo cual corresponde al tiempo de producción más alta de biosurfactante para esta cepa. Sin embargo, durante la fase de crecimiento se producen otras moléculas que forman el caldo crudo, y que además tienen un efecto sinérgico en la recuperación mejorada de petróleo (Tadros, 2018).

Después de 96 h el caldo se centrifugó a 6,000 rpm por 30 minutos para remover la biomasa celular y dejar libres a los metabolitos secundarios, haciendo uso de una centrífuga marca HERMLE Z 230 A. El sobrenadante obtenido se separó en un matraz de 1,000 mL y se almacenó a 4 °C por 24 h.

3.2.3 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD API DEL PETRÓLEO

Para determinar la gravedad API del petróleo empleado en este ensayo se usó el método del picnómetro o “botella de gravedad específica”. El picnómetro es un matraz con un tapón de vidrio esmerilado de cierre hermético con un orificio fino que lo atraviesa y que le permite realizar mediciones precisas del volumen del líquido que se quiere medir. Esto permite determinar con precisión la densidad del fluido de interés por referencia con la densidad conocida de un fluido como el agua o el mercurio, utilizando para ello una balanza analítica (Nadkarni, 2007).

En el presente estudio, el peso del picnómetro vacío fue de 17.7 g, el picnómetro con agua pesó 27.6 g y con petróleo 26.7 g. Haciendo uso de la fórmula:

$$d_B = \frac{m_B}{m_A} * d_A$$

Donde: d_B = Densidad de la solución problema, m_B = masa del picnómetro con solución problema, m_A = masa del picnómetro con solución conocida, d_A = densidad de solución conocida.

De acuerdo con (Castro *et al* 2019) se determinó la Gravedad Especifica del petróleo a las mismas condiciones de su densidad aplicando la siguiente formula:

$$GE \text{ petróleo crudo} = \frac{\rho \text{ petróleo crudo}}{\rho \text{ agua}}$$

Una vez determinada la GE se procedió a calcular los grados API del petróleo aplicando la formula siguiente:

$$\text{Grados API} = \frac{141.5}{GE \text{ petróleo crudo}} - 131.5$$

3.2.4 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL PETRÓLEO

Para determinar la composición de petróleo usado en los ensayos de recuperación se empleó un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama. El equipo es de la marca Shimadzu Modelo GC-2010 plus, con columna capilar (5 % fenil-95 % dimetilpolisiloxano) de 30 m x 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μ m de espesor de película. El detector de

ionización de flama opera con una mezcla de hidrógeno-aire y puede alcanzar temperaturas hasta de 450 °C. El gas acarreador fue nitrógeno, a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min. El horno se mantuvo a 80 °C por 3 min, seguido por un incremento a razón de 12 °C/min hasta alcanzar 275 °C (esta temperatura se mantuvo por 12 min). La temperatura del inyector fue de 280 °C y la temperatura del detector fue 300 °C.

3.2.5 EFECTO DEL BIOSURFACTANTE EN LA VISCOSIDAD Y DENSIDAD DE LAS EMULSIONES PETRÓLEO-CALDOCRUDO

Las mediciones de viscosidad de la mezcla petróleo-caldo crudo (libre de células) se realizaron en un viscosímetro marca Saybolt. Se utilizaron diferentes relaciones v/v de la mezcla petróleo/caldo crudo (60/10, 60/20, 60/30, 60/40, 60/50, 60/60). Para llevar a cabo este procedimiento, es necesario medir la velocidad del desplazamiento de la muestra (1 s = 1 s saybolt). El equipo cuenta con un sistema de calentamiento con el que se modifica la temperatura del aceite. Una vez obtenida la temperatura de análisis en el baño de aceite, se depositó la muestra de emulsión de petróleo y caldo crudo libre de células en un receptor del viscosímetro Saybolt. Se dejó reposar por 30 minutos para lograr el equilibrio térmico entre el aceite de calentamiento y la muestra.

Una vez transcurrido el tiempo de reposo, la muestra se hizo fluir por el conducto del viscosímetro que contenía la mezcla. A partir de entonces se midió el tiempo hasta que alcanzó el aforo del matraz Saybolt de 60 mL usado como recolector. El tiempo transcurrido en el flujo de la mezcla tiene el objetivo de determinar cómo el caldo crudo libre de células afecta la viscosidad de una mezcla de hidrocarburos determinada. Los resultados obtenidos son específicos para el aceite y el tipo de biosurfactante empleado para las emulsiones petróleo-caldo crudo.

El método Saybolt cubre los requerimientos empíricos para determinar las viscosidades Saybolt universal o Saybolt Furol de los productos de petróleo entre 21 y 99 °C. Como se requieren muestras pequeñas y menores tiempos, las mediciones proporcionan una mayor precisión. La viscosidad Saybolt Furol es el tiempo de salida corregido en segundos de 60 mL de muestra que fluye a través de un orificio Furol calibrado en condiciones específicas (Nadkarni, 2007).

Para la medición de la densidad de la mezcla petróleo/caldo, se utilizó el método del picnómetro anteriormente descrito. La relación v/v de la mezcla fue la misma que se utilizó para determinar la viscosidad.

3.2.6 ENSAYO DE RECUPERACIÓN EN COLUMNAS EMPACADAS CON ARENA

Para llevar a cabo los ensayos de recuperación se diseñó una columna de vidrio con un volumen de 250 mL. La longitud total de la columna fue de 20 cm, con un diámetro interno

de 4 cm. Cuenta además con una tapa inferior y superior provistas de un orificio de inserción de 1.2 cm de diámetro, a través del cual se insertó una manguera de alimentación por donde se introdujo el caldo libre de células, la salmuera y el petróleo. La columna se diseñó con el fin de simular las condiciones de un pozo petrolero, y también para evaluar la recuperación de petróleo. Una columna empacada con arena se considera una técnica estándar a escala laboratorio, simulando las operaciones de extracción a partir de la etapa de recuperación secundaria ya que una vez que la columna es saturada de petróleo se somete a una serie de lavados y barridos con agua y salmuera, tal como ocurre en los ensayos de campo (Kanna *et al.*, 2017). En las partes superior e inferior de la columna se colocaron mallas con un tamaño de poro de 1 mm y 100 μm , respectivamente; un anillo de caucho ('O' ring) se colocó alrededor las tapas con el fin de que sellarán herméticamente durante el experimento.

La arena empleada se obtuvo a partir de un banco de arena del río Samaria ubicado a los 18°00'26.0" LN y los 93°16'05.5" LO. Se tamizó con una malla para suelos #40 para obtener granos con un tamaño de partícula de 400 μm en promedio, y así asegurar la correcta distribución del petróleo en la columna. El experimento se llevó a cabo a temperatura ambiente, 29.9 °C. Aunque la temperatura dentro de un pozo es variable de acuerdo a factores como la profundidad y la composición geológica, los biosurfactantes han demostrado ser estables en condiciones extremas de pozo (Joy *et al.*, 2017; Mondal *et al.*, 2017; Soares Da Silva *et al.*, 2017; Varjani & Upasani, 2017). La arena se lavó con detergente y ácido comercial con el fin de remover materia orgánica y otras impurezas y posteriormente se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 lb/in^2 de presión por 15 min.

La arena se colocó dentro de la columna con lentitud para que el llenado fuera compacto y homogéneo. Por el extremo inferior se hizo vacío con una bomba de vacío por espacio de 2-3 min para evacuar los gases adsorbidos en los poros de las partículas de arena. Posteriormente se inundó la columna con salmuera al 5 %, preparada con 5 g /100 mL de NaCl grado ACS en agua destilada.

Con una bomba peristáltica RD100-01 de ECOSHEL, modelo YZ1515, con velocidad de flujo de 3 mL/min se inundó la columna con la salmuera, hasta inmediatamente antes de observar flujo de líquido en la sección inferior de la columna. Este volumen de salmuera empleado es el volumen de saturación de la columna y es también el volumen de poros del empaque (V_p). Una vez medido el volumen de poros, se alimentó un volumen de salmuera equivalente a tres V_p , para garantizar la saturación completa de la columna con salmuera. Se debe recalcular el V_p con la cantidad de salmuera alimentada y recolectada por el extremo inferior. Con el volumen poro, V_p , en mL y el volumen de la columna (V_c) en mL, se calculó el porcentaje de porosidad del empaque.

$$\% \text{ de porosidad} = \frac{V_p}{V_c} * 100$$

Una vez saturada la columna, se introdujo el petróleo a 3 mL/min para desplazar a la salmuera, hasta que no se observó salida de agua por el extremo inferior. El volumen de petróleo retenido en la columna es el petróleo original en el sitio (OOIP, por sus siglas en inglés), y es igual a la cantidad en mL de salmuera desplazada. Con esto se calculó la saturación inicial de petróleo (S_{oi} , por sus siglas en inglés) y la saturación de agua (S_{wi} por sus siglas en inglés).

$$S_{oi} = \left(\frac{OOIP}{V_p} \right) * 100 \quad S_{wi} = \left(\frac{V_p - OOIP}{V_p} \right) * 100$$

Hecho esto, la columna se dejó reposar por 24 h hasta que nuevamente se volvió a hacer fluir la salmuera por la columna, simulando los procesos de water flooding hasta que no se observó más petróleo por la parte inferior de la columna. Este proceso desplazó el exceso de petróleo, dejando sólo el petróleo adsorbido en los poros de las partículas de arena. El volumen de salmuera ocupado en esta etapa podría ser de 6-9 veces el volumen de poro. La mezcla petróleo-agua se colectó, se separó por centrifugación y se cuantificó, para obtener el petróleo recuperado después de la inundación con agua (S_{orwf} , por sus siglas en inglés).

La diferencia entre el OOIP y el petróleo recuperado en el paso anterior, constituyó el petróleo residual (S_{or}) y se calculó volumétricamente. También se expresó como la saturación residual de petróleo:

$$S_{or} = \left(\frac{OOIP - S_{orwf}}{OOIP} \right) * 100$$

De acuerdo con la metodología propuesta, para desplazar el petróleo residual, se inyectó el biosurfactante, que en este caso lo constituyó el caldo libre de células, a una velocidad más baja que los fluidos anteriores (1 mL/min). El volumen alimentado fue equivalente a un volumen de poro. Con el caldo inoculado en la columna se dejó en reposo por 24 h. Después de ese lapso se volvió a alimentar con salmuera con el fin de barrer el biosurfactante y el petróleo residual, hasta que ya no se observó petróleo en el efluente de la columna. Esta cantidad de petróleo recuperado del petróleo residual constituyó la recuperación por inyección del biosurfactante (S_{orbf} , por sus siglas en inglés). De este modo, se pudo calcular la eficiencia de recuperación con biosurfactante, o recuperación adicional de petróleo (AOR, por sus siglas en inglés).

$$AOR = \frac{S_{orbf}}{S_{or}} * 100$$

La recuperación mejorada de petróleo se llevó a cabo con el caldo crudo de la cepa *Raoultella planticola*.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 CEPAS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES

La cepa *Raoultella planticola* fue cultivada en medio mineral con base de nitrógeno, con el fertilizante comercial nitrofoska. Durante el crecimiento en el medio mineral, el pH del caldo de cultivo fue de 4.9. El mismo medio con nitrofoska sin inocular tuvo un pH ligeramente ácido de 6.5.

La característica ácida del medio puede deberse al hecho de que durante la fase de crecimiento microbiano se producen sustancias ácidas como el ácido propiónico y el ácido butírico, aunque esto no siempre es así porque la producción de ácidos en el caldo crudo dependerá mucho de la composición del medio (Safdel *et al.*, 2017; Hernández *et al.*, 2019).

3.3.3 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD API DEL PETRÓLEO

De acuerdo con las mediciones obtenidas por el método del picnómetro, el resultado indicó que la mezcla de hidrocarburos derivados del petróleo usada en este ensayo correspondió a un petróleo pesado. La densidad de la mezcla de hidrocarburos en el presente estudio fue de 0.9638 g/mL, cuyo valor en la escala API correspondió a 15.18 °, que lo clasifica como un petróleo pesado (IMP, 2016).

3.3.4 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL PETRÓLEO

El análisis parcial de la composición de los hidrocarburos empleados durante el ensayo de recuperación mejorada (MEOR) indica la presencia de hidrocarburos de la fracción media (figura 22). De los hidrocarburos identificados, el tiempo de retención, así como el área y concentración (en µg/ml) de cada compuesto se muestran en la Tabla 5.

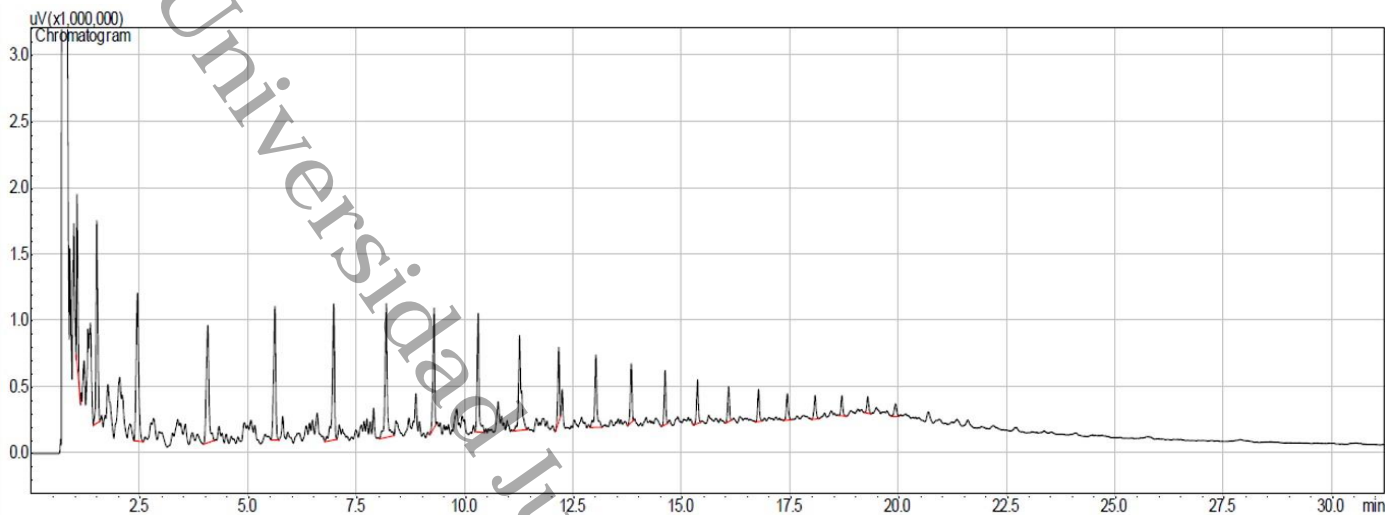


Figura 22. Cromatograma de la muestra JKL-1

Figure 22. Chromatogram of sample JKL-1

Tabla 5. Concentraciones de hidrocarburos de la fracción media identificados de una muestra del petróleo usado.

Table 5. Concentrations of hydrocarbons in the middle fraction identified from a used oil sample.

#ID	Nombre	Tiempo de retención (min)	Área	Concentración (µg/mL)
1	Decano	4.054	3717737.3	3110.0
2	Undecano	5.603	3351545.3	2722.7
3	Dodecano	6.961	3544781.2	2849.1
4	Tridecano	8.172	3546020.5	2837.5
5	Tetradecano	9.275	2482671.8	1983.3
6	Pentadecano	10.292	2672205.5	2114.2
7	Hexadecano	11.25	3074931.6	2426.5
8	Heptadecano	12.152	1419119.3	1130.5
9	Octadecano	13.008	1872963	1485.7
10	Nonadecano	13.825	1183664.4	935.1
11	Eicosano	14.605	1084872.2	860.9
12	Heneicosano	15.354	931194.6	740.0
13	Docosano	16.07	714507.4	569.5
14	Tricosano	16.761	691601.3	554.3

15	Tetracosano	17.424	606579.8	488.0
16	Pentacosano	18.064	573619.9	459.1
17	Hexacosano	18.683	429843.6	352.1
18	Heptacosano	19.281	376633.8	300.9
		Total	32622161.7	

A partir de estos datos, la concentración de la fracción media es 2,074 µg/mL. Por otro lado, en la tabla 6 se muestran las concentraciones de los compuestos detectados y que pertenecen a hidrocarburos fracción ligera, con una concentración de 9378.9

Tabla 6. Hidrocarburos de la fracción ligera identificados en la muestra hidrocarburos

Table 6. Hydrocarbons of the light fraction identified in the hydrocarbons sample

#ID	Nombre	Tiempo de retención (min)	Área	Concentración (µg/mL)
1	Heptano	1.039	2571471.3	2138.0
2	Octano	1.494	4145987.4	3457.2
3	Nonano	2.431	4515578.8	3783.7

3.3.5 EFECTO DEL BIOSURFACTANTE EN LA VISCOSIDAD Y DENSIDAD DE LAS EMULSIONES PETRÓLEO-CALDO CRUDO

El proceso de Recuperación Mejorada de Petróleo es implementado en muchos reservorios del mundo con el fin de recuperar cantidades adicionales de petróleo que no son extraídos durante la recuperación secundaria en los procesos de waterflood o en la inyección de gas. El petróleo no recuperado en un reservorio convencional aun teniendo buena calidad, con frecuencia excede la mitad de la cantidad de petróleo original en su sitio.

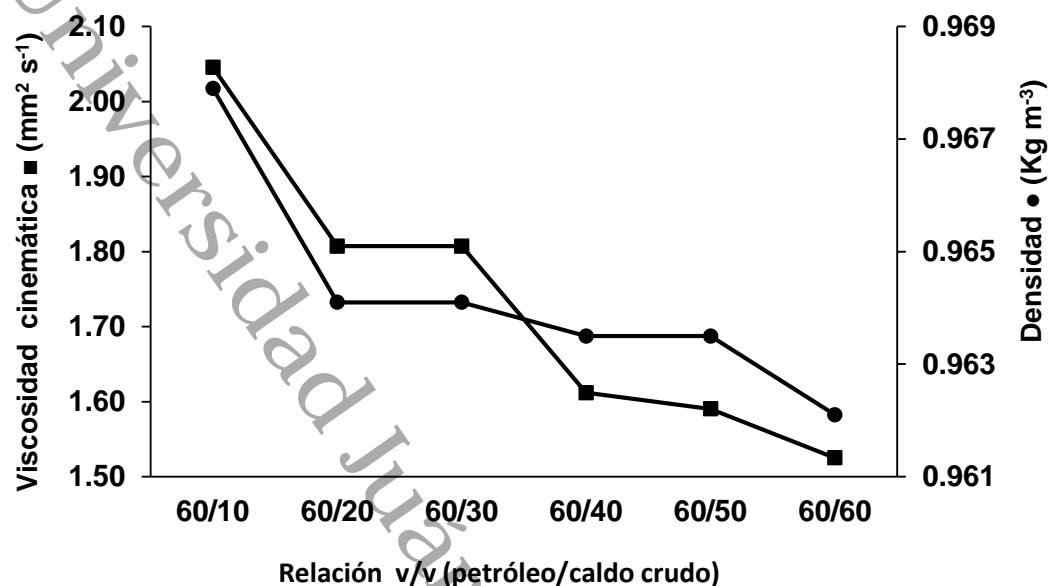


Figura 23. Efecto del caldo crudo en la viscosidad ■ y densidad ● de la emulsión petróleo/caldo crudo

Figura 23. Effect of crude oil on the viscosity ■ and density ● of the oil/oil emulsion

En este ensayo se emplearon diferentes combinaciones de petróleo/caldo crudo con el fin de conocer la forma en que la viscosidad de petróleo crudo pesado se modifica por acción de los metabolitos secundarios presentes en el caldo crudo. La figura 23 muestra el efecto que genera el caldo crudo al ser agredado al petróleo provocando la disminución de la viscosidad y por tanto su densidad

El hecho de que las técnicas de recuperación primarias y secundarias sólo pueden extraer un 35-45 % en promedio del petróleo original en su sitio deja un amplio margen de petróleo no convencional que puede ser obtenido por métodos no invasivos y menos contaminantes en comparación con los métodos térmicos o químicos que afectan al medio ambiente (Zoua *et al.*, 2014).

3.3.6 ENSAYO DE RECUPERACIÓN EN COLUMNAS EMPACADAS CON ARENA

Para los ensayos de recuperación de petróleo haciendo uso de una columna empacada con arena se empleó la cepa bacteriana *Raoultella planticola*. Se hizo uso de la misma muestra de petróleo que fue caracterizada previamente con una densidad API de 15.18 y una densidad de 0.9638 g/mL. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7. La arena de la columna tuvo un porcentaje de porosidad promedio de 50.5 % y un volumen de poro de 126.2 mL ± 0.83. El porcentaje de porosidad y el volumen de poro mostraron baja variabilidad, lo mismo

que el petróleo original en su sitio, $111.3 \text{ mL} \pm 0.66$. El tamaño uniforme de las partículas de arena y el hecho de ser el mismo petróleo puede influir en los resultados con baja variabilidad.



Figura 24. Saturación de la columna con salmuera

Figura 24. Saturation of the column with brine



Figura 25. Saturación de la columna con petróleo

Figura 25. Saturation of the column with oil

Por otro lado, la tabla 7 se muestran los resultados del ensayo de recuperación llevado a cabo en la columna empacada con arena. Los resultados muestran un nivel de recuperación hasta de un 29 % después de 24 h de incubación, ya que la columna no contiene células, sino sólo los metabolitos generados durante la cinética de crecimiento.

Tabla 7. Resumen de los resultados de MEOR haciendo uso de una columna empacada con arena. Las columnas se presentan en promedios

Table 7. Summary of MEOR results using a sand-packed column. Columns are presented in averages

Parámetros	Biosurfactante	
	de <i>Raoultella planticola</i>	Control
OOIP (mL)	110.7	112
Soi (%)	87.6	88.2
Swi (%)	12.4	11.8
Sorwf (mL)	60	42
Sor (%)	45.8	62.5
Sorbf (mL)	13.3	1.6
Vp (mL)	126.3	127
AOR (%)	29.2	2.6
porosidad (%)	50.5	50.8

Los resultados de la columna empacada con arena son el promedio de tres repeticiones, en este ensayo de MEOR se dio un tiempo de incubación de sólo 24 h, debido a que se usó el caldo libre de células. El porcentaje (%) de recuperación de petróleo (AOR) fue de 29.2 (26.8 ± 3.2)

La recuperación de petróleo crudo en un ensayo de MEOR depende de la eficiencia metabólica del microorganismo usado, de la capacidad del biosurfactantes para modificar la tensión superficial e interfacial, así como de las características geológicas de la roca almacenadora (Hernández *et al.*, 2019). Por lo tanto, se requieren más ensayos con rocas y mezclas de petróleo locales o regionales con el fin de llenar los vacíos en esta parte de la investigación en pozos mexicanos

3.4 DISCUSIÓN

3.4.1 CEPAS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES

La fuente de carbono constituye uno de los factores más importantes en la producción y rendimiento de los biosurfactantes, por lo tanto, su efecto en el aumento de la masa celular es directamente proporcional a su concentración. La sacarosa es un sustrato que por lo común no se encuentra en estado puro en el medio por lo que su uso podría elevar los costos de producción. Los resultados reportados por Ghribi y Ellouze-Chaabouni (2011) y Sari *et al.*, (2019), en cuanto al rendimiento son inferiores a la cepa *Raoultella planticola* (3.22 g/L), en

la cual se empleó sacarosa grado ACS en lugar de glucosa, que, si bien ambos son reactivos de uso estándar de laboratorio, la sacarosa puede hallarse en el microambiente con mayor biodisponibilidad. Además, otras fuentes provenientes de desechos agroindustriales se pueden emplear como fuente de carbono, lo que disminuye notablemente los costos de producción. De hecho, Ahmad *et al.*, (2021) obtuvieron un rendimiento similar, usando la cepa *Klebsiella* sp KOD36 cuyo máximo rendimiento fue de 4.34 g L⁻¹, es decir, un 25 % superior al encontrado en *K. planticola*. La diferencia en la fuente de carbono puede ser determinante, ya que estos autores usaron aceite de soja en lugar de sacarosa. Sin embargo, Jain *et al.*, (2013) obtuvieron un rendimiento muy superior, con 10.1 g L⁻¹ con *Klebsiella*, usando como fuente de carbono almidón. No obstante, al emplear sacarosa como fuente de carbono lograron un rendimiento de 5.1 g L⁻¹,

Por otro lado, con respecto a la fuente de nitrógeno, éste puede provenir de diferentes sustratos, sobre todo en sus formas de NH₃, NH₄⁺, NO₃⁻ y NO₂⁻, que están presentes en el medio con nitrofoska usado en el presente estudio, cuya formulación es 12-8-16+3MgO, donde el 20 % es nitrógeno total (4 % nitrógeno nítrico y 16 % nitrógeno amoniacal). Además, fuentes como el NO₃⁻ y el NO₂⁻ no sólo satisfacen los requerimientos nutricionales de las cepas cultivadas, sino que además pueden ser usadas en la respiración anaerobia, como es el caso de algunas cepas del género *Bacillus*. El NH₄⁺ puede ser usado como aceptor final de electrones en ausencia de oxígeno (Maier, 2009; Clarke, 2013).

El nitrógeno, en sus distintas formas asimilables, es fundamental para el crecimiento microbiano. Se ha comprobado, por medio de estudios de cultivos puros, que los microorganismos utilizan los aminoácidos de una forma multifuncional como fuente de nitrógeno. Una vez que se asimila, puede ser usado como parte directa o indirecta durante la síntesis de la pared celular o durante la síntesis de proteínas. Del mismo modo, los aminoácidos pueden ser rápidamente desaminados o transaminados, constituyendo los esqueletos de carbono resultantes en sustratos que posteriormente son empleados en la respiración celular, conduciendo a la producción de CO₂. Del mismo modo, la pared celular de las bacterias está constituido de peptidoglucano, el cual contiene enlaces de glucano, así como unidades repetidas de ácido N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos entre sí por pequeños puentes peptídicos, los cuales por lo común consisten de cuatro a cinco aminoácidos como L-alanina y D-glutamina. La presencia de fuentes de nitrógeno en sus formas amoniacal o amonio permiten la construcción de estos pilares básicos en la estructura celular bacteriana (Jones *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2018).

La proporción carbono-nitrógeno (C/N) es muy importante en la producción de biosurfactantes, porque son la materia prima del esqueleto de estas moléculas y tienen una influencia directa en su estructura y función (Jahan *et al.*, 2020). La C/N del medio mineral nitrofoska fue de 29.61, y aunque se han reportado C/N menores en ensayos para la producción y optimización de biosurfactantes (Al-Ajlani *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012; Heryani y Putra, 2017), la concentración para promover una máxima producción depende de la especificidad de las fuentes (como el grado de pureza), de su composición molecular, y la forma que presenten para facilitar la asimilación a nivel celular. En este sentido se requiere

de una mayor investigación para la optimización del rendimiento de moléculas biosurfactantes, porque su producción depende de varios factores.

3.4.4 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL PETRÓLEO

El petróleo crudo pesado tiene la característica de que es mucho más difícil de recuperar que el petróleo crudo ligero, y los procesos que pueden llevarlo a cabo son de alto costo. Tiene una gravedad API mucho menor y por lo común se requiere de técnicas especiales para poder extraerlo, su contenido de hidrógeno es menor en comparación con el carbono, contienen altos residuos de carbono y asfaltenos, metales pesados, azufre y nitrógeno. (Speight, 2016). El petróleo crudo pesado, dada su abundancia en los pozos maduros o clausurados, representa una oportunidad para incrementar la producción si se extrae por los medios adecuados que no dañen la integridad de los ecosistemas naturales (Lee y Babadagli, 2020).

3.4.4 EFECTO DEL BIOSURFACTANTE EN LA VISCOSIDAD Y DENSIDAD DE LAS EMULSIONES PETRÓLEO-CALDO CRUDO

De acuerdo con un estimado de la Administración de Información de Energía Estados Unidos, 375 billones de barriles aún se encuentran en los yacimientos de Estados Unidos. Por este motivo la disminución de petróleos ligeros y medianos ha hecho que la industria actual considere los yacimientos de petróleo crudo no convencional como una alternativa para su movilización con el fin de desarrollar procesos de recuperación, y así incrementar su producción entre 3-8 % con respecto al volumen de petróleo original en su sitio (Gaytán *et al.*, 2015; Satter e Iqbal, 2016; Varjani & Upasani, 2017).

A pesar de que el petróleo residual, por su alta viscosidad, es más difícil de explotar en la actualidad existe un amplio interés por extraerlo. Las razones se deben a su abundancia y a la escases de petróleos ligeros, puesto que no se puede recuperar por métodos convencionales que además sean de bajo costo, y porque en la actualidad existen tecnologías que pueden hacer rentable su extracción, como sucede con la MEOR, la cual emplea metabolitos secundarios como los biosurfactantes, pudiendo extraer hasta un 15 % del petróleo original en sitio (Bachman *et al.*, 2014; Speight, 2016).

El uso del biosurfactante impuro, caldo crudo con/sin células puede disminuir los costos de producción referentes a la recuperación de petróleo no convencional (Soares Da Silva *et al.*, 2017), debido a que contiene biosurfactantes y otros metabolitos de interés y promueve una conversión de los componentes más pesados del petróleo a fracciones más ligeras, disminuyendo sustancialmente con esto la viscosidad de la mezcla de hidrocarburos (Bachman *et al.*, 2014; Gaytán *et al.*, 2015; Safdel *et al.*, 2017).

Souaya *et al.*, (2012) establecieron un ensayo para evaluar el efecto sobre la viscosidad de una mezcla de asfaltenos/emulsificante sintético. Hicieron uso de un viscosímetro Saybolt Furol. Ellos emplearon un derivado del óxido de etileno (un surfactante no iónico) en diferentes concentraciones. La relación de la emulsión v/v fue de 60/70. Los resultados

indican un aumento de los segundos-Saybolt con el incremento de la temperatura de 25 °C a 50 °C. Estos valores están por encima de los resultados de este estudio, sin embargo, los asfaltenos son componentes naturales del petróleo extra pesado, de los residuos de su destilación, o de materiales bituminosos, y el incremento de la viscosidad al aumentar la temperatura puede deberse a un incremento del área por molécula, por causas del incremento del movimiento térmico (Speight, 2016). Este efecto es opuesto al de la mezcla petróleo pesado/caldo crudo, lo que puede explicarse porque se llevó a cabo a temperatura ambiente. De esta forma, los resultados de este estudio, indicaron una reducción de la viscosidad a medida que se incrementó la cantidad de caldo crudo en las emulsiones tratadas. Los principales efectos de los metabolitos secundarios presentes en el caldo de cepas productoras de biosurfactantes es la reducción de la viscosidad y el mejoramiento de las características de flujo. Además, otros metabolitos como los ácidos orgánicos mejoran la permeabilidad y porosidad de la roca almacenadora. También los solventes pueden disolver y remover pesadas cadenas de hidrocarburos (Gaytán *et al.*, 2015). La fluidez de la emulsión es de suma importancia porque permitirá obtener un porcentaje de recuperación significativo (que dependerá de las características de la roca, la composición del caldo crudo, el metabolismo bacteriano y las características del petróleo) que se traduzca en ganancias económicas por unidad de pozo (Bachman *et al.*, 2014; Safdel *et al.*, 2017).

3.4.6 ENSAYO DE RECUPERACIÓN EN COLUMNAS EMPACADAS CON ARENA

Diferentes investigaciones se han llevado a cabo en la MEOR haciendo uso de columnas empacadas con arena (Bordoloi y Konwar, 2008; Gudiña *et al.*, 2013; Qazi *et al.*, 2013; Ashish, 2018; Ibrahim, 2018), y se ha reportado la evaluación de la degradación de la mezcla de hidrocarburos después del ensayo de recuperación por cromatografía de gases y otros métodos (Gudiña *et al.*, 2013), sin embargo el uso de los biosurfactantes en su forma parcialmente purificada es de elevado costo en comparación con surfactantes de origen sintético (Geetha *et al.*, 2018) por lo que, el uso de su forma impura podría bajar los costos de producción hasta en un 60 % (Soares Da Silva *et al.*, 2017). Tan sólo 5 mg de Iturina A (*Bacillus subtilis*) con un porcentaje de pureza ≥ 95 % (HPLC) tiene un costo de 567 USD, lo que indica un precio por kg de 113,400,000 USD en comparación a los 1,460 USD por kg de un surfactante sintético como el dodecil sulfato de sodio (Sarubo *et al.*, 2022).

El caldo crudo, libre de células, es una mezcla de diferentes moléculas o metabolitos que pueden tener un efecto positivo en el proceso de recuperación. Estos llamados bioproductos no sólo lo constituyen los biosurfactantes, sino también ácidos, solventes, polímeros y gases que, aunque no tienen las mismas propiedades de los biosurfactantes contribuyen cada uno, produciendo un efecto sobre el petróleo y la roca reservorio. Todos esos bioproductos constituyen el caldo crudo, el cual en vez de purificarse en un proceso de MEOR, puede

usarse en su estado natural, actuando juntos como una sinergia que incide directamente en los porcentajes de recuperación de petróleo (Soares Da Silva *et al.*, 2017).

Hacer uso del caldo libre de células no implica una degradación de hidrocarburos, pero sí se modifica la tensión superficial estimulando la formación de emulsiones cinéticamente estables. Esto se puede ver en el efecto del caldo crudo en la viscosidad de una mezcla de petróleo. La relación 60/60 (v/v) tuvo la viscosidad más baja ($1.373 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$) en comparación con las demás relaciones v/v. El caldo crudo tuvo el menor tiempo en segundos Saybolt (11:27 s). Las funciones principales de los biosurfactantes son alterar la tensión tanto superficial como interfacial, así como adsorberse entre las fases inmiscibles, emulsificar el petróleo crudo, e incrementar la movilidad de las células bacterianas. Una forma de identificar la presencia de biosurfactantes dentro del ensayo de recuperación es determinar si existe alteración de algunas de sus características previamente medidas (ver figura 23), como la viscosidad (Tatar, 2018). Cuando se emplea el caldo con células, las investigaciones recomiendan incubación por 336 h, con el fin de que las cepas microbianas crezcan y la degradación de la mezcla de hidrocarburos sea patente (Gudiña *et al.*, 2013). Por este motivo y debido a la carencia de células, el periodo de incubación en este estudio fue de 24 h.

Una de las ventajas de usar el caldo libre de células es evitar el taponamiento de los poros de la roca almacenadora de petróleo. Su presencia podría causar un taponamiento ya que juntos con sus moléculas de superficie se encuentran adheridas al sustrato. El aumento de la biomasa celular crea una biopelícula que evita que más petróleo sea liberado dentro del reservorio (Patel *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2017; Safdel *et al.*, 2017).

Comparado con Gudiña *et al.*, (2013), cuyo % AOR más alto fue de 25.9 usando parafina viscosa, en este ensayo la recuperación fue de 29.2, haciendo uso de petróleo crudo pesado, lo cual pudo deberse a que los conductos del reservorio pueden obstruirse por otros productos de desecho del metabolismo microbiano, o por el crecimiento mismo de las células, como se dijo en un inicio. Sin embargo, Ashish (2018) empleó un aceite de motor usado y halló recuperación más altos, de 39.1, 40 y 40.3 mL a partir de *Candida tropicalis*, usando el caldo libre de células. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que el aceite de motor no contiene moléculas complejas como los asfaltenos que incrementan la viscosidad, y por lo tanto es menos complejo que el petróleo crudo. Sin embargo, *C. tropicalis* produce biosurfactantes de alto peso molecular, conocido como lipomanan (De La Rosa *et al.*, 2014; Sarubo *et al.*, 2022) y el ensayo llevado a cabo por Gudiña *et al.*, (2013) se trabajó con lipopéptidos. Lo que indica que pocos trabajos sobre recuperación mejorada de petróleo se han hecho hasta la fecha con *Klebsiella (Raoultella)* sp. Destacando a esta investigación en pionera con esta cepa microbiana. Sin embargo, Astuti *et al.*, (2019) trabajaron en un ensayo de recuperación con la cepa *Pseudoxanthomonas* sp. G3 usando columnas empacadas con arena, obteniendo un porcentaje de recuperación entre 38.46 – 42.11 %, es decir, entre un 23.9 % – 30.6 % más que en el porcentaje obtenido con *Raoultella planticola*. Y aunque no es el mismo microorganismo, ni siquiera el mismo género, sí es la misma clase de biosurfactante. *Pseudoxanthomonas* sp. G3 y *Raoultella planticola* producen glucolípidos. Empero, la capacidad de recuperación no está determinada por el biosurfactante *per se*, sino que también

depende de otros factores entre los que destacan: las características de la roca, las características del petróleo y el metabolismo microbiano, ya que algunas moléculas de biosurfactantes serán más activas que otras, aunque se trate del mismo tipo (Bachman *et al.*, 2014; Safdel *et al.*, 2017), lo cual deja abierta la posibilidad de realizar más investigación de los procesos de recuperación utilizando la cepa *Raoultella* sp. variando las fuentes de carbono y nitrógeno, así como los métodos de recuperación empleados.

3.1 CONCLUSIÓN

Se llevó a cabo la evaluación de la recuperación mejorada de petróleo a partir de la cepa bacteriana *Raoultella planticola*, haciendo uso de columnas empacadas con arena. Para lograr este objetivo se utilizó un petróleo crudo pesado con densidad API de 15.18. El AOR, fue de 29.2. Se usó el caldo libre de células, lo cual pudo haber contribuido a un mayor porcentaje de recuperación en comparación a columnas empacadas con arena que usaron el caldo con células. Se requieren estudios de MEOR en campos petroleros mexicanos porque los ensayos sólo se pueden aplicar en pozos específicos o en campos petroleros específicos (cuando se emplean consorcios que han sido aislados de varios pozos contiguos). La cepa bacteriana *Raoultella planticola* es buena candidata para uso en procesos de MEOR, empleando el caldo crudo libre de células.

3.1 REFERENCIAS

Ahmad Z. X., Imran H. Z., S. R. Zulekha, Ahmad G. I. & Coulon F. 2021. Production, functional stability, and effect of rhamnolipid biosurfactant from *Klebsiella* sp. on phenanthrene degradation in various medium systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 207. 111514. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111514>

Al-Ajlani, M. M., M. A. Sheikh, Z. Ahmad and S. Hasnain. 2007. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. *Microb Cell Fact* 6(17):1-8. DOI: 10.1186/1475-2859-6-17

Álvarez, J., V. Fernández, E. Macias, Y. Pignon, R. Rharbi and Gamez. 2009. Phase behavior studies of the pluronic P103/water system in the dilute and semidilute regimes. *Journal of colloids and interface Science*. (15): 665-662. doi: 10.1016/j.jcis.2009.01.068.

Ashish, M. D. 2018. Application of biosurfactant produced by an adaptive strain of *C. tropicalis* MTCC230 in microbial enhanced oil recovery (MEOR) and removal of motor oil

from contaminated sand and water. *Journal of Petroleum Science and Engineering* (170).40–48. DOI:10.1016/j.petrol.2018.06.034

Bachmann, R. T., A. Clemens J. and R. G.J. Edyvean. 2014. Biotechnology in the petroleum industry: An overview *International Biodeterioration & Biodegradation*. (86).225–237. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.09.011>

Birkle, P., J. J. Rosillo, A., E. Portugal and J. L. Fong A. 2002. Evolution and origin of deep reservoir water at the Activo Luna oil field, Gulf of Mexico, Mexico. *AAPG Bulletin*. 86(3):457–484. DOI:10.1306/61EEDB0C-173E-11D7-8645000102C1865D

Bordoloi, N. K. and B. K. Konwar. Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (63).73–82. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2007.11.006

Cooper, D. G. and Goldenberg, B. G. 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), 224–229. doi: 10.1128/aem.53.2.224-229.1987

Datta, P., P. Tiwari and L. M. Pandey. 2018. Isolation and characterization of biosurfactant producing and oil degrading *Bacillus subtilis* MG495086 from formation water of Assam oil reservoir and its suitability for enhanced oil recovery. *Bioresource Technology* (270). 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.047>

De la Rosa C. N. L., Sánchez E. S. & Ortiz-H. M. L. 2014. Biosurfactantes y su papel en la biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas. Revisión. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*. 5(1):47-67. DOI: 10.7603/s40682-014-0004-8.

Fooladi, T., N. Moazami, P. Abdesahian, A. Kadier, H. Ghojavand, W. M. Wan Yusoff and A. A. Hamid. 2016. Characterization, production and optimization of lipopeptide biosurfactant by new strain *Bacillus pumilus* 2IR isolated from an Iranian oil field. *Journal of Petroleum Science and Engineering* (145).510–519. DOI:10.1016/j.petrol.2016.06.015

Gao, H. H. Lai, J. Zhang and Q. Xue. 2017. Effects of bacterial cell density and alternating microbial- and enzymolysis-enhanced oil recovery on oil displacement efficiency. *Chemical Engineering Journal* (327).28–38. DOI:10.1016/j.cej.2017.06.083

Gaytán, I., M. Á. Mejía, R. Hernández-Gama, L. G. Torres, C. A. Escalante y A. Muñoz-Colunga. 2015. Effects of indigenous microbial consortia for enhanced oil recovery in a fragmented calcite rocks system. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. (128).65–72. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2015.02.028>

Ghribi, D. and S. Ellouze-Chaabouni. 2011. Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. *Biotechnology Research International*, 1 – 6 p
DOI: 10.4061/2011/653654

Gudiña, E. J., J. F.B. Pereira, R. Costa, J. A.P. Coutinho, J. A. Teixeira and L. R. Rodrigues. 2013. Biosurfactant-producing and oil-degrading *Bacillus subtilis* strains enhance oil recovery in laboratory sand-pack columns. *Journal of Hazardous Materials* (261):106– 113.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.071>

Hernández, R. M. A., U. M. Ojeda M. y A. Martínez M. 2019. Recuperación Mejorada de Petróleo Asistida por Microorganismos con Capacidad de Sintetizar Biosurfactantes. *Journal of Basic Sciences*, Vol. 5 (15), pp. 58-81, sep-dic 2019.
DOI: <https://doi.org/10.19136/jobs.a5n15.3569>

Heryani, H. and M. D. Putra. 2017. Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*. (27):49–54.
<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.03.005>

Hu, Y., Q. Zheng, S. Zhang, L. Noll and W. Wanek. 2018. Significant release and microbial utilization of amino sugars and D-amino acid enantiomers from microbial cell wall decomposition in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. (123):115–125.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.04.024>

Ibrahim, H. M. M. 2018. Characterization of biosurfactants produced by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 from used engine oil-contaminated soil. *Egyptian Journal of Petroleum* (27):21–29.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2016.12.005>

IMP. 2016. Tipos de Petróleo. Instituto Mexicano del Petróleo.
[<http://www.imp.mx/petroleo/?imp=tipos>].

Jahan, R., A. M. Bodratti, M. Tsianou and P. Alexandridis. 2020. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*. (275). 102061. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>

Jain, R. M., K. Mody, N. Joshi, A. Mishra and B. Jha. 2013. Production and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium, *Klebsiella* sp.: Evaluation of different carbon sources, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.03.002>

Jones, D. L., S.J. Kemmitt, D. Wright, S.P. Cuttle, R. Bol and A.C. Edwards. 2005. Rapid intrinsic rates of amino acid biodegradation in soils are unaffected by agricultural management strategy. *Soil Biology & Biochemistry* (37):1267–1275. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.11.023>

Joy, S., P. K. S. M. Rahman and S. Sharma. 2017. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Chemical Engineering Journal* (317):232–241. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.054>

Lee, J. and T. Babadagli. 2020. Comprehensive review on heavy-oil emulsions: Colloid science and practical applications. *Chemical Engineering Science*. Volume (228). 115962. DOI:10.1016/j.ces.2020.115962

Lee, K. S., T-H Kwon, T. Park and M. S. Jeon. 2020. Theory and Practice in Microbial Enhanced Oil Recovery. Gulf Professional Publishing. 1st Edition ISBN: 9780128204252 Paperback ISBN: 9780128199831

Liu, X., B. Ren, H. Gao, M. Liu, H. Dai, F. Song, Z. Yu, S. Wang, J. Hu, C. R. Kokare and L. Zhang. 2012. Optimization for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity. *PLoS One*. 7(5): 34430. doi: 10.1371/journal.pone.0034430

Madigan M., Martinko J., Dunlap P., & Clark D. 2017. Brock Biology of microorganisms. 13a. Edition. Pearson Higher education. Madrid, España. ISBN-13: 978-0-321-64963-8

Marques A. V., C. Reis G., D. Jureleviciusa, L. Vieira A. de C., J. Sampaio de Sousa, F. Faria da Mota, D. M. Guimarães F. and L. Seldin. 2020. Microbial enhanced oil recovery potential of surfactin-producing *Bacillus subtilis* AB2.0. *Fuel* (272):117730. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117730>

- Marques, A. V., D. Jurelevicius, J. Montezano M., P. Macedo de Souza, L. Vieira de raujo, T. Gonçalves B., R. O. Mendonça A., D. M. Guimarães F. and L. Seldin. 2015. *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for Microbial Enhanced Oil Recovery. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.08.046

Mondal, M.H., A. Sarkar, T. K. Maiti and B. Saha. 2017. Microbial assisted (*Pseudomonas* sp.) production of novel bio-surfactant rhamnolipids and its characterisation by different spectral studies. *Journal of Molecular Liquids* (242) 873–878. DOI:10.1016/j.molliq.2017.07.089

Nadkarni, R. A. Kihore. 2007. Guide to ASTM Test Methods for the Analysis of Petroleum

Oilfield review. Highlighting heavy oil. [<https://www.slb.com/-/media/files/oilfield-review/heavy-oil-2-english>] 2nd Edition ISBN 978-0-8031-4274-9

Patel, J., S. Borgohain, M. Kumar, V. Rangarajan, P. Somasundaran and R. Sen. 2015. Recent developments in microbial enhanced oil recovery. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. (52):1539–1558. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.135>

Qazi, M. A., M. Subhan, N. Fatima, M. I. Ali and S. Ahmed. 2013. Role of Biosurfactant Produced By *Fusarium* sp. BS-8 in Enhanced Oil Recovery (EOR) Through Sand Pack Column. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 3(6):598-604. DOI: 10.7763/IJBBB.2013.V3.284

Rangel, G. E. 2012. El futuro de la producción de aceite en México: Recuperación Avanzada y Mejorada. Comisión Nacional de Hidrocarburos (CNH). México. 123 pág.

Safdel, M., M. Amin Anbaz, A. Daryasafar and M. Jamialahmadi. 2017. Microbial enhanced oil recovery, a critical review on worldwide implemented field trials in different countries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (74):159–172. DOI: 10.1016/j.rser.2017.02.045

Saravanan, A., P. S. Kumar, K. H. Vardhan, S. Jeevanantham, S. B. Karishma, P. R. Yaashikaa & P. Vellaichamy. 2020. A review on systematic approach for microbial enhanced oil recovery technologies: Opportunities and challenges. *Journal of Cleaner Production*. 258. 120777. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120777>.

Sari, C. N., R. Hertadi, M. Gozan and A. M. Roslah. 2019. Factors Affecting the Production of Biosurfactants and their Applications in Enhanced Oil Recovery (EOR). A Review. *International Conference on Green Energy and Environment*. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science (353), 012048. DOI 10.1088/1755-1315/353/1/012048

Sarubbo, L. A., M. G. C. Silva, I. J. B. Durval, K. G. O. Bezerra, B. G. Ribeiro, I. A. Silva, M. S. Twigg & I. M. Banat. 2022. Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. *Biochemical Engineering Journal* 181. 108377. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377>.

Satter, A. and G. M. Iqbal. 2016. Cap 17. Enhanced oil recovery processes: thermal, chemical, and miscible floods. *Reservoir Engineering, The Fundamentals, Simulation, and Management of Conventional and Unconventional Recoveries*. DOI:10.1016/B978-0-12-800219-3.00017-6

Soares S., Almeida D., Mereida M. H., Silva E.J. 2017. Production and characterization of a new biosurfactant from *Pseudomonas cepacia* grown in low-cost fermentative medium and its

application in the oil industry. From the journal Biocatalysis and Agricultural Biotechnology
ISSN : 1878-8181 DOI:10.1016/j.bcab.2017.09.004

Souaya, E. R., S.A. El-kholy, A.M. Abd El-Rahman, M. Elshafie and Z.L. Abo-Shanab. 2012. Evaluation and application of surfactants synthesized from asphalt components. Egyptian Journal of Petroleum (21), 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2012.02.007>

Speight, J. 2016. Introduction to enhanced recovery methods for heavy oil and tar sands. Part I. Reservoirs and Reservoir Fluids. Second Edition. U.S.A Paperback ISBN: 9780128499061 eBook ISBN: 9780128018750

Speight, J. M. and N. S. Gengy. 2018. Introduction to Petroleum Biotechnology. Gulf Professional Publishing. 1st Edition Paperback ISBN: 9780128051511 eBook ISBN: 9780128052884

Strubinger, A., U. Ehrmann and V. León. 2012. Using the Gas Pycnometer to Determine API Gravity in Crude Oils and Blends. Energy and Fuels. x.doi.org/10.1021/ef301193x.

Suthar, H., K. Hingurao, A. Desai and A. Nerurkar. 2008. Evaluation of bioemulsifier mediated Microbial Enhanced Oil Recovery using sand pack column. Journal of Microbiological Methods (75) 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.06.007>

Tatar, A. 2018. Microbial Enhanced Oil Recovery: Microbiology and Fundamentals. In: A. Bahador. (comp.). Fundamentals of Enhanced Oil and Gas Recovery from Conventional and Unconventional Reservoirs. Gulf Professional Publishing. DOI:10.1016/B978-0-12-813027-8.00010-2

Varjani, S. J and E. Gnansounou. 2017. Microbial dynamics in petroleum oilfields and their relationship with physiological properties of petroleum oil reservoirs. S0960-8524(17)31333-0. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.028>.

Varjani, S. J. and V. N. Upasani. 2017. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. Bioresource Technology (232):389–397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.047>

Yefrenck Castro, Diego Sánchez, Alfredo Viloriab., 2019 Effect of mineral compounds of sands on acid gases generation at steam injection conditions 23-30 Revista INGENIERÍA UC Vol. 26, No 1 ISSN: 1316-6832

Zoua, C., M. Wang, Y. Xing, G. Lan, T. Ge, X. Yan, T. Gu. 2014. Characterization and optimization of biosurfactants produced by *Acinetobacter baylyi* ZJ2 isolated from crude oil-

contaminated soil sample toward microbial enhanced oil recovery applications. Biochemical Engineering Journal. (90):49–58. DOI:10.1016/j.bej.2014.05.007

CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo con los resultados y el posterior análisis de esta investigación, se identificaron cepas bacterianas capaces de sintetizar biosurfactantes, lo cual favorece a la industria petrolera, ya que estos microorganismos son capaces de mejorar el rendimiento en la extracción de petróleo crudo, ya que incluye pozos que han disminuido su producción como parte de un proceso natural de desgaste, e inclusive incluye pozos que han quedado en desuso después que la extracción de hidrocarburos ya no es rentable económicamente.

A través de una serie de pruebas bioquímicas se identificó la cepa bacteriana *Raoultella planticola* C3, la cual mostró la capacidad de sintetizar biosurfactantes glucolípidos con un rendimiento de 3.22 g/L en un medio mineral de uso industrial (nitrofoska), con una proporción C:N de 29.61

Para evaluar la eficiencia de recuperación de petróleo a través de los metabolitos secundarios de *Raoultella planticola* C3, se estableció una columna empacada con arena con un volumen de 250 mL. Para este ensayo se utilizó un petróleo crudo fracción pesada con una densidad API de 15.18. La recuperación fue de 29.2 mL.

En lugar de biosurfactante puro (cuyo valor en el mercado es bastante elevado, lo cual constituye su principal desventaja) se utilizó caldo bacteriano libre de células, influyendo de manera positiva en el proceso de recuperación. Luego de observar el comportamiento y eficiencia de *Raoultella planticola* C3, esta puede ser candidata para uso en procesos de recuperación de petróleo, empleando el caldo crudo libre de células que a nivel industrial podría abaratar los costos hasta en un 60%.