



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS

**“EFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-
LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIÓACTIVO
SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA”**

Trabajo recepcional bajo la modalidad de:

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO EN:

“MAESTRÍA EN CIENCIAS EN QUÍMICA APLICADA”

PRESENTA:

ING. JOSÉ DE LA LUZ SOLÍS CONTRERAS

DIRECTOR:

M.C. GUILLERMO CHÁVEZ HERNÁNDEZ

CO-DIRECTORA:

DRA. MARCIA EUGENIA OJEDA MORALES

FECHA: 12/01/2020





UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ciencias
Básicas



DIRECCIÓN

9 de enero de 2020

C. Jose de la Luz Solís Contreras
Pasante de la Maestría en Ciencias
en Química Aplicada
Presente.

Por medio del presente y de la manera más cordial, me dirijo a Usted para hacer de su conocimiento que proceda a la impresión del trabajo titulado **"Efecto en la mojabilidad de un sistema sólido-líquido producida por un tensioactivo sintetizado por una cepa fúngida petrofilica"**, en virtud de que reúne los requisitos para el EXAMEN PROFESIONAL POR TESIS DE MAESTRÍA para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Química Aplicada.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente.

Dr. Gerardo Delgadillo Piñón
Director



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS BÁSICAS

C.c.p.- Archivo
Dr'GDP/Dr'MAVR/emt

Miembro CUMEX desde 2008
Consortio de
Universidades
Mexicanas

UNA ALIANZA DE CALIDAD POR LA EDUCACIÓN SUPERIOR

Km.1 Carretera Cunduacán-Jalpa de Méndez, A.P. 24, C.P. 86690, Cunduacán, Tab., México.
Tel/Fax: (993) 3581500 Ext. 6701 E-Mail: direccion.dacb@ujat.mx
www.ujat.mx

Carta de Autorización

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, para que utilice tanto físico como digitalmente la tesis de maestría: **“efecto en la mojabilidad de un sistema sólido-líquido producido por un tensioactivo sintetizado por una cepa fúngica petrofilica”**, 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 de la tesis antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las Universidades que tengan 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 este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 12 días del mes de enero del año 2020.

Autorizó



Ing. José de la Luz Solís Contreras

ÍNDICE

Página

Contenido

Índice de figuras	vi
I. Introducción	x
II.I Objetivo General.....	xiii
II.I.I Objetivos específicos.....	xiii
II.II Hipótesis.....	xiii
Capítulo 1 Generalidades.....	1
1.1 Tensioactivos	1
1.2 Tipos de biotensioactivos	1
1.3 Clasificación de tensioactivos basados en cargas iónicas (Clint, 1992).....	2
1.3.1 Grupo hidrofílico	2
1.3.2 Aniónico	3
1.3.3 Catiónico.....	3
1.3.4 Tensioactivos zwitteriónicos (anfóteros).....	3
1.3.5 Tensioactivos no iónicos	3
1.3.6 Combinación.....	3
1.3.7 Grupo hidrofóbico	3
1.4 Biotensioactivos	3
1.5 Microorganismos que producen biotensioactivos	4
1.6 Clasificación de biotensioactivos basada en los microorganismos productores	5
1.6.1 Bacteria.....	5
1.6.2 Levadura	11
1.6.3 Hongos	13
1.7 Clasificación del biotensioactivo basado en la naturaleza química	16
1.7.1 Glicolípidos	16
1.7.2 Lipopéptidos y lipoproteínas	17
1.7.3 Ácidos grasos, fosfolípidos y lípidos neutros	17
1.7.4 Biotensioactivos poliméricos.....	18

1.7.5 Biotensioactivos particulados.....	18
1.8 Aplicación de biotensioactivos.....	19
1.8.1 Biotensioactivos en la industria alimenticia	19
1.8.2 Biotensioactivos en farmacia	19
1.8.3 Biotensioactivos en industrias de pesticidas	23
1.8.4 Biotensioactivos en la industria de cosméticos.....	23
1.8.5 Biotensioactivo en agentes terapéuticos	24
1.8.6 Biotensioactivos en procesos de biodegradación	24
1.8.7 Biotensioactivos en la industria petrolera	25
1.8.7.1 Biotensioactivos en la recuperación mejorada del petroleo	26
1.9 Tensión superficial	26
1.10 Concentración micelar crítica (CMC).....	27
1.11 Mojabilidad	28
1.12 Emulsificación de aceite en yacimiento.....	29
1.12.1 Estabilidad de emulsiones de aceite y agua.....	30
Capítulo 2 . Materiales y método.....	32
2.1 Caracterización del agua congénita	32
2.1.1 Análisis para determinación de la turbiedad de acuerdo a la norma NMX-AA-038-SCFI-2001	33
2.1.2 Análisis para determinar la ALCALINIDAD de acuerdo a la norma NMX-AA-036-SCFI-2001.....	33
2.1.3 Análisis para la determinación de cloruros totales de acuerdo a la norma NMX-AA-073-SCFI-2001.....	35
2.1.4 Análisis para la determinación de conductividad de acuerdo a la norma NMX-AA-093-SFCI-1986.....	36
2.1.5 Análisis para la determinación de pH de acuerdo a la norma NMX-AA-008-SCFI-2000.....	36
2.1.6 Análisis para la determinación de sólidos totales (ST) y sólidos suspendidos totales (SST) de acuerdo a la norma NMX-AA-034-SCFI-2015	37
2.1.7 Análisis para la determinación de grasas y aceites de acuerdo a la norma NMX-AA-005-SCFI-2013.....	38

2.2	Parámetros biológicos	39
2.2.1	Conteo de células viables por el método de vertido en placa por diluciones en serie (Madigan <i>et al.</i> , 2012).....	39
2.3	Obtención de microorganismos petrofílicos.....	40
2.3.1	Fase I. Supervivencia en medio sólido.....	40
2.3.2	Fase II.- Degradación de petróleo en suelo contaminado	41
2.3.2.1	Selección de medio mineral líquido.....	41
2.3.2.2	Bioensayo con biorreactores con sales minerales	42
2.3.2.3	Determinación de hongos petrofílicos	42
2.3.2.4	Ubicación y caracterización del suelo seleccionado para establecimiento de bioensayo	43
2.3.2.4.1	Obtención de la muestra para determinar propiedades físicas.....	43
2.3.2.4.2	Análisis físicos y químicos de las muestras de suelos	43
2.3.2.3	Bioensayo para la determinación de hidrocarburos	44
2.3.2.4	Determinación de hidrocarburos fracción pesada (HFP) en suelos por extracción y gravimetría, e hidrocarburos de fracción media (HFM) en suelos por cromatografía de gases con detector de ionización de flama	45
2.3.2.4.1	Hidrocarburos de fracción pesada.....	45
2.3.2.4.2	Hidrocarburos de fracción media.....	45
2.4	Identificación del género de las cepas fúngicas	46
2.5	Establecimiento de biorreactores para la producción de biotensioactivos	47
2.6	Inoculación de las cepas fúngicas en el medio productor de biotensioactivo...48	
2.7	Obtención de biotensioactivos puros.....	49
2.7.1	Filtración.....	49
2.7.2	Centrifugación	49
2.7.3	Primer lavado caldo-acetona.....	50
2.7.4	Segundo lavado: caldo-cloroformo-metanol.....	50
2.7.5	Obtención del biotensioactivo.....	51
2.8.	Identificación de lípidos polares asociados a la acción tensioactiva	51
2.8.1	Preparación de las soluciones para la identificación de lípidos polares	52
2.9	Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier (FT-IR)	53

2.10	Análisis elemental del biotensioactivo puro	54
2.11	Determinación de la tensión superficial del biotensioactivo puro	54
2.12	Determinación de la concentración micelar crítica (CMC).....	56
2.13	Determinación del ángulo de contacto del biotensioactivo	57
2.13.1	Alteración de la mojabilidad mediante el uso de un biotensioactivo en un sistema sólido-líquido.....	58
2.13.2	Limpieza de sustratos (láminas de vidrio)	58
2.13.3	Modificación de las superficies.....	58
2.13.4	Medidas de ángulo de contacto.....	59
	Capítulo 3 Resultados y discusiones.....	60
3.1	Caracterización de agua congénita	60
3.2.-	Obtención de células viables.....	60
3.2.1.-	Cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) totales del agua congénita.....	60
3.3	Determinación de microorganismos fúngicos petrofílicos.....	61
3.4	Determinación del medio de cultivo para la reproducción celular.....	63
3.5.-	Caracterización del suelo seleccionado para establecimiento de bioensayo y evaluación de hongos petrofílicos	65
3.5	Hidrocarburos de fracción pesada (HFP) en suelos en suelos por extracción y gravimetría	66
3.6	Hidrocarburos de fracción media (HFM) en suelos por cromatografía de gases con detector de ionización de flama	66
3.7	Identificación del género de las cepas fúngicas	69
3.8	Identificación de lípidos polares asociados a la acción tensioactiva.	70
3.9	Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier (FT-IR).	71
3.10	Análisis elemental de los biotensioactivos fúngicos	72
3.11	Determinación de la tensión superficial	73
3.12	Concentración micelar crítica (CMC).....	74
3.13	Determinación del ángulo de contacto del biotensioactivo	75
3.13.1	Preparación de las superficies	75
3.13.2	Medición de los ángulos de contacto después de la aplicación del OTS ...	75

Capítulo 4 Conclusiones 82
Capítulo 5 Referencias 83

Índice de figuras

Capítulo 1

Fig. 1. 1 Ubicación de la molécula de tensioactivo en la interfase (Riojas <i>et al.</i> , 2010).	2
Fig. 1. 2 Tabla de bacterias productores de biotensioactivo:	8
Fig. 1. 3 Tabla de levaduras productoras de biotensioactivos:	12
Fig. 1. 4 Tabla de hongos productores de biotensioactivo:	13
Fig. 1. 5 Diagrama esquemático de la variación de la tensión superficial, interfacial y la solubilidad del contaminante con la concentración del tensioactivo (Mulligan <i>et al.</i> , 2001)	27
Fig. 1. 6 Representación esquemática en el arreglo de las moléculas de tensoactivo alrededor de la concentración micelar crítica (CMC) (Jiménez <i>et al.</i> , 2010).	27
Fig. 1. 7 Diagrama del ángulo de contacto	28

Capítulo 2

Fig. 2. 1 Muestra de agua congénita	32
Fig. 2. 2 Turbidímetro HANNA MODELO 93414	33
Fig. 2. 3 Titulación con HCL y naranja de metilo	34
Fig. 2. 4 Preparacion de disoluciones	35
Fig. 2. 5 Titulacion con nitrato de plata	35
Fig. 2. 6 Conductímetro marca HANNA modelo HI8633	36
Fig. 2. 7 Conductímetro marca HANNA modelo HI8633	37
Fig. 2. 8 Determinación de viables por el método de placa utilizando diluciones seriadas (Madigan <i>et al.</i> , 2012).	40
Fig. 2. 9 Metodo de sacabocado (Ojeda <i>et al.</i> , 2009)	40
Fig. 2. 10 Aislamiento en agar bacteriologico	40
Fig. 2. 11 Se prepararon soluciones de BaCl ₂ y H ₂ SO ₄ . La turbidez medida en un espectrofotómetro UV-VIS a 600 nm	41
Fig. 2. 12 Diseño experimental de biorreactores con medio mineral líquido	42
Fig. 2. 13 Tamizado y triturado de suelo	44
Fig. 2. 14 Biorreactores con nitrofoska	44
Fig. 2. 15 Sonicacion del suelo con n-hexano y cepas fúngicas	45

Fig. 2. 16 Suelo contaminado con petróleo y cepas fungicas	45
Fig. 2. 17 Viales color ambar	46
Fig. 2. 18 Cromatografo de gases Marca Shimadzu Modelo GC-2010 plus	46
Fig. 2. 19 Microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6010LA..	46
Fig. 2. 20 Representación del biorreactor utilizado para la producción del biotensoactivo (Ojeda <i>et al.</i> , 2016)	47
Fig. 2. 21 Medio de cultivo Wunder (T. Wunder <i>et al.</i> , 1997)	48
Fig. 2. 22 Medio de cultivo después de la fermentación	48
Fig. 2. 23 Filtrado de la biomasa microbiana	49
Fig. 2. 24 Centrifugado del caldo microbiano.....	50
Fig. 2. 25 Separacion de residuos no tensioactivos.....	50
Fig. 2. 26 Adicion de la acetona al caldo	50
Fig. 2. 27 Separación de fases por diferencias de densidades.....	51
Fig. 2. 28 Biotensoactivos purificados.....	51
Fig. 2. 29 Extraccion de biotensoactivos.....	51
Fig. 2. 30 Soluciones reveladoras: glicolípidos, lipopéptidos y fosfolípidos.....	53
Fig. 2. 31 Espectrómetro FT-IR Shimadzu	53
Fig. 2. 32 Microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6010LA..	54
Fig. 2. 33 Vista transversal del plato mojado (Álvarez, 2009)	55
Fig. 2. 34 Tensiómetro digital Krüss modelo K 10 ST (Álvarez, 2009)	56
Fig. 2. 35 Concentración micelar critica de un tensioactivo (Alvarez <i>et al.</i> , 2011)..	57
 Capitulo 3	
Fig. 3. 1 Tabla de resultados de análisis de agua congénita	60
Fig. 3. 2 Cepas fúngicas obtenidas de diluciones -1, ..., -6.....	61
Fig. 3. 3 Crecimiento de microorganismos en medio sólido agar microbiológico con petróleo como única fuente de carbono.....	62
Fig. 3. 4 Cepas fúngicas inoculadas y expresadas después de 72 horas	62
Fig. 3. 5 Gráfica que representa las UFC de las tres cepas fúngicas con respecto al tiempo	63

Fig. 3. 6 Gráfica que representa el crecimiento de UFC de la CEPA H1 con los tres diferentes fertilizantes	64
Fig. 3. 7 Gráfica que representa el crecimiento de UFC de la CEPA H2 con los tres diferentes fertilizantes	64
Fig. 3. 8 Gráfica que representa el crecimiento de UFC de la CEPA H5 con los tres diferentes fertilizantes	64
Fig. 3. 9 Caracterización del suelo de Jalpa de Méndez, Tabasco	65
Fig. 3. 10 Degradación de hidrocarburos fracción pesada	66
Fig. 3. 11 Degradación de hidrocarburos fracción media de la cepa H1 <i>Aspergillus sp.</i>	67
Fig. 3. 12 Degradación de hidrocarburos fracción media de la cepa H2 <i>Aspergillus sp.</i>	68
Fig. 3. 13 Degradación de hidrocarburos fracción media de la cepa H5 <i>Penicillium sp.</i>	68
Fig. 3. 14 Degradación de hidrocarburos fracción media del suelo testigo	69
Fig. 3. 15 Cepa H1: <i>Aspergillus sp.</i>	69
Fig. 3. 16 Cepa H2: <i>Aspergillus sp.</i>	70
Fig. 3. 17 Cepa H5: <i>Penicillium sp.</i>	70
Fig. 3. 18 Detección de lipopéptidos asociados con actividad tensioactivas de las cepas H1 (<i>Aspergillus sp.</i>) (a), H2 (<i>Aspergillus sp.</i>) (b) y H5 (<i>Penicillium sp.</i>) (c)	71
Fig. 3. 19 FT-IR de las tres muestras de biotensioactivos fungicos	72
Fig. 3. 20 Analisis elemental de las muestras de los tres biotensioactivos	72
Fig. 3. 21 Tensión superficial en función de la concentración de biotensioactivo en agua, medida a 30°C. Biotensioactivo producido por la cepa H1 (<i>Aspergillus sp.</i>)	73
Fig. 3. 22 Tensión superficial en función de la concentración de biotensioactivo en agua, medida a 30°C. Biotensioactivo producido por la cepa H2 (<i>Aspergillus sp.</i>)	74
Fig. 3. 23 Tensión superficial en función de la concentración de biotensioactivo en agua, medida a 30°C. Biotensioactivo producido por la cepa H5 (<i>Penicillium sp.</i>)	74
Fig. 3. 24 Cambios en la mojabilidad de las láminas de vidrio tratadas con el OTS y sumergidas en agua destilada, con tiempo de inmersión de 5 min y con diferentes emulsiones de biotensioactivo H1	76

Fig. 3. 25 Cambios en la mojabilidad de las láminas de vidrio tratadas con el OTS y sumergidas en agua destilada, con tiempo de inmersión de 5 min y con diferentes emulsiones de biotensioactivo H2..... 77

Fig. 3. 26 Cambios en la mojabilidad de las láminas de vidrio tratadas con el OTS y sumergidas en agua destilada, con tiempo de inmersión de 5 min y con diferentes emulsiones de biotensioactivo H5..... 78

Fig. 3. 27 Cambios en la mojabilidad de las láminas de vidrio tratadas con el OTS y sumergidas en agua destilada, con tiempo de inmersión de 5 min y con diferentes emulsiones de tensioactivo ANIÓNICO 79

Fig. 3. 28 Cambios en la mojabilidad de las láminas de vidrio tratadas con el OTS y sumergidas en agua grado HPLC, con tiempo de inmersión de 5 min y con diferentes emulsiones de tensioactivo NO IÓNICO..... 80

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

I. Introducción

Las estrategias de producción de petróleo tradicionalmente consisten en un agotamiento primario seguido por una recuperación secundaria y, en algunos casos, procesos de recuperación terciaria. En la recuperación primaria, el aceite inicial se extrae bajo presión natural y, a menudo, solo recupera el 10-20 % del aceite original en su lugar (Elraies y Tan, 2012; Bachmann *et al.*, 2014). Cuando los rendimientos de petróleo caen debido a reducciones de presión naturales en los reservorios, las tecnologías de recuperación secundaria se utilizan a través de inyección de agua y / o gas. La recuperación secundaria puede llevar a un aumento de la recuperación total hasta un 40–50 % de factor de recuperación (Martinez, 2014). Aproximadamente la mitad del petróleo en el depósito permanece atrapado en pequeños poros de la formación de roca. La pobre eficiencia de desplazamiento se atribuye a las altas fuerzas de capilaridad debidas a las fuerzas superficiales e interfaciales, las fuerzas de viscosidad y las heterogeneidades del yacimiento (Elraies y Tan, 2012; Herrera Silva *et al.*, 2013.).

La creciente demanda mundial de tecnologías sostenibles que mejora la eficiencia de los procesos petroquímicos en la industria del petróleo ha impulsado avances en la biotecnología del petróleo en los últimos años. La industria del petróleo utiliza cantidades sustanciales de tensioactivos sintéticos de base petroquímica en sus actividades como agentes movilizadores para aumentar la disponibilidad o recuperación de hidrocarburos, así como muchas otras aplicaciones relacionadas con la extracción, tratamiento, limpieza y transporte (Cantarero, 2010). Sin embargo, los biotensioactivos tienen varias aplicaciones potenciales para su uso a través de la cadena de procesamiento de aceite y en las formulaciones de productos petroquímicos como agentes emulsionantes / desemulsionantes, anticorrosivos, biocidas para bacterias reductoras de sulfato, formulación de combustible, extracción de betún de arenas bituminosas y muchas otras aplicaciones innovadoras. Debido a su versatilidad y eficacia probada, los biotensioactivos se presentan a menudo como valiosas herramientas versátiles que pueden transformar y modernizar la biotecnología del petróleo en un intento por

proporcionar una imagen real del estado de la técnica y las direcciones o el uso en la industria petrolera. (De Almeida *et al.*, 2016)

La recuperación mejorada del petróleo, (MEOR por sus siglas en inglés) es la recuperación mejorada de petróleo en la que se usan microorganismos o sus productos metabólicos para mejorar la recuperación del aceite residual. Por lo general, es menos costoso cuando se compara con la recuperación de petróleo mejorada químicamente, particularmente cuando se usan microorganismos para producir suficientes productos como polímeros y biotensioactivos que comienzan con materias primas de sustratos de bajo costo (Sarafzadeh *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014). Los biotensioactivos mejoran principalmente la movilización de hidrocarburos, mejorando así la recuperación de petróleo crudo de los reservorios (Perfumo *et al.*, 2010).

Los biotensioactivos se producen principalmente mediante cultivos microbianos que crecen en sustratos inmiscibles en agua, que permite el acceso a estos sustratos hidrófobos (como hidrocarburos) y se clasifican generalmente en moléculas de baja masa molecular (lipopéptidos, glicolípidos) y tensioactivos poliméricos de altas masa moleclar (polímeros y partículas) (Kapadia y Yagnik, 2013)

Existen fuerzas que afectan el comportamiento de los hidrcarburos dentro del yacimiento en diferentes maneras, por ejemplo, una roca mojada por agua puede ser limpiada, secada y completamente saturada con un alcano, mientras las superficies de los poros permanecen mojados por agua. Dejar caer un núcleo saturado de petróleo, pero mojado por agua en un recipiente con agua, de manera espontánea absorberá una cantidad significativa de agua y el aceite saldrá expulsado (Francisca, 2001).

Un yacimiento es una estructura compleja, que está formado por una gran variedad de minerales. Cada mineral tiene una mojabilidad diferente, que hace que el comportamiento de la mojabilidad de la roca sea difícil de describir. Por lo general, el componente principal de los depósitos, cuarzo, carbonato y dolomita, son mojables por agua antes de la migración de aceite (Abdallah, 2007).

Esta tesis presenta los efectos de mojabilidad de un sistema solido-liquido que asemeja las características de formación, producidas por tres biotensioactivos de

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN
TENSIOLACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

origen fúngico, mediante la realización de las mediciones experimentales del ángulo de contacto así como la caracterización de los biotensioactivos.

II. Objetivos e Hipótesis

II.I Objetivo General

Evaluar la mojabilidad de una superficie sólida a través del ángulo de contacto del sistema sólido-líquido producida por un tensioactivo sintetizado por una cepa fúngica, petrofílica y autóctona del estado de Tabasco que pueda incrementar la fracción recuperada de petróleo.

II.I.I Objetivos específicos

- 1.- Obtener cepas fúngicas petrofílicas nativas del estado de Tabasco con capacidad de sintetizar biotensioactivos.
- 2.- Caracterizar en *condiciones in vitro* un biotensioactivo producido por una cepa fúngica petrofílica a través de sus propiedades de superficie, termodinámicas, fisicoquímicas.
- 3.- Evaluar la eficiencia en la mojabilidad del biotensioactivo sobre una superficie sólida con características de yacimientos a través del ángulo de contacto.

II.II Hipótesis

Un tensioactivo sintetizado por una cepa fúngica nativa del estado de Tabasco, tiene la capacidad de aumentar la mojabilidad en la interface sólido-líquido.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Capítulo 1 Generalidades

1.1 Tensioactivos

Los tensioactivos son compuestos que se concentran o acumulan en la interface entre dos medios, alterando la tensión superficial. Los tensioactivos poseen una constitución molecular típica, esencialmente lineal y asimétrica, con dos zonas, una hidrófoba y otra hidrófila manteniéndose principalmente en la interface aceite/agua o aire/agua. Si el tensioactivo está dentro de la fase acuosa su grupo polar puede estar rodeado de moléculas de agua (solvatación). Si el tensioactivo está disuelto en una fase oleica, su grupo polar posee interacciones con el solvente (Bernabé, 2007; Riojas *et al.*, 2010).

1.2 Tipos de biotensioactivos

Existen dos tipos de tensioactivos de modo general, los químicos o sintéticos, y los naturales o biológicos, generados estos últimos por algunos microorganismos, en este caso, se les denomina biotensioactivos (Qiao y Shao, 2010; Jadhav *et al.*, 2011). Tanto los tensioactivos químicos como los biotensioactivos incrementan la solubilidad de los compuestos orgánicos hidrofóbicos adsorbidos (COHs) a través de una fase micelar (hidrofílica/hidrofóbica), la cual propicia la desorción de los contaminantes del suelo hacia la fase líquida. Así se logra un incremento en la biodisponibilidad de los COHs (Velasco y Volke, 2003). Los tensioactivos mejoran la absorción y biodisponibilidad de los hidrocarburos al aumentar su solubilidad y la dispersión (Chozo *et al.*, 2017).

Los tensioactivos inducen una emulsión en la interfase agua-aceite. La emulsión permite la dispersión termodinámica inestable de dos o más líquidos inmiscibles, o parcialmente miscibles (Coutinho *et al.*, 2013). Aunque se trate de dispersiones termodinámicamente inestables, las emulsiones pueden convertirse en cinéticamente estables, gracias a la presencia de agentes tensioactivos que presentan la capacidad de absorción en las superficies de las gotas (Laurencio-Alfonso y Delgado-Drubey, 2008). En la mayoría de las emulsiones, una de las fases es acuosa y la otra es un aceite polar. Las emulsiones con el aceite como fase dispersa se conocen como emulsiones de aceite en agua (oil-in-water, o/w) y las

emulsiones con agua como fase dispersa se conocen como emulsiones de agua en aceite (water-in-oil, w/o) (Aranberri *et al.*, 2006).

Los tensioactivos combinan una molécula fuertemente hidrofóbica con un grupo fuertemente hidrofílico (Khoshsima y Dehghani, 2016), con ello se adhieren en la interfase entre un medio acuoso y otra fase que puede ser aire, aceite o partículas (Fig. 1.1). Si el tensioactivo está dentro de la fase acuosa, su grupo polar puede estar rodeado de moléculas de agua (solvatación). Si el tensioactivo está disuelto en una fase oleica, su grupo apolar posee interacciones con el solvente (Celik *et al.*, 2008). El grupo hidrofóbico por lo regular es un hidrocarburo (R) con 10 o 20 carbonos (Jiménez, 2001). Esta afinidad por las interfaces hidrófobo con lo apolar e hidrófilo con lo polar, es lo que le otorga sus principales características: disminuir la tensión superficial y aumentar la solubilidad (Raiger y López, 2009).

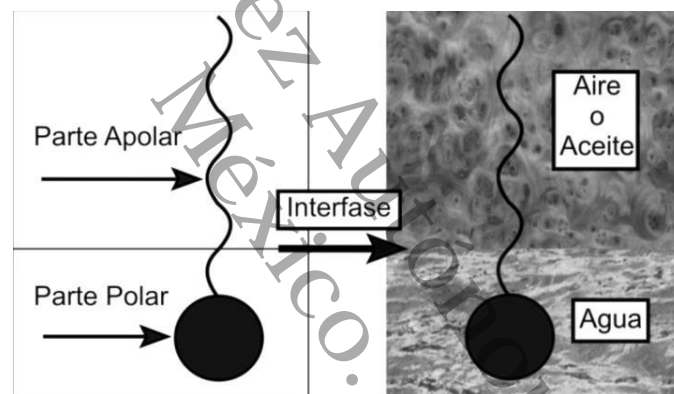


Fig. 1. 1 Ubicación de la molécula de tensioactivo en la interfase (Riojas *et al.*, 2010).

1.3 Clasificación de tensioactivos basados en cargas iónicas (Clint, 1992)

Los tensioactivos sintetizados químicamente se clasifican generalmente en función del tipo de grupo polar.

1.3.1 Grupo hidrofílico

El grupo hidrofílico de un tensioactivo generalmente se conoce como el "grupo de cabeza" y es cualquiera fuertemente polar o cargado.

1.3.2 Aniónico

Estos incluyen los jabones tradicionales y los primeros detergentes sintéticos, tales como sulfonatos y sulfatos.

1.3.3 Catiónico

Estos son generalmente compuestos de amonio cuaternario, imidazolinio o alquilpiridinio.

1.3.4 Tensioactivos zwitteriónicos (anfóteros)

Estos se usan en forma de betaínas o sulfobetaínas. Estos compuestos son más suaves en la piel que los aniónico y tiene un efecto ocular especialmente bajo por lo que estos se utilizan en los baños y champús de bebé.

1.3.5 Tensioactivos no iónicos

Estos generalmente están dominados por etoxilatos. Esta clase de tensioactivos también incluyen varios semi compuestos polares tales como óxidos de amina, sulfóxido y óxidos de fosfolina.

1.3.6 Combinación

Estos tipos suelen contener grupos no iónicos y aniónicos, como alquil etoxisulfatos. Este tensioactivo es suave para la piel y no se puede evitar el contacto con la piel, como lavar la vajilla y champús líquidos.

1.3.7 Grupo hidrofóbico

Estos tipos de tensioactivos generalmente se llaman "cola" y son principalmente un simple grupo de hidrocarburos

1.4 Biotensioactivos

Los avances tecnológicos sostenibles han llevado al descubrimiento de tensioactivos de origen natural. Muchos de estos tensioactivos son sintetizados por microorganismos vivos, tales como las saponinas producidas por las plantas, glicolípidos producidos por microorganismos y sales biliares producidas por los

animales. Los compuestos con propiedades tensioactivas producidos por microorganismos son denominados biotensioactivos (Aparna *et al.*, 2011 y Souza *et al.*, 2014).

Los biotensioactivos son principalmente producidos por microorganismos aeróbicos en un medio acuoso con una fuente de carbono como materia prima, tales como los carbohidratos, hidrocarburos, grasas y aceites. Se cree que los biotensioactivos son secretados en un medio de cultivo que ayude en el crecimiento de microorganismos por la facilitación de translocación de membranas celulares a través de sustratos insolubles (Campos *et al.*, 1998). Los biotensioactivos generalmente son clasificados en moléculas de baja masa molecular que eficientemente bajan la tensión superficial y la tensión interfacial, y polímeros de altas masas moleculares, que son más efectivos como agentes estabilizantes de emulsión. Las mejores clases de biotensioactivos de bajos pesos moleculares son los glicolípidos, lipopéptidos, y fosfolípidos, mientras que los tensioactivos de alto peso molecular incluyen biotensioactivos poliméricos y particulados (Kapadia *et al.*, 2013).

1.5 Microorganismos que producen biotensioactivos

Una serie de microorganismos, como hongos, levaduras y bacterias, se alimentan de sustancias que son inmiscibles en agua, produciendo y usando una sustancia de superficie activa (biotensioactivos) (Banat *et al.*, 2010 y Sobrinho *et al.*, 2013).

Entre las bacterias, el género *Pseudomonas* es conocido por su capacidad para producir cantidades de glicolípidos. Estos biotensioactivos se clasifican como *Rhamnolípidos*. Los *Bacillus subtilis* son otros microorganismos ampliamente estudiados para la producción de biotensioactivos y son conocidos por su eficiencia en la producción de lipopéptidos con actividad superficial denominado surfactina o subtilisina (Lu *et al.*, 2007; Aparna, 2011; Al-Bahry *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2014). La *Candida bombicola* y *Candida lipolytica* se encuentran entre las levaduras más comúnmente estudiadas para la producción de biotensioactivos (Campos, 2013). Un factor clave que gobierna el éxito de la producción de biotensioactivos es el desarrollo de un proceso económico que utiliza materiales de bajo costo y ofrece un

alto rendimiento. De hecho, la elección de un bajo costo en el sustrato es importante para la economía general, ya que el sustrato representa hasta el 50 % del costo de producción. Afortunadamente, los biotensioactivos se pueden producir con recursos económicos y renovables, tales como aceites vegetales, destilería y desechos lácteos (Rufino *et al.*, 2014).

1.6 Clasificación de biotensioactivos basada en los microorganismos productores

Los biotensioactivos son producidos por diversos grupos de microorganismos principalmente bacterias, levaduras y hongos. La cantidad de producción de biotensioactivo depende principalmente del tipo de microorganismo y sus fuentes. Muchos microorganismos utilizados para la aplicación industrial, para la eliminación de productos de desecho se han aislado de suelos contaminados, efluentes y punto de descarga de las fuentes de aguas residuales. Por lo tanto, estos tienen la capacidad de crecer en sustratos considerados potencialmente nocivos para otros microorganismos que no producen biotensioactivos. Hay gran variedad de biotensioactivos microbianos disponibles. Su tipo, cantidad y la calidad está influenciada principalmente por la naturaleza del sustrato de carbono (Georgiou *et al.*, 1992), y la concentración de iones de nitrógeno, fósforo, magnesio, hierro y manganeso en el medio (Guerra-Santos *et al.*, 1986; Haferburg *et al.*, 1986; Abu-Ruwaida *et al.*, 1991) y condiciones de cultivo, que incluyen pH, temperatura, agitación y velocidad de dilución, etc. (Guerra-Santos *et al.*, 1986; Abu-Ruwaida *et al.*, 1991a; Drouin y Cooper, 1992; Lin *et al.*, 1994). La selección de microorganismos para el uso de recuperación mejorada del petróleo se basa en la variación de las condiciones que utilizan, como temperatura, presión, pH y salinidad, deben tener prioridad (Khire *et al.*, 1994).

1.6.1 Bacteria

Las bacterias juegan un papel importante en la producción de biotensioactivos. *Pseudomonas* es el género dominante involucrado en la producción de biotensioactivo seguido de otras especies que se presentan en la Fig. 1.2 Coelho *et al.*, (2003) informaron la producción de biotensioactivos por *Pseudomonas* sp. cepa

GU 104 de la quinolina marina degradada. Hay un solo informe adicional disponible en polímero biotensioactivos que producen la cepa *Pseudomonas nautica* que se aisló de una zona costera del mar Mediterráneo (Husain *et al.*, 1997) e informó sobre la producción de biotensioactivos extracelulares que exhiben actividad emulsionante. Dependiendo del tipo diferente de fuente de carbono e hidrocarburos, diferentes tipos de emulsionantes son producidos por microorganismos. Este hecho está bien demostrado por Desai *et al.*, (1988) para la producción de trehalosa lípido-o-dialquilo emulsionante de monoglicéridos y proteínas por degradación de hidrocarburos *Pseudomonas fluorescens*.

Bacillus sp., es principalmente conocido por la producción de lipopéptidos, lichenysin, surfactin, complejo de proteínas lipídicas y subtilisina de los diferentes ecosistemas marinos. Jenneman *et al.*, (1983) aislaron *Bacillus licheniformis* JF2 que tenía tanto termotolerantes como halotolerantes característica que fue útil para la recuperación microbiana mejorada de petróleo *in situ*. Makkar y Cameotra (1997) seleccionaron más de 22 microorganismos por su capacidad de sintetizar biotensioactivos en condiciones termófilas, y solo dos cepas de *Bacillus subtilis*.

Acinetobacter sp., es de naturaleza omnipresente y es uno de los casos de bacterias comúnmente disponibles de gram negativas en ambientes marinos. Debido a su naturaleza versátil, la *Acinetobacter sp.*, ha atraído considerable atención por parte de muchos investigadores. Además del entorno marino a número de otras fuentes también se han estudiado en gran detalle (Patil y Chopade, 2003).

La *Acinetobacter sp.*, juega un papel importante en la degradación de hidrocarburos (Juni, 1978) y tiene un papel clave en los procesos de biorremediación (MacCormack y Fraile, 1997). La *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, se aisló del mar mediterráneo (Reisfeld *et al.*, 1972) y se encontró que producía un tensioactivo que ha sido explotado comercialmente como el producto 'Emulsan' (Nerurkar *et al.*, 2009). La *Acinetobacter calcoaceticus* es una buena lanza activa para las bacterias productoras de tensioactivos.

Rhodococcus sp., es conocido por la producción de moléculas activas de superficie de glicolípidos. Peng *et al.*, (2007) aislaron una bacteria degradadora de aceite; *Rhodococcus erythropolis* cepa 3C-9 del mar al lado de la Isla de Xiamen, ubicado en la orilla oeste del estrecho de Taiwán. Diferentes tipos de

biotensioactivos como glicolípidos, polisacáridos, ácidos grasos libres y dicorinomicolato de trehalosa son producidos por *Rhodococcus erythropolis* (Shulga *et al.*, 1990) y *Rhodococcus sp.*, (Neu *et al.*, 1990; Singer y Finnerty, 1990; Neu *et al.*, 1992).

Halomonas sp., es principalmente conocido por la producción de sustancia polimerica extracelular (EPS) con propiedades emulsionantes. Existen pocos informes que sugieren que los agentes activos de superficie emulsionantes también son producidos por *Halomonas sp.*, (Juni, 1978). Una cepa bacteriana, *Halomonas* ANT-3b se aisló del hielo marino, interfaz de agua de mar en la estación terra nova bay, mar de Ross, Antártida que produce emulsificantes glicolípidos. El bioemulsificador basado en glicoproteína (proteína y ácidos urónicos) también es producido por *Halomonas sp.*, y han sido caracterizados química y físicamente por Pepi *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2007.

Myroide es una bacteria aeróbica, gram negativa, no móvil, con forma de varilla pigmentada usualmente se encuentra en el ecosistema marino. La mayoría del trabajo llevado a cabo en la producción de bioemulsificadores *Myroides sp.*, SM1 que se aisló del agua de mar derramada por el petróleo en el lago Songkhla, Tailandia (Maneerat *et al.*, 2004). *Myroides sp.*, SM1 crece bien, emulsionando crudo desgastado y produce un bioemulsificador extracelular (complejo de L-ornitina, lípidos-L-ornitina y una diferente pareja de ácido graso iso-3-hidroxi y ácido iso-graso) que posee alta superficie actividad para el desplazamiento del aceite en comparación con otros tensioactivos (Maneerat *et al.*, 2006). El bioemulsionante de un entorno extremo muestra una mayor estabilidad a una temperatura de amplio rango. Sin embargo, sus actividades de emulsificación disminuyen rápidamente a pH extremo y alto contenido de concentración de sal (Maneerat y Phetrong, 2007). Las moléculas asociadas a la superficie activa de la célula de *Myroides sp.*, posee una alta actividad de emulsificación adhiriéndose al petróleo crudo degradado (Maneera y Dikit, 2007).

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

Fig. 1. 2 Tabla de bacterias productores de biotensioactivo:

No.	Microorganism's	Biosurfactants	References	Tensión Superficial (mN/m)	CMC (mg/L)
1.	<i>Pseudomonas</i> sp.	Ornithine lipids	(Desai and Banat, 1997)		
2.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Viscosin	(Banat <i>et al.</i> , 2010)	26.5	15
3.	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Rhamnolipids	(Jadhav <i>et al.</i> , 2011)	25-31	1-20
4.	<i>Pseudomonas marginilis</i> , <i>Pseudomonas maltophilia</i>	Vesicles & fimbriae	(Choi <i>et al.</i> , 1996)		
5.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rhamnolipid	(Robert <i>et al.</i> , 1989)	29	
6.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipopeptide	(Neu <i>et al.</i> , 1990)		
7.	<i>Pseudomonas nautical</i>	Proteins, carbohydrates and lipids	(Husain <i>et al.</i> , 1997)		
8.	<i>Pseudomonas fluorescence</i>	Trehalose lipid-o-dialkyl, Monoglycerides protein	(Desai <i>et al.</i> , 1988)		
9.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Protein PA	(Hisatsuka <i>et al.</i> , 1971)		
10.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Carbohydrate-lipid Complex	(Nerurkar <i>et al.</i> , 2009)	27	10
11.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rhamnolipid	(Becerra <i>et al.</i> , 2016)	27.2	
12.	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Rhamnolipid	(Becerra <i>et al.</i> , 2016)	48.3	
13.	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rhamnolipid	(Becerra <i>et al.</i> , 2016)	52.6	
14.	<i>Azospirillum brasilense</i>	Lipopeptide	(Ojeda <i>et al.</i> , 2015)	38	0.12
15.	<i>Azospirillum lipoferum</i>	lipopeptide	Ojeda <i>et al.</i> , 2015)	35	0.25

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

16.	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Surfactin/Iturin	(Arguelles-Arias <i>et al.</i> , 2009)	27-32/ 37.5	23-160
17.	<i>Bacillus subtilis</i>	Subtilisin	(Sutyak <i>et al.</i> , 2008)		
18.	<i>Bacillus sp.</i>	Amino acids-lipids	(Cotter <i>et al.</i> 1990)		
19.	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Lichenysin	(Yakimov <i>et al.</i> 1997)		
20.	<i>Bacillus licheniformis</i>	Peptide lipids	(Begley <i>et al.</i> 2009)	27	12-20
21.	<i>Bacillus licheniformis</i> JF-2	Lipopeptides	(McInerney <i>et al.</i> 1990)	27	0.02-10
22.	<i>Bacillus licheniformis</i> 86	Lipopeptides	(Horowitz <i>et al.</i> 1990)	27	10
23.	<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactin	(Arima <i>et al.</i> 1968)	27-32	23-16
24.	<i>Bacillus pumilus</i> A1	Surfactin	(Morikawa <i>et al.</i> 1982)		
25.	<i>Bacillus sp.</i> AB-2	Rhamnolipids	(Banat, 1993)	27-29	
26.	<i>Bacillus sp.</i> C-14	Hydrocarbon-lipid-protein	(Eliseev <i>et al.</i> 1991)		
27.	<i>Acinetobacter sp.</i>	Phospholipids	(Kosaric, 2001)		
28.	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Vesicles & fimbriae	(Choi <i>et al.</i> 1996)		
29.	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Emulsan	(Barkay <i>et al.</i> 1999)		
30.	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Alasan	(Limade <i>et al.</i> 2009)		

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

31.	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG1	Emulsan	(Belsky et al. 1979; Gutnick and Shabtai, 1987; Zosim et al. 1982; Rosenberg et al. 1979, 1988a,b,1989)		
32.	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A2	Biodispersion	(Rosenberg and Kaplan, 1987)		
33.	<i>Acinetobacter Radioresistens</i>	Alasan	(Navon-Venezia et al. 1995)		
34.	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BD4	BD4 emulsan	(Kaplan et al. 1987)		
35.	<i>Antarctobacter</i>	High-molecular-weight glycoprotein with high Uronic acids	(Calvo et al. 1998; Gutiérrez et al. 2007b)		
36.	<i>Agrobacterium</i> sp.	Ornithine lipids	(Desai and Banat, 1997)		
37.	<i>Arthrobacter</i> MIS 38	Lipopeptide	(Morikawa et al. 1993)	24	5
38.	<i>Arthrobacter</i> sp.	Trehalose, Sucrose & Fructose lipid	(Suzuki et al. 1974; Itoh and Suzuki, 1974)		
39.	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Trehalose dicorynomycolate	(Shulga et al.1990)	43	0.7
40.	<i>Rhodococcus</i> sp. ST-5	Glycolipid	(Drouin and Cooper, 1992)	26.8	54
41.	<i>Rhodococcus</i> sp. H13-A	. Glycolipid	(Singer and Finnerty, 1990)	26.8	54
42.	<i>Rhodococcus</i> sp. 33	Polysaccharide	(Neu et al. 1992)		
43.	<i>Cyanobacteria</i>	Whole cell	. (Levy et al. 1990)		

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

44.	<i>Clostridium pasteurianum</i>	Neutral lipids	(Cooper and Zajic, 1980)		
45.	<i>Debaryomyces polymorphus</i>	. Carbohydrate-lipid complex	(Nerurkar et al. 2009)		
46.	<i>Halomonas</i>	. Emulsifier HE39 & HE67	(Gutiérrez et al. 2007a)		
47.	<i>Halomonas eurihalina</i>	Sulfated heteropolysaccharide	(Calvo et al. 1998; Gutiérrez et al. 2007b)		
48.	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Diglycosyl Diglycerides	(Mulligan et al. 2001)		
49.	<i>Leuconostoc mesenteriods</i>	Viscosin	(Banat et al. 2010)		
50.	<i>Myroids</i>	L-ornithine lipids, iso-3 hydroxyfatty acid and isofatty acid	(Maneerat et al. 2006,2007; Maneera and Dikit, 2007)		
51.	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Carbohydrate Protein complex	((Oloke and Glick, 2005)		
52.	<i>Serratia marcescens</i>	Serrawettin	(Lai et al. 2009)	28-33	
53.	<i>Serratia rubidea</i>	Rhamnolipids	(Jadhav et al. 2011)		

1.6.2 Levadura

También hay reportes de aislamientos de levaduras que producen un biotensioactivo/bioemulsificador que muestra un buen índice de emulsificación (80 %) con queroseno y petróleo crudo. También se ha demostrado que elimina el petróleo crudo (76 %) de contaminantes (Oloke y Glick, 2005). Entre las especies de levadura *Pseudozyma sp.*, reportado principalmente para la producción de biotensioactivos en comparación con otras especies (Fig. 1.3). Cooper y Paddock, (1983) aislaron *Torulopsis petrophilum* para la producción de soforolípidos.

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

Kakugawa *et al.*, (2002) aislaron *Kurtzmanomyces sp.*, I-11 para la producción de Lípidos de mannoseritritol (MEL) y por lo tanto *Kurtzmanomyces sp.*, I-11 es una nueva producción de MEL junto con *Ustilago maydis* y *Schizonella melanogramma*.

Fig. 1. 3 Tabla de levaduras productoras de biotensioactivos:

No.	Microorganism's	Biosurfactants	References	Tensión Superficial (mN/m)	CMC (mg/L)
1.	<i>Torulopsis petrophilum</i>	Sophorolipids	(Cooper and Paddock, 1983)		
2.	<i>Torulopsis apicola</i>	Sophorolipids	(Weber et al. 1992)	30	
3.	<i>Pseudozyma rugulosa</i>	Mannosylerythritol lipids	(Morita et al. 2006)		
4.	<i>Pseudozyma aphidis</i>	Mannosylerythritol lipids	(Rau et al. 2005)		
5.	<i>Pseudozyma siamensis</i>	Monnosylerythritol lipids	(Kitamoto et al. 1993)		
6.	<i>Pseudozyma fusiformata</i> , <i>Pseudozyma parantarctica</i> , <i>Pseudozyma tsukubabaensis</i>	Mannosylerythritol lipids	(Morita et al. 2007)		
7.	<i>Kurtzmanomyces sp.</i>	Monnosylerythritol lipids	(Kakugawa et al. 2002)		
8.	<i>Kurtzmanomyces sp.</i> I-11	Mannosylerythritol lipids	(Kakugawa et al. 2002)		
9.	<i>Debaryomyces polymorphus</i>	Carbohydrate protein lipid complex	(Singh and Desai, 1989)		
10.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mannanoprotein	(Cameron et al. 1988)		

1.6.3 Hongos

Existen estudios en los cuales diferentes especies de hongos han sido reportadas por autores para la producción de tensioactivos de diferentes fuentes. *Candida sp.*, es la especie de hongos más comúnmente disponible reportada de diferentes fuentes para la producción de tensioactivos en comparación con otras especies de hongos (Fig. 1.4). Casas y Garcia-Ochoa, (1999) informaron de la *Candida bombicola* para la producción de soforolípidos. *Yarrowia lipolytica* es uno de los hongos bien informados para la producción de proteína de carbohidratos lipídicos basados en bioemulsificadores. Este bioemulsificador basado en polisacáridos puede aumentar la hidrofobicidad de las células durante la fase de crecimiento. Zinjarde y Pant (2002) demostraron que la producción extracelular de bioemulsificador tiene lugar cuando la célula entra en fase estacionaria. Se ha demostrado que *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 aislado del entorno marino produce una pared celular emulsionante que es un complejo de proteína de carbohidratos lipídicos en presencia de alcanos o petróleo crudo. 'Yansan', es otro tipo de bioemulsificador producido a partir de la cepa salvaje brasileña de *Yarrowia lipolytica*, IMUFRJ 50682 en el medio de fermentación suplementado con glucosa.

Fig. 1. 4 Tabla de hongos productores de biotensioactivo:

No.	Microorganism's	Biosurfactants	References	Tensión Superficial (mN/m)	CMC (mg/L)
1	<i>Apiotrichum loubieri</i>	TEMOS16	(Yalçın et al., 2018)	35.3	
2	<i>Candida antarctica</i>	Mannosylerythritol Lipid	(Kitamoto et al. 1992)	28	
3.	<i>Candida bombicola</i>	Sophorous lipids	(Gobbert et al. 1984)		

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

4.	<i>Candida tropicalis</i>	Mannan-fatty acid	(Fiechter and Kaeppli, 1976)		
5.	<i>Candida lipolytica</i> Y-917	Soporous lipid	. (Lesik et al. 1989)		
6.	<i>Candida utilis</i>	NDA	(Shepherd et al. 1995)		
7.	<i>Candida ingens</i>	Fatty acids	(Amezcu-Vega et al. 2007)		
8.	<i>Candida lipolytica</i> UCP0988	Carbohydrate-proteinlipid complex	(Sarubbo et al. 2007)		
9.	<i>Candida bombicola</i> , <i>Candida apicola</i> , <i>Candida antartica</i> , <i>Candida botistae</i> , <i>Candida stellata</i> , <i>Candida bogoriensis</i>	Sophorolipids	(Felse et al. 2007)		
10.	<i>Candida tropicalis</i>	Liposan	(Cirigliano and Carman, 1984)		
11.	<i>Candida bombicola</i>	Sophorolipids	(Casas and Garcia-Ochoa, 1999; Cavallero and Cooper, 2003)		
12.	<i>Candida (torulopsis) apicola</i>	Sophorolipids	(Hommel et al. 1994)	33	
13.	<i>Candida bogorienses</i>	Sophorolipids	(Tulloch et al. 1968)		
14.	<i>Candida lipolytica</i> IA 1055	Carbohydrate protein lipid complex	(Singh and Desai, 1989)		
15.	<i>Candida tropicalis</i>	Carbohydrate protein lipid complex	(Singh and Desai, 1989)		

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

16.	<i>Candida lipolytica</i> ATCC	Carbohydrate protein complex	(Cirigliano and Carman,1984, 1985)		
17.	<i>Corynebacterium hydrocarbolastus</i>	Protein-lipid Carbohydrate	(Zajic et al. 1977)		
18.	<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Phospholipids	(Akit et al. 1981)		
19.	<i>Corynebacterium lepus</i>	Fatty acids	(Cooper et al. 1979)	30	150
20.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Polyketide derivative	(Gao et al. 2011)		
21.	<i>Penicillium Chrysogenum</i>	Monoketide derivative	(Gao et al. 2011)		
22.	<i>Penicillium Spiculisporum</i>	Spiculosporic acid	(Ban and Sato, 1993)		
23.	<i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682	Carbohydrate protein Complex	(Amaral et al. 2006)		
24.	<i>Yarrowia lipolytica</i>	TEMGS33	(Yalçın et al., 2018)	34.7	
25.	<i>Yarrowia lipolytica</i>	UPC	(Fontes et al., 2010)	22	
26.	<i>Yarrowia lipolytica</i> NCIM 3589	Carbohydrate protein lipid complex	(Zinjarde et al., 1997)		
27.	<i>Yarrowia lipolytica</i> NCIM 3589	Bioemulsifier	(Zinjarde and Pant, 2002)		
28.	<i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682	Yansan	(Amaral et al. 2006; Trindade et al. 2008)		
29.	<i>Ustilago maydis</i>	Cellobiose lipids	(Teichmann et al. 2007b)	30	20
30.	Strain MM1	glucose, lipid and hydroxydecanoic acids	(Passeri et al. 1992)		

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

31.	<i>Nocardia erythropolis</i>	Neutral lipids	(Macdonald et al. 1981)	32	
32.	<i>Ochrobactrum anthropii</i>	Protein	(Wasko and Bratt, 1990)		
33.	<i>Phaffia rhodozyma</i>	Carbohydrates-lipid complex	(Lesik et al. 1991)		
34.	<i>Torulopsis bombicola</i>	Sophorose lipids	(Ito and Inoue, 1982)	25-35	60-82
35.	<i>Aspergillus versicolor</i>	Chromone Derivative	(Lin et al. 2003)		
36.	<i>Emericella unguis</i>	Depside	(Nielsen et al. 1999)		
37.	<i>Microsphaeropsis</i> sp.	Eremophilane Derivative	(Holler et al. 1999)		
38.	<i>Trichosporon montevidense</i>	glycolipid	(Monteiro et al., 2009)	44.9	

1.7 Clasificación del biotensioactivo basado en la naturaleza química

Los biotensioactivos se clasifican principalmente en función de su estructura y fuentes compuestas. La parte superior hidrofílica suele ser un aminoácido, un péptido, un mono, di o polisacárido. El extremo hidrófobo es habitualmente un ácido graso saturado, insaturado, lineal, ramificado o hidroxilado.

1.7.1 Glicolípidos

Este es el biotensioactivo más común y fácilmente disponible y estos son los carbohidratos con la combinación de ácido alifático de cadena larga o ácido hidroxialifático. La conexión es por medio de cualquiera de los grupos éter o éster. Rhamnolipidos, trihalolipidos y sorpholipidos son los mejores biotensioactivos conocidos entre los glicolípidos. Los glicolípidos mejor estudiados son los rhamnolípidos sintetizado por *Pseudomonas* sp., (Jarvis et al., 1949), lípidos de mannoseritritol sintetizados por *Pseudozyma Antarctica* (Kitamoto et al., 1990), lípidos de trehalosa sintetizados por *Rhodococcus* sp., *Nocardia* sp., *Arthrobacter* sp., y *Mycobacterium* sp., (Lang y Wagner, 1987). Cellobiolípidos sintetizado por

Ustilago maydis (Teichmann *et al.*, 2007b) y soforolípidos sintetizados por *Candida sp.*, (Cooper y Paddock, 1984).

1.7.2 Lipopéptidos y lipoproteínas

Una gran cantidad de lipopéptidos cíclicos, incluidos los antibióticos decapeptide y antibióticos lipopéptidos se producen. Estos contienen un lípido unido a una cadena polipeptídica. Lipopéptido llamado surfactina que es producida por *Bacillus sp.*, que contiene siete aminoácidos unidos a un carboxilo y grupo hidroxilo de 14 átomos de carbono. Una característica importante de la surfactina es su capacidad de lisar eritrocitos de mamíferos y para formar esferoplastos (Bernheimer y Avigad, 1970). Las moléculas en esta clase de biotensioactivos en general consisten en péptidos cíclicos unidos a un cuerpo graso ácido. Se sabe que varias bacterias producen esas moléculas similares a los antibióticos, entre ellas *Bacillus subtilis*, que produce surfactina, subtilisina. Lípido-péptido y lichenisina *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* (Yakimov *et al.*, 1997; Begley *et al.*, 2009). Viscosina sintetizado por *Pseudomonas fluorescens* (Banat *et al.*, 2010), Serrawettin sintetizado por *Serratia marcescens* (Lai *et al.*, 2009). Fengycin sintetizada por *Bacillus sp.*, (Vanittanakom *et al.* 1986), Arthrofactina sintetizada por *Arthrobacter sp.*, (Morikawa *et al.*, 1993), Gramicidinas sintetizado por *Bacillus brevis*, *Brevibacterium brevis* (Krauss y Chan, 1983), Polimixinas sintetizado por *Bacillus polymyxa*, *Brevibacterium polymyxa* (Suzuki *et al.*, 1965), lípidos de ornitina sintetizados por *Myroides sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Thiobacillus sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Gluconobacter sp.*, (Desai y Banat, 1997).

1.7.3 Ácidos grasos, fosfolípidos y lípidos neutros

Muchas bacterias y levaduras sintetizan grandes cantidades de ácidos grasos y tensioactivos fosfolípidos durante su crecimiento en n-alcenos (Cirigliano y Carman, 1985). El balance hidrofílico y lipofílico (HLB) es directamente proporcional a la longitud de la cadena de hidrocarburos en sus estructuras. Varios hongos, levaduras y bacterias, que pueden crecer en sustratos hidrofóbicas como alcanos, secretan grandes cantidades de fosfolípidos, ácidos grasos o lípidos neutros para facilitar la absorción de la fuente de carbono. Algunos ejemplos son *Nocardia erythropolis*,

Thiobacillus thiooxidans, *Candida lepus*, *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Micrococcus sp.*, *Mycococcus sp.*, *Candida sp.*, *Penicillium sp.*, y *Aspergillus sp.*, (Kappeli y Finnerty, 1979). En *Acinetobacter sp.*, se sintetizan vesículas ricas en fosfatidiletanolamina (Kappeli y Finnerty, 1979) que forman microemulsiones ópticamente claras de alcanos en agua. Sal biliar sintetizada por *Myroides sp.*, (Desai y Banat, 1997), fosfatidiletanolamina sintetizada por *Rhodococcus erythropolis*, crecida en n-alcano reduce la tensión interfacial entre el hexadecano y el agua a menos de 1 mN/m y una concentración crítica de micelas (CMC) de 30 mg/L (Kretschmer *et al.*, 1982).

1.7.4 Biotensioactivos poliméricos

Los biotensioactivos poliméricos mejor estudiados son alasan, liposan, lipomanan emulsan y algunos otros complejos de proteína-polisacárido. En *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 sintetiza un bioemulsificador heteropolisacárido polianiónico potente anfipático extracelular (Rosenberg *et al.*, 1979). El emulsán es un agente emulsionante efectivo para hidrocarburos en agua (Zosim *et al.*, 1982), incluso a una concentración tan baja como 0.001 a 0.01 %. El liposán es un emulsionante extracelular soluble en agua sintetizado por *Candida lipolytica* que se compone de 83 % de carbohidratos y 17 % de proteína, un complejo carbohidrato-proteína sintetizado por la levadura *Yarrowia lipolytica*. Otro ejemplo es la proteína lípida Mannan sintetizada por *Candida tropicalis*, Proteína PA sintetizado por *Pseudomonas aeruginosa* (Cirigliano y Carman, 1984). Los biotensioactivos poliméricos se compilan a partir de varios componentes. Emulsán y biodispersán sintetizados por *Acinetobacter calcoaceticus*, es el mas estudiado que consiste en un heteropolisacárido columna vertebral a la que los ácidos grasos están unidos covalentemente (Rosenberg *et al.*, 1988).

1.7.5 Biotensioactivos particulados

Las vesículas de membrana extracelular separan los hidrocarburos de una microemulsión, que juega un papel muy importante en la absorción de alcanos por las células microbianas. Vesículas de *Acinetobacter sp.*, teniendo un diámetro de

20-50 nm y una densidad de flotación de 1.158 cúbicos g/cm, consta de proteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos (Kappeli y Finnerty, 1979).

1.8 Aplicación de biotensioactivos

Se ha prestado mucha atención a los biotensioactivos debido a su amplio rango de propiedades funcionales y diversas capacidades sintéticas de microorganismos (Singh *et al.*, 2007). Lo más significativo es su aceptabilidad ambiental, como son fácilmente biodegradables y tienen baja toxicidad que los tensioactivos sintéticos. Estos los biotensioactivos de naturaleza única permiten su utilización y posible sustitución de productos químicos tensioactivos sintetizados en un gran número de operaciones industriales. La mayoría de los biotensioactivos tienen aplicaciones potenciales en productos farmacéuticos/medicinales, alimentos, cosméticos, pesticidas, industrias de biodegradación y aceites (Fiechter, 1992).

1.8.1 Biotensioactivos en la industria alimenticia

Los biotensioactivos también tienen varias aplicaciones en las industrias alimentarias como aditivos. Lecitina y sus derivados, ésteres de ácidos grasos que contienen glicerol, sorbitol o etilenglicol y etiloxilados derivados de monoglicéridos que incluyen un oligopéptidos sintetizados recientemente se utilizan ahora como emulsionantes en las industrias alimentarias (Besson y Michel, 1992). Otras aplicaciones de biotensioactivos se encuentran en productos de panadería y carne donde influyen en la reología características de la harina o la emulsificación de tejidos grasos parcialmente rotos (Fiechter, 1992). Busscher *et al.*, (1996) encontraron que los biotensioactivos producidos por el diario termófilo *Streptococcus sp.*, podría usarse para controlar el incrustamiento de las placas del intercambiador de calor en los pasteurizadores, ya que retardan la colonización de *Streptococcus thermophilus* responsable del ensuciamiento.

1.8.2 Biotensioactivos en farmacia

Kakugawa *et al.*, (2002) y Mukherjee *et al.*, (2006) demostraron que los biotensioactivos podrían tener una amplia gama de aplicaciones en campos farmacéuticos tales como la administración de genes, agentes para insuficiencia

respiratoria, adyuvantes inmunológicos, agentes antiadhesivos en cirugía, inhibición de la adhesión de organismos patógenos a superficies sólidas, recuperación de productos intracelulares, actividad antimicrobiana, actividad antiviral, actividad anticancerosa y agentes para la estimulación.

1.8.2.1 Agentes para insuficiencia respiratoria

Una deficiencia de tensioactivo pulmonar que es un complejo de proteínas fosfolípidos es responsable de la falla de la piel del metabolismo de fibroblastos de la respiración en bebés nacidos prematuramente. El aislamiento de los genes de las moléculas de proteínas de este tensioactivo y la clonación en bacterias ha hecho posible su producción fermentativa para aplicaciones médicas (Gautam y Tyagi, 2005).

1.8.2.2 Adyuvantes inmunológicos

Los lipopéptidos bacterianos constituyen potentes adyuvantes inmunológicos no tóxicos y no pirogénicos cuando se mezcla con antígenos convencionales. Una marcada mejora de la inmunidad humoral se obtuvo como respuesta con los antígenos de baja masa molecular Iturin AL, herbicolina A y microcistina (MLR) acoplada a poli-L-lisina (MLR-PLL) en conejos y en pollos por (Rodrigues *et al.*, 2006).

1.8.2.3 Agentes antiadhesivos en cirugía

Pretratamiento de caucho de silicona con tensioactivo producido por *Streptococcus thermophilus* inhibió en un 85 % la adhesión de *Candida albicans* (Busscher *et al.*, 1997) mientras que los tensioactivos obtenidos de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus acidophilus* adsorbidos sobre vidrio, redujeron en un 77 % el número de células uropatógenas adheridas de *Enterococcus faecalis*. El biotensioactivo obtenido de *Lactobacillus fermentum* inhibió la infección por *Staphylococcus aureus* y se adhirió a los implantes quirúrgicos (Gan *et al.*, 2002). La surfactina disminuyó la cantidad de biopelícula formada por *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* en placas de policloruro de vinilo y catéteres de vinilo uretrales (Mireles *et al.*, 2001).

1.8.2.4 Actividad antimicrobiana

Das *et al.*, (2009) han informado de biotensioactivo producido por *Bacillus circulans* marinas que tenían una potente actividad antimicrobiana contra gram-positivo, gram-negativo patogénico y semipatogénico, cepas microbianas incluyendo cepas MDR. Fernandes *et al.*, (2007) investigaron la actividad antimicrobiana de biotensioactivos de *Bacillus subtilis* R14 contra 29 cepas bacterianas. Sus resultados demostraron que los lipopéptidos tienen un amplio espectro de acción, incluida la actividad antimicrobiana contra microorganismos con perfiles resistentes a múltiples fármacos Fernandes *et al.*, (2007).

1.8.2.5 Inhibición de la adhesión de organismos patógenos a superficies sólidas

Se ha encontrado que los biotensioactivos inhiben la adhesión de organismos patógenos a superficies sólidas o a sitios de infección (Das *et al.*, 2009) por lo tanto, la adhesión previa de biotensioactivos a superficies sólidas podría constituir un medio nuevo y eficaz de combatir la colonización por microorganismos patógenos (Rivardo *et al.*, 2009). El pre-recubrimiento de catéteres uretrales de vinilo ejecutando en la solución de surfactina a través de ellos antes de la inoculación con los medios de comunicación resultó en una disminución en la cantidad de biopelícula formado por *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* (Rodrigues *et al.*, 2004) Además, Rodrigues *et al.*, (2004) demostraron que los biotensioactivos redujeron en gran medida los números microbianos en las prótesis y también indujo la disminución de resistencia al flujo de aire que ocurre en las prótesis de voz después de la formación de la biopelícula.

1.8.2.6 Recuperación de productos intracelulares

Los tensioactivos también se han usado para lisar las células después de la fermentación como parte del protocolo para recuperación de productos intracelulares. Se usaron soluciones de micelas inversas para permeabilización de *Escherichia coli* para facilitar la extracción de penicilina acilasa (Singh *et al.*, 2007).

1.8.2.7 Actividad antiviral

Efectos de los antibióticos y el crecimiento de inhibición del virus de inmunodeficiencia humana en leucocitos por los biotensioactivos han sido citados en la literatura (Desai y Banat, 1997; Muthusamy *et al.*, 2008). Además, Muthusamy *et al.*, (2008) informaron que, debido a la mayor incidencia de VIH en mujeres, surgió la necesidad de un tópico vaginal controlado, eficaz y seguro para mujeres. Tensioactivos microbicidas de soforolipidos de *Candida bombicola* y sus análogos estructurales como el éster etílico de diacetato de soforolípido es el agente espermicida y virucida más potente, también se informó que esta sustancia tiene una actividad virucida similar a la del nonoxinol 9 contra el semen humano.

1.8.2.8 Actividad contra el cáncer

Las actividades biológicas de siete glicolípidos extracelulares microbianos, junto con lípidos de mannosylerythritol-A, lípidos de mannoseritritol-B, rhamnolípido, lípido de polioliol, soforosa lípidos, etc. han sido estudiados. Todos estos glucolípidos, a excepción del rhamnolípido, pudieron inducir diferenciación celular en lugar de proliferación celular en la línea celular de leucemia promielocítica humana HL60. Esta es la primera evidencia de que el retarda crecimiento, de apoptosis y diferenciación de las células de melanomas malignas que pueden ser inducidas por glicolípidos (Zhao, 1999 y Kitamoto *et al.*, 1993).

1.8.2.8 Agentes para la estimulación del metabolismo de los fibroblastos de la piel

El uso de soforolipidos en forma de lactona comprende una gran parte de diacetil lactonas como agentes para estimular el metabolismo de las células de fibroblastos dérmicos de la piel y principalmente, como agentes para la estimulación de neosíntesis de colágeno, a una concentración de 0.01 ppm al 5 % (p/p) de materia seca en la formulación. Esto se puede aplicar en cosmetología y también en dermatología. La lactona purificada soforolípido producto es de importancia en la formulación de los productos de antienducción de la dermis debido a su efecto en la estimulación de las células de la dermis. Al fomentar la producción de nuevas fibras de colágeno, los soforolípidos de lactona purificada pueden usarse tanto como

medida preventiva contra el envejecimiento de la piel y se usa en cremas para el cuerpo, y en las leches corporales, lociones y geles que se usan para piel (Borzeix y Frederique, 2003).

1.8.3 Biotensioactivos en industrias de pesticidas

Los tensioactivos son necesarios como adyuvante con fungicidas, insecticidas y herbicidas. El tensioactivo sintético utilizado actualmente en las industrias de pesticidas actúa como emulsionante, dispersante y agente humectante y mejorar la eficiencia de los pesticidas. Además, estos tensioactivos se usan como insecticidas en la agricultura moderna ya que estos tienen propiedades defensivas (Rostas *et al.*, 2009). Diferentes tipos de tensioactivos como aniónico, catiónico, anfótero y no iónico son actualmente utilizados en varias industrias de fabricación de plaguicidas (Mulqueen, 2003). Hay un informe sobre bacterias que pertenecen a *Pseudomonas sp.*, y *Burkholderia sp.*, del arrozal para degradar tensioactivos sintéticos (Nishio *et al.*, 2002). Productos importantes para la agricultura como pesticidas formados con la ayuda del biotensioactivo pueden ser ampliamente utilizada en campos agrícolas. La necesidad de industrias agroquímicas es desarrollar tecnología de formulación efectiva y lograr este objetivo; muchas empresas pueden emplear mezclas de biotensioactivos en diferentes combinaciones con los polímeros para hacer excelentes formulaciones para aplicaciones agrícolas.

1.8.4 Biotensioactivos en la industria de cosméticos

Una amplia área de aplicación potencial es la industria cosmética donde las sustancias activas de superficie son encontrados en productos de uso diario (Fiechter, 1992). Muchas propiedades biotensioactivas como emulsificación, desemulsificación, formación de espuma, capacidad de unión de agua, difusión y humectación efecto de propiedades sobre la viscosidad en la consistencia del producto, puede ser utilizado de manera eficiente por el cosmético industria. Productos cosméticos que usan tensioactivos, incluidos productos para el baño, almohadillas para el acné, anticasma productos, solución para lentes de contacto, coloración y productos para el cuidado, desodorantes, cuidado de uñas, accesorios para masajes del cuerpo, lápices labiales, creadores de labios, sombras para ojos,

jabón, pasta y esmaltes para dientes, dentadura postiza limpiadores, adhesivos, antitranspirantes, productos para bebés, cuidado de los pies, mousses, antisépticos, champús, acondicionadores, afeitado y productos depilatorios, humectantes, productos de salud y productos de belleza, cremas, lociones, líquidos, pastas, polvos, barras, geles, películas, aerosoles podrían ser utilizados y puede ser reemplazado por biotensioactivos (Ueno *et al.*, 2007; Villeneuve, 2007; Youssef *et al.*, 2007). Agentes tensioactivos como emulsionantes, agentes espumantes, solubilizantes, agentes humectantes, limpiadores, antimicrobianos agentes, son mediadores de la acción enzimática en diversas formas de dosificación. El monoglicérido, uno de los tensioactivos ampliamente utilizados en la industria cosmética se ha informado que ser producido a partir de sebo de glicerol con un rendimiento del 90 % mediante el tratamiento con lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (McNeill y Yamane, 1991).

1.8.5 Biotensioactivo en agentes terapéuticos

Los rhamnolipidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa*, lipopéptidos producidos por *Bacillus subtilis* (Sandrin *et al.*, 1990), *Bacillus licheniformes* (Yakimov *et al.*, 1995) y mannoseritritol de *Candida antarctica* (Singh y Desai, 1989) han mostrado actividades antimicrobianas. La surfactina, uno de los primeros biotensioactivos conocidos, tiene varias aplicaciones farmacológicas, como la inhibición de la formación de coágulos de fibrina y formación de canales iónicos en membranas lipídicas (Sheppard *et al.*, 1991; Thimon *et al.*, 1995) describieron otro biotensioactivo antifúngico, Iturin, un lipopéptido producido por *Bacillus subtilis* que afecta la morfología y la estructura de la membrana de las células de levadura.

1.8.6 Biotensioactivos en procesos de biodegradación

La aplicación más significativa de biotensioactivos se estudió en biorremediación, por ejemplo, en eliminar metales pesados (Frazetti *et al.*, 2009; Asci *et al.*, 2010) e hidrocarburos de sitios contaminados (Kosaric *et al.*, 1987). Los biotensioactivos pueden mejorar la biorremediación de hidrocarburos por dos mecanismos. En primer lugar, al aumentar la biodisponibilidad del sustrato para los microorganismos, mientras el otro implica la interacción con la superficie celular que

aumenta la hidrofobicidad de la superficie que permite que los sustratos hidrofóbicos se asocien más fácilmente con las células bacterianas (Mulligan y Gibbs, 2004). Al reducir las tensiones superficiales e interfaciales, los biotensioactivos aumentan superficies de compuestos insolubles que conducen a una mayor movilidad y biodisponibilidad de hidrocarburos. La capacidad de los biotensioactivos y biotensioactivos que producen cepas bacterianas para mejorar la disponibilidad de contaminantes orgánicos y las tasas de biodegradación fue informado por muchos autores (Rahman *et al.*, 2003; Inakollu *et al.*, 2004). Obayori *et al.*, 2009, investigaron las propiedades biodegradativas del biotensioactivo producido por *Pseudomonas sp.* Kang *et al.*, 2010 usaron soforolípidos en estudios sobre biodegradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en condiciones de laboratorio. La adición de este biotensioactivo al suelo también aumenta biodegradación de hidrocarburos probados con una tasa de degradación que varía entre 85 % y 97 % de la cantidad total de hidrocarburos. Sus resultados indicaron que el soforolípidos puede tener potencial para facilitar la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos que tienen solubilidad limitada en agua y aumento de la biodisponibilidad de los consorcios microbianos para la biodegradación. La utilidad de las cepas productoras de biotensioactivos en la biorremediación de sitios altamente contaminados con los hidrocarburos crudos de petróleo fueron confirmados por Das y Mukherjee (2007) y Elsheshtawy *et al.*, 2013.

1.8.7 Biotensioactivos en la industria petrolera

La extracción del petróleo de los yacimientos es muy poco efectiva. La existencia del petróleo residual en los yacimientos se debe a los mismos factores que hacen que la remediación de los sitios contaminados sea difícil, aunque en estos casos, la principal dificultad se debe a la alta adherencia de los hidrocarburos a las moléculas porosas del suelo: arcillas, rocas, arena, etc. y a la viscosidad del fluido (Sen, 2008). El agregado de tensioactivos forma parte del arsenal de herramientas con las que se intenta mejorar la extracción del crudo atrapado en los yacimientos.

La producción de biotensioactivos para la recuperación asistida de petróleo puede hacerse *ex situ* o *in situ*. En el primer caso, una vez producido, el compuesto debe ser purificado y/o concentrado e inyectado en el yacimiento (Kosaric, 1992).

Una alternativa interesante es la producción *in situ*. Para ello se utilizarían técnicas de estimulación, o sea, agregando nutrientes específicos con el fin de estimular el desarrollo de la microflora nativa capaz de sintetizar tensioactivos, o de aumentación (incorporación del microorganismo seleccionado). No sólo hay que asegurarse de no introducir organismos perjudiciales, sino que además hay que tener en cuenta que las condiciones dentro del yacimiento difieren significativamente de las condiciones óptimas de cultivo y producción de biotensioactivos, por lo que la cepa a incorporar debe ser analizada en cuanto a su resistencia a temperaturas mayores de 85°C, alta salinidad, pH extremo, metales pesados y, sobre todo, la baja aerobiosis (Sen, 2008).

1.8.7.1 Biotensioactivos en la recuperación mejorada del petróleo

Los biotensioactivos se utilizan para mejorar la recuperación de petróleo debido al uso potencial en la industria petrolera con pureza y especificación mínimas para que se pueda usar caldo de células enteras. Están involucrados en un número infinito de diferentes procesos industriales y fenómenos fisicoquímicos que aumentan la movilidad, la solubilidad, lubricación, eliminación de suciedad o fregado (Pei *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2009). Makkar y Cameotra, (1997) observaron una buena recuperación de aceite en paquete de arenas utilizando cepas de *Bacillus subtilis* a 45°C, utilizaron melaza como fuente barata de aditivo nutritivo

1.9 Tensión superficial

La tensión interfacial es una de las propiedades termofísicas de fluidos que determinan el comportamiento de la interfaz entre dos líquidos inmiscibles, esto se debe a la diferencia en la naturaleza química de las interacciones intermoleculares de cada fluido (Kalantary-Meybodi *et al.*, 2016), para disminuir la tensión interfacial, los tensioactivos actúan como un puente formando una tercera fase de microemulsión que favorece la interacción entre la fase acuosa y la del contaminante (Ayirala y Rao, 2006). La tensión superficial (tensión presente en la interfase líquido-aire), los tensioactivos la disminuyen debido a que interfieren en la formación de puentes de hidrógeno y otras fuerzas involucradas en la adhesión entre moléculas (Raiger y López, 2009), lo que incrementará la solubilidad (Fig. 1.5)

(Banat *et al.*, 2000). Los tensioactivos se disuelven en el agua como monómeros, se adsorben en las interfases y se incorporan con otras moléculas de tensioactivos como parte de una micela, las micelas consisten en 2-100 monómeros (Riojas *et al.*, 2011).

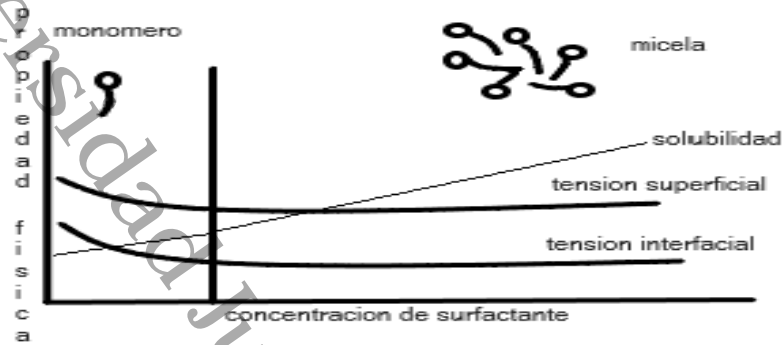


Fig. 1. 5 Diagrama esquemático de la variación de la tensión superficial, interfacial y la solubilidad del contaminante con la concentración del tensioactivo (Mulligan *et al.*, 2001)

1.10 Concentración micelar crítica (CMC)

La concentración de tensioactivos en la que se alcanza la mínima tensión superficial es denominada concentración micelar crítica (CMC); es también la concentración de tensioactivos por debajo de la cual las micelas se forman espontáneamente. La CMC es un parámetro característico para cada tensioactivo. Para valores inferiores a esta concentración, todo el tensioactivo presente en solución se encuentra en forma de monómeros ubicados en la interface agua-aire, mientras que, a valores más altos, algunas moléculas de tensioactivo se encuentran en forma micelar (Fig. 1.6) (Jiménez *et al.*, 2010).

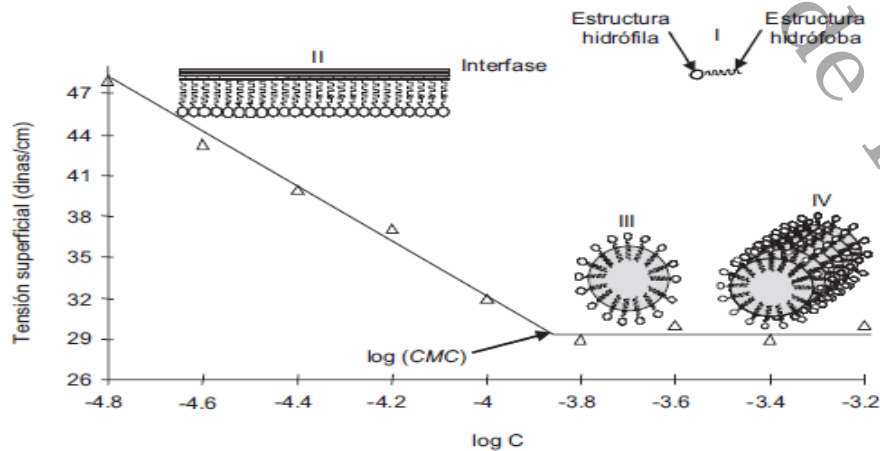


Fig. 1. 6 Representación esquemática en el arreglo de las moléculas de tensioactivo alrededor de la concentración micelar crítica (CMC) (Jiménez *et al.*, 2010).

La CMC captura mucha de la actividad superficial de la molécula. Las contribuciones del tamaño de la parte hidrofóbica (cola) e hidrofílica (cabeza) del tensioactivo influyen en dicho parámetro. Ambas contribuciones contrarrestan una a la otra, esto es, se tiene una CMC baja cuando es mayor la contribución de la parte hidrofóbica. En cambio, se alcanza una CMC alta cuando esa situación se presenta para la parte hidrofílica (Huibers *et al.*, 1997).

1.11 Mojabilidad

La mojabilidad describe la preferencia de un sólido estar en contacto con un fluido en lugar de otro. Aunque el término "preferencia" puede parecer extraño cuando se describe un objeto inanimado, describe acertadamente el equilibrio de superficie y fuerzas interfaciales. Una gota de un preferencial fluido mojante desplazará a otro fluido; en el extremo se extenderá por toda la superficie. Por el contrario, si se deja caer un fluido en una superficie ya cubierta por el fluido mojado, se redondeará, minimizando su contacto con el sólido. Si la condición no es enérgica ni fuertemente mojada al aceite, el saldo de fuerzas en el sistema de aceite / agua / sólido darán como resultado un ángulo de contacto, θ , entre los fluidos en la superficie sólida.

En una forma homogénea, el material poroso saturado con aceite y agua, "fuertemente mojado con agua "describe un miembro final de un sustrato en el que la superficie prefiere fuertemente el contacto con el agua. Una superficie fuertemente mojada de aceite prefiere el contacto con el aceite (Fig. 1.7). Los grados de mojabilidad se aplican a lo largo del sustrato, y si el sólido no tiene una preferencia marcada por un fluido sobre el otro, su condición se denomina mojabilidad intermedia o mojabilidad neutra.

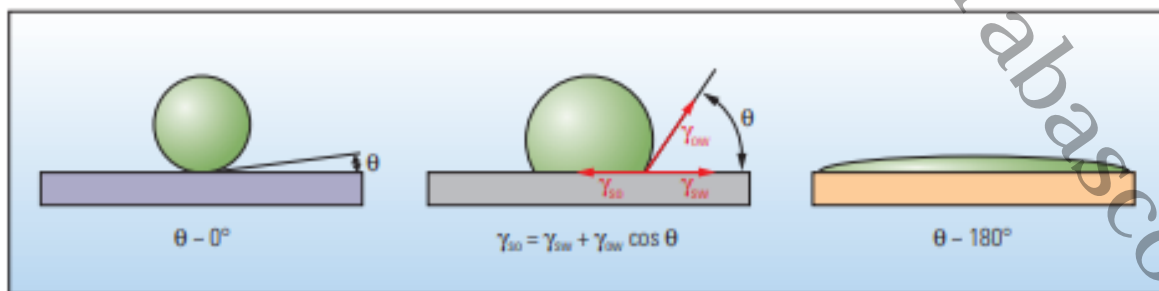


Fig. 1. 7 Diagrama del ángulo de contacto

Una gota de aceite (verde) rodeada de agua (azul) en una superficie mojada con agua (izquierda) forma una esfera. El ángulo de contacto θ es aproximadamente cero. En una superficie mojada con aceite (derecha), la gota se extiende, dando como resultado un ángulo de contacto de aproximadamente 180° . Una superficie con mojabilidad intermedia (centro) también forma un cordón, pero el ángulo de contacto proviene de un balance de fuerza entre los términos de tensión interfacial, que son γ_{so} y γ_{sw} para los términos superficie-aceite y superficie-agua, respectivamente, y γ_{ow} para el término aceite-agua.

Las rocas del embalse son estructuras complejas, a menudo que comprende una variedad de tipos de minerales. Cada mineral puede tener una mojabilidad diferente, haciendo el carácter mojante de la roca compuesta difícil de describir. Por lo general, la constitución primaria (de los depósitos) cuarzo, carbonato y dolomita: se mojan con agua antes de la migración del aceite. Esto trae una complejidad adicional: el historial de saturación del material puede influir mojar la superficie, de modo que las superficies de los poros que tenían el petróleo al que se ha contactado previamente puede estar mojado en aceite, pero aquellos que nunca se contactan con el petróleo pueden ser mojados por agua.

Otra distinción importante es que una superficie preferentemente mojada de agua puede estar en contacto con petróleo o gas. La mojabilidad no describe el estado de saturación: describe la preferencia del sólido por mojar un cierto fluido, dada la presencia de ese fluido mojado. Por lo tanto, una roca mojada con agua puede ser limpiada, secada y completamente saturada con un alcano, mientras que las superficies en los poros permanecen mojadas por agua. (Abdallah *et al* 1986).

1.12 Emulsificación de aceite en yacimiento

A nivel de yacimiento el aceite se encuentra en interacción con el agua subterránea, cuando se extrae el aceite crudo, este se encuentra emulsionado con agua en el subsuelo también llamado agua congénita. Dicha emulsificación se cree que facilita el desprendimiento del aceite de la roca, e incrementa su recuperación, sin embargo, la posterior separación de las emulsificación es necesaria y representa altos costos a la industria petrolera (Tital Oil Recovery, 2010-2012).

Los agentes emulsionantes son numerosos y pueden ser tensioactivos naturales como asfaltenos, resinas, ácidos nafténicos, ácidos carboxílicos entre otros componentes naturales del petróleo. Algunos químicos algunos químicos añadidos como tensioactivos y humectante, también pueden favorecer la emulsión. También las partículas sólidas finalmente divididas como arcillas o partículas de lodos de perforación pueden formar emulsiones muy estables (Nazar *et al.*, 2011).

Una propiedad importante es el tamaño de la gota, gotas menores de 10 μm producen emulsiones más estables, la relación de volumen de fases es determinante, pues al disminuir el volumen de la fase dispersa disminuye el número de gotas, el área interfacial y la probabilidad de colisión de gotas, dando como resultado una mayor estabilidad en las emulsiones (Marfisi y Salager., 2004).

Existen otras propiedades que reducen la estabilidad de la emulsión, como son el pH y la salinidad del agua congénita que alteran radicalmente la formación de películas tensioactivas naturales como los asfaltenos. Además, el tipo de aceite determina la formación de emulsiones, los crudos base parafínicas usualmente no general emulsiones estables, mientras que los crudos nafténicos y aquellos que contienen ceras, resinas asfaltenos y otros sólidos favorecen la capacidad de la emulsión. En otras palabras el tipo de crudo determina la cantidad y tipo de emulsionantes naturales (Langevit *et al.*, 2004).

La temperatura es un factor muy complejo que añade energía a las emulsiones proporcionando estabilidad, pero también disminuye la adsorción de tensioactivos naturales en las gotas dispersas y disminuye la viscosidad de la fase dispersante reduciendo la estabilidad de la emulsión (Marfisi y Salager., 2004).

1.12.1 Estabilidad de emulsiones de aceite y agua

Algunas propiedades de las partículas de las partículas como la hidrofobicidad, la forma y tamaño tienen efecto en la estabilidad de la emulsión. El ángulo de contacto de la partícula a la superficie de la gota es otra característica importante y definida por la hidrofobicidad de la partícula. Si el ángulo de contacto de la partícula con la interface es alto, la partícula será más mojable por la gota y por lo tanto no prevendrá la coalescencia de las gotas, cuando el ángulo de contacto es cercano a 90°, es decir las partículas son parcialmente hidrofóbicas, estabilizan eficientemente

las emulsiones pues las partículas son mojables en ambos líquidos y por lo tanto se establecen en la superficie de la gota, sin embargo, también se propone que las diferencias en el ángulo de contacto podrían favorecer la formación de emulsiones de aceite en agua con ángulos menores a 90° y de agua en aceite cuando el ángulo de contacto es mayor a 90° (Langevit *et al.*, 2004).

Capítulo 2 . Materiales y método

OBJETIVO 1.- OBTENCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS PETROFÍLICAS NATIVAS DEL ESTADO DE TABASCO CON CAPACIDAD DE SINTETIZAR BIOTENSIOACTIVOS.

2.1 Caracterización del agua congénita

Una muestra de agua congénita se recolectó procedente del activo integral samaria-luna de la región sur, ubicado en Villahermosa, Tabasco, propiedad de petróleos mexicanos (PEMEX). (Fig. 2.1)

El agua congénita fue caracterizada de acuerdo a los parámetros establecidos en la norma oficial mexicana NOM-143-SEMARNAT-2003, la cual marca las especificaciones ambientales para el manejo de agua congénita asociada a hidrocarburos.



Fig. 2. 1 Muestra de agua congénita

Se realizaron las pruebas fisicoquímicas de la muestra de agua proveniente de samaria-luna de acuerdo a lo establecido en la norma NMX-EC17025-IMNC de calidad y ensayos en cumplimiento de la NOM-001-SEMARNAT-1996 de límites máximos permisibles de contaminantes en aguas residuales.

PARAMETROS FISICOQUIMICOS:

- Turbiedad
- Alcalinidad
- Cloruros totales

- Conductividad
- Potencial de hidrogeno
- Solidos totales
- Solidos suspendidos totales
- Grasas y aceites

2.1.1 Analisis para determinación de la turbiedad de acuerdo a la norma NMX-AA-038-SCFI-2001

Para realizar el análisis la muestra debe estar a temperatura ambiente, el turbidimetro debe estar previamente verificado y calibrado (Fig.2.2), posteriormente la celda se enjuago dos veces con muestra de agua congénita para evitar errores por dilución. Se lee la turbiedad de la muestra, homogeneizando la muestra contenida en la celda entre cada lectura. Se tomaron varias lecturas homogeneizando la muestra.



Fig. 2. 2 Turbidimetro HANNA MODELO 93414

2.1.2 Análisis para determinmar la ALCALINIDAD de acuerdo a la norma NMX-AA-036-SCFI-2001.

La alcalinidad se refiere a la presencia de sustancias hidrolizables en agua y que como producto de la hidrólisis generan el ión hidroxilo (OH⁻), como lo son las bases fuertes y los hidróxidos de los metales alcalinotérreos.

Transferir 100 mL de la muestra de agua congénita en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.; se adicionaron 2 gotas de disolución indicadora de fenolftaleína. Titular con una disolución valorada de ácido (0.02 N) hasta el vire de la fenolftaleína (de rosa a incoloro), se registran los mililitros gastados (alcalinidad a la fenolftaleína). Posteriormente se adicionan 2 gotas de una disolución indicadora de naranja de metilo; continuar con la titulación hasta alcanzar el vire del naranja de metilo. (de canela a amarillo), esta será la alcalinidad total. (Fig. 2.3)

Se registran los volúmenes para ambos puntos finales y se calcula la alcalinidad, tomando en cuenta el vire de los indicadores. Se calculo la alcalinidad total como CaCO_3 en mg /L, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Alcalinidad total como } \text{CaCO}_3 \text{ en mg /L} = \frac{AXN}{100} (50)(1000)$$

Donde:

A es el volumen total gastado de ácido en la titulación al vire del anaranjado de metilo en mL;

N es la normalidad de la disolución de ácido;

100 es el volumen de la muestra en mL;

50 es el factor para convertir eq/L a mg CaCO_3 /L, y

1 000 es el factor para convertir mL a L.

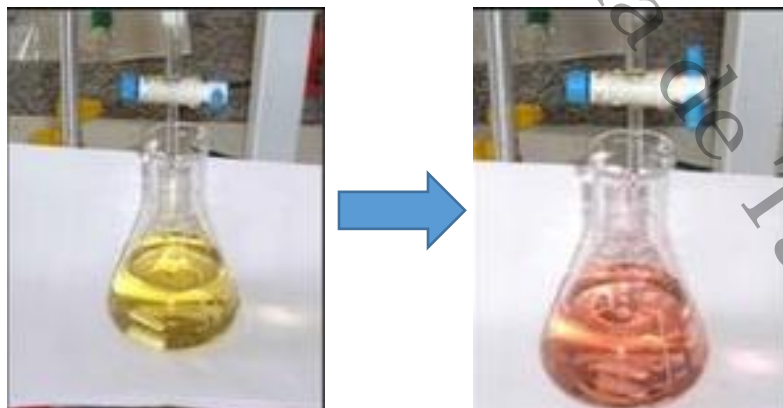


Fig. 2. 3 Titulación con HCL y naraja de metilo

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

El ión cloruro es uno de los iones inorgánicos que se encuentran en mayor cantidad en aguas naturales, residuales y residuales tratadas, su presencia es necesaria en aguas potables. Un alto contenido de cloruros puede dañar la estructura metálica y evitar el crecimiento de las plantas.

Se utilizó un volumen de muestra de 25 mL; se ajustó el pH entre 7 y 10 utilizando las disoluciones de hidróxido de sodio (0.1 N) y/o ácido sulfúrico (0.1 N) (Fig. 2.4). A los 25 mL de muestra acondicionada en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se le adiciona 1 mL de disolución indicadora de cromato de potasio, valorar con una disolución patrón de nitrato de plata (0.014 N), hasta el viraje de amarillo a naranja rojizo. También se titula un blanco con la muestra como referencia (Fig. 2.5). Calcular la concentración de iones Cloruro en la muestra original, en mg/L como sigue:

$$\text{Cl-mg / L} = [(A - B) \times N \times 35,450] / \text{mL de muestra}$$

Donde:

- A** Son los mL de disolución de nitrato de plata gastados en la valoración de la muestra;
- B** Son los mL de disolución de nitrato de plata gastados en la valoración del blanco, y
- N** Es la normalidad del nitrato de plata.



Fig. 2. 4 Preparacion de disoluciones

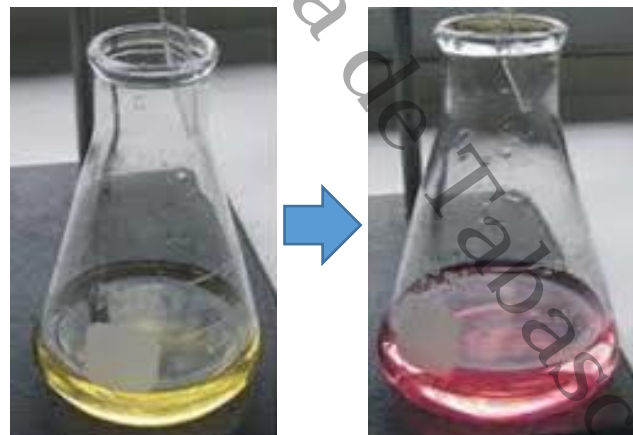


Fig. 2. 5 Titulacion con nitrato de plata

2.1.4 Análisis para la determinación de conductividad de acuerdo a la norma NMX-AA-093-SFCI-1986

La conductividad electrolítica es una expresión numérica de la capacidad de una solución para transportar una corriente eléctrica. Esta capacidad depende de la presencia de iones, de su concentración total, de su movilidad, valencia y concentración relativa así como la temperatura.

Para la medición de la conductividad se utilizó un conductímetro portátil marca HANNA modelo HI8633 (Fig. 2.6). En un vaso de precipitado de 25 mL se colocó una cantidad considerable de la muestra de agua congénita, se sumergió el electrodo en el agua congénita y se tomó la lectura; la prueba se realizó a una temperatura de 25°C.



Fig. 2. 6 Conductímetro marca HANNA modelo HI8633

2.1.5 Análisis para la determinación de pH de acuerdo a la norma NMX-AA-008-SCFI-2000

Para la medición del pH se utilizó un conductímetro portátil marca HANNA modelo HI8633 (Fig. 2.7) En un vaso de precipitado de 25 mL se colocó una cantidad considerable de la muestra de agua congénita, se sumergió el electrodo en el agua congénita durante 1 min para acondicionar el electrodo de vidrio y se tomó la lectura; la prueba se realizó a una temperatura de 25°C.



Fig. 2. 7 Conductímetro marca HANNA modelo HI8633

2.1.6 Analisis para la determinación de sólidos totales (ST) y sólidos suspendidos totales (SST) de acuerdo a la norma NMX-AA-034-SCFI-2015

Los sólidos y sales disueltas pueden afectar adversamente la calidad de un cuerpo de agua, un efluente o un proceso de varias formas.

- Medición de sólidos totales (ST):

Se selecciona el volumen de muestra de tal manera que el residuo seco sobre la cápsula se encuentre en un intervalo de masa de 2.5 mg a 200 mg. Transferir la muestra a la cápsula previamente puesta a masa constante y evaporar a sequedad en el horno de secado a $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Trasladar la cápsula al desecador y dejar enfriar por 20 min como mínimo. Llevar la cápsula a masa constante repitiendo el ciclo horno-dsecador hasta obtener una diferencia $\leq 0.0005\text{ g}$ en dos pesadas consecutivas.

Calcular el contenido de sólidos totales de las muestras como sigue:

$$ST = \frac{m3 - m1}{V} 1\ 000\ 000$$

Donde:

ST Son los sólidos totales, en mg/L;

m3 Es la masa de la cápsula con el residuo, después de la evaporación, en g;

m1 Es la masa de la cápsula vacía a masa constante, en g, y

V Es el volumen de muestra, en mL.

- Medición de sólidos suspendidos totales (SST):

Se homogeneiza la muestra mediante agitación vigorosa del envase, y se transfiere de forma inmediata y en un solo paso un volumen adecuado de muestra a una probeta, se filtra la muestra a través de un filtro colocado en el crisol Gooch, Enjuagar la probeta con el volumen suficiente para arrastrar los sólidos y verter en el filtro. Introducir el crisol Gooch con el filtro al horno a $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 1 h como mínimo y Posteriormente llevar a masa constante.

$$SST = \frac{m6 - m2}{V} 1\ 000\ 000$$

Donde:

SST Son los sólidos suspendidos totales, en mg/L;

m2 Es la masa del soporte de secado con el filtro antes de la filtración, en g;

m6 Es la masa del soporte de secado con el filtro, en g; y

V Es el volumen de la muestra, en mL.

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

Este método permite una estimación del contenido de grasas y aceites en aguas naturales, residuales y residuales tratadas, al determinar gravimétricamente las sustancias que son extraídas con hexano de una muestra acosa acidificada.

Medir el pH de las muestras el cual debe ser menor de 2, si no tiene este valor acidifique con ácido clorhídrico 1:1 ó ácido sulfúrico 1:1.

En un matraz de bola de fondo plano de 250 mL a peso constante preparar el material filtrante colocando un papel filtro en el embudo Büchner, colocar el embudo en un matraz Kitazato y agregar 100 mL de la suspensión de tierra de diatomeas-sílice sobre el filtro, aplicar vacío y lavar con 100 mL de agua. Transferir el total de la muestra acidificada al embudo Büchner preparado aplicando vacío hasta que cese el paso de agua. Medir el volumen de la muestra. Posteriormente se retira el filtro y se coloca en el horno de secado a 100°C por 20 minutos. Por último se coloca

en un equipo soxhlet para realizar la prueba durante el tiempo estipulado en la norma.

Calcular las grasas y aceites recuperables (G y A) en la muestra usando la siguiente ecuación:

$$G \text{ y } A \text{ (mg/L)} = (A - B) / V$$

Donde:

A es el peso final del matraz de extracción (mg);

B es el peso inicial del matraz de extracción (mg), y

V es el volumen de la muestra, en litros. Restar al resultado obtenido de la muestra, el valor del blanco de reactivo.

2.2 Parámetros biológicos

2.2.1 Conteo de células viables por el método de vertido en placa por diluciones en serie (Madigan *et al.*, 2012)

Con una pipeta estéril se transfirió 1 mL de la solución madre del agua congénita a un tubo de ensayo de 20 x 150 mm marca KIMAX, que contenía 9 mL de agua destilada estéril, teniendo así la primera dilución 10^{-1} . A partir de la dilución 10^{-1} se continuaron haciendo diluciones de hasta 10^{-6} . Por triplicado se colocaron las cajas de petri de vidrio estándar marca PYREX con medio de cultivo: agar dextrosa papa (ADP) para conocer los hongos totales en el agua congénita (Johnson y Curl, 1972). Se agregó al centro de cada una de las cajas 0.1 mL de las diluciones y se dispersó con un asa de digralsky por toda la superficie de la placa. (Fig. 2.8) Posteriormente, las cajas fueron invertidas y colocadas en bolsas de polietileno (las bolsas fueron previamente desinfectadas con alcohol etílico al 70 %) y guardadas en una incubadora biológica marca YAMATO a una temperatura de 28°C por un periodo de 72 horas (h) hasta que se expresaran los hongos. El material de vidrio fue esterilizado previamente a calor seco durante 8 h a 180°C en una estufa marca MEMMERT (Ramírez, 2001).

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIÓACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

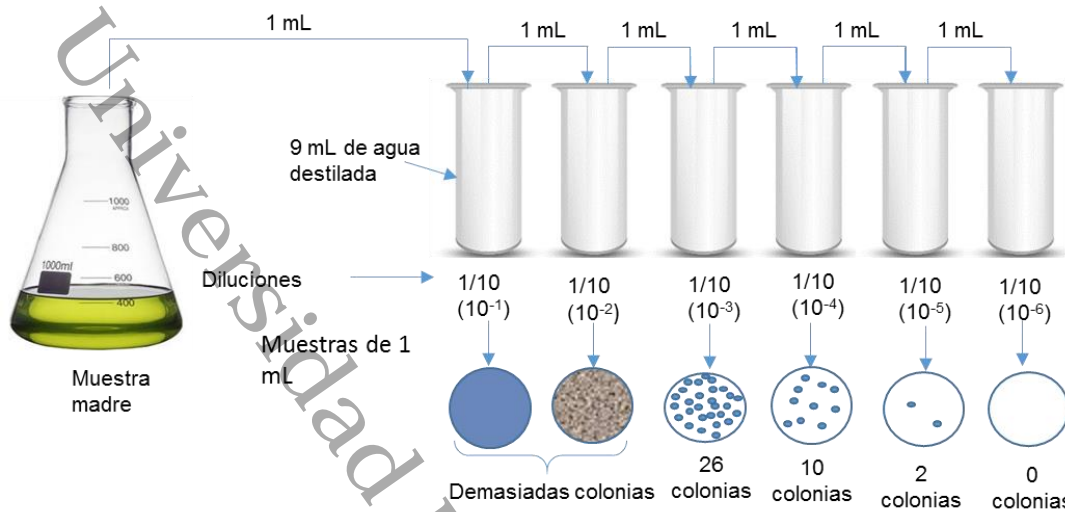


Fig. 2. 8 Determinación de viables por el método de placa utilizando diluciones seriadas (Madigan et al., 2012).

2.3 Obtención de microorganismos petrofilicos

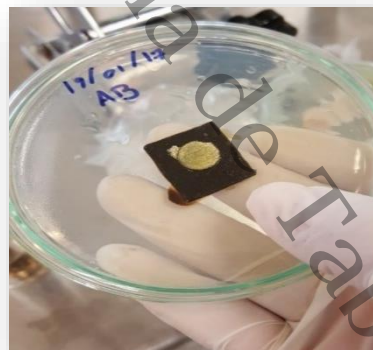
2.3.1 Fase I. Sobrevivencia en medio sólido.

Las cepas obtenidas del agua congénita fueron aisladas y purificadas mediante la técnica de sacabocado (Ojeda *et al.*, 2009) (Fig. 2.9). Las rodajas de hongos se colocaron en un cuadro de papel whatman No. 40 de 10 X 10 mm (previamente esterilizados e impregnado con petróleo) soportado en agar bacteriológico (Fig. 2.10). Posteriormente, las cajas fueron colocadas en una incubadora biológica marca YAMATO a 28°C y 72 horas; esto, con el objetivo de observar que cepas crecían radialmente.



a

Fig. 2. 9 Metodo de sacabocado (Ojeda *et al.*, 2009)



b

Fig. 2. 10 Aislamiento en agar bacteriológico

2.3.2 Fase II.- Degradación de petróleo en suelo contaminado

En esta fase las cepas fúngicas que sobrevivieron en el medio mineral solido fueron añadidas a un suelo impactado con petróleo, las cepas fueron reproducidas en un medio mineral liquido para su posterior vertido.

Para seleccionar el medio mineral, se estableció un bioensayo con un diseño factorial estadístico 3^2 con 3 réplicas. El bioensayo constó de 2 factores: factor 1 (3 tipos de microorganismos; cepa H1, cepa H2 y H5), factor 2 (3 tipos de fertilizantes; urea, triple 17 y nitrofoska).

2.3.2.1 Selección de medio mineral líquido

Para determinar el medio mineral donde se obtuviera el máximo crecimiento microbiano, se llevó a cabo el método propuesto por McFarland (1997); se prepararon 10 soluciones de cloruro de bario al 1 % y 10 soluciones de ácido sulfúrico al 1 % para medir la absorbancia, a 600 nm y obtener la curva de calibración. (Fig. 2.11)



Fig. 2. 11 Se prepararon soluciones de $BaCl_2$ y H_2SO_4 . La turbidez medida en un espectrofotómetro UV-VIS a 600 nm

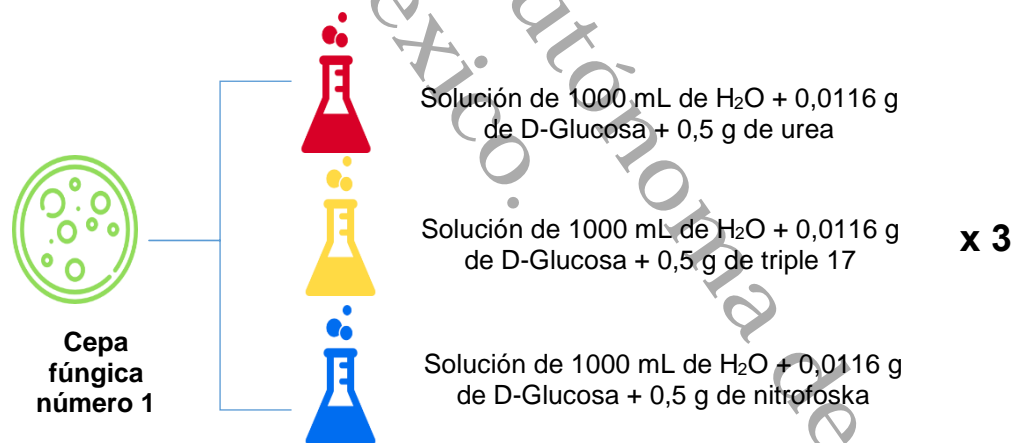
Se diseñaron biorreactores para determinar el medio mineral liquido con matraces erlenmeyer de 1000 mL marca CIVEQ, y un tapón de hule no. 9 trihoradado, a los cuales se les instalaron tres tubos de vidrio con un diámetro externo de 6 mm y diámetro interno de 4 mm. El primer tubo se utilizó como entrada de aire, el cual fue conectado a un compresor de aire de 1,5 watts marca ELITE 802, acoplado con un filtro microbiológico marca MILLIPORE para suministrar aire estéril y evitar así el paso de microorganismos no deseados (Ojeda, 2009); un segundo tubo se adaptó como toma de muestra a través de una venoclisid clínica y

evitar la introducción de microorganismos externos, y un tercer tubo que sirvió como venteo, y evitar que se sobrepresionara el sistema.

2.3.2.2 Bioensayo con biorreactores con sales minerales

Para la determinación del medio mineral para el posterior establecimiento de bioensayo, se establecieron por triplicado 3 biorreactores (tratamiento) para cada una de las tres cepas fúngicas. Los cuales tuvieron como base 1000 mL de agua destilada y 0,0116 g de D-Glucosa (como fuente de carbono); y 0.5 g de urea, 0.5 g de triple 17 y 0.5 g de nitrofoska respectivamente (Hernández-Rivera et al., 2011) (Fig. 2.12). El medio mineral líquido se esterilizó a calor húmedo en una autoclave a 121°C durante 20 min a 1,3 kg/cm² (Ramírez, 2001).

En cada tratamiento se inoculó una cepa fúngica, y se cuantificaron sus índices de absorbancia cada 24 horas durante 12 días en un espectrofotómetro UV-VIS a 600 nm. Para determinar el tratamiento con mayor crecimiento poblacional microbiano, se realizó un análisis de varianza y una prueba de medias Tukey ($\alpha=0,05$).



Las cepas fueron inoculadas en los diferentes biorreactores.

Fig. 2. 12 Diseño experimental de biorreactores con medio mineral líquido

2.3.2.3 Determinación de hongos petrofilicos

Una vez determinado el medio mineral se estableció un bioensayo para determinar si las cepas fúngicas son degradadoras de petróleo. El bioensayo consistió en 4 tratamientos. Cada tratamiento estuvo constituido por 1 kg de suelo contaminado con petróleo con una concentración conocida y una cepa fúngica con

3 réplicas además de un testigo. Las cepas seleccionadas fueron añadidas y se determinó cuantitativamente la degradación en la concentración de la fracción pesada y fracción media del petróleo para determinar su afinidad por el petróleo.

Esta determinación se realizó con base en la NORMA Oficial Mexicana **NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012**, que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación; en el apartado en la norma emergente **NMX-AA-134-SCFI-2006**, suelos-hidrocarburos fracción pesada por extracción y gravimetría. Método de prueba y la norma emergente **NMX-AA-145-SCFI-2008**, suelos-hidrocarburos fracción media por cromatografía de gases con detector de ionización de flama-método de prueba.

2.3.2.4 Ubicación y caracterización del suelo seleccionado para establecimiento de bioensayo

El estudio agrológico se realizó en el sitio localizado en 18°14'59" latitud Norte y 93°00'48" longitud Oeste, en la localidad de Tierra adentro 3ra. Sección Jalpa de Méndez, colindando con la localidad de Oxiacaque, Nacajuca, Tabasco.

2.3.2.4.1 Obtención de la muestra para determinar propiedades físicas

Se colectaron muestras de suelo seleccionadas según la norma oficial mexicana **NOM-021-SEMARNAT-2000**. Para para esto se obtuvieron muestras simples a una profundidad de 30 cm, cada 30 m, utilizando la técnica de zig-zag, obteniendo un total de 60 kg de suelo de 30 puntos de muestreo, se guardaron en bolsas de polietileno, que fueron selladas y etiquetadas con la siguiente información, nombre de la persona que tomó la muestra, fecha y hora de muestreo, nombre de la institución, lugar de muestreo y número de muestra, para posteriormente ser llevadas al laboratorio para su procesamiento y realizarse los análisis correspondientes.

2.3.2.4.2 Análisis físicos y químicos de las muestras de suelos

Los análisis físicos que se realizaron fueron los siguientes: determinación de textura del suelo por el procedimiento de Bouyoucos, determinación de la densidad aparente del suelo, Método (AS-03) de la NOM 021 SEMARNAT-2000,

determinación de la densidad real con picnómetro, método (AS04) de la NOM 021 SEMARNAT-2000 y la determinación de la humedad por el método NMX-AA-052 de la NOM 138 SEMARNAT-2003. Los análisis químicos realizados fueron: determinación de fósforo, calcio y magnesio por espectrofotometría de uv-vis el pH fue determinado a través de método (AS-02) de la NOM-021-021-SEMARNAT-2000, la medición de la temperatura se realizó a través de un termómetro de -20 a 150°C marca Brannan y la determinación de la materia orgánica por el método de Walkley y Black, método (AS-07) de la NOM 021 SEMARNAT-2000. El análisis biológico se realizó con el método de recuento en placa utilizando diluciones seriadas (Madigan *et al.*, 2012).

2.3.2.3 Bioensayo para la determinación de hidrocarburos

Para llevar a cabo el bioensayo, el suelo fue triturado y tamizado (Fig. 2.13), y posteriormente se contaminó a 10 000 ppm de petróleo ($\rho=0,79 \text{ g/cm}^3$). El suelo fue inoculado con las cepas fúngicas H1, H2 y H5 en el medio mineral seleccionado. (Fig. 2.14) Las variables medidas cada cinco días fueron los HFP. Por otra parte, los HFM se midieron al inicio y final del bioensayo para determinar su función como petrofílicas.



Fig. 2. 13 Tamizado y triturado de suelo



Fig. 2. 14 Biorreactores con nitrofoska

2.3.2.4 Determinación de hidrocarburos fracción pesada (HFP) en suelos por extracción y gravimetría, e hidrocarburos de fracción media (HFM) en suelos por cromatografía de gases con detector de ionización de flama

2.3.2.4.1 Hidrocarburos de fracción pesada.

A cada tratamiento se les determinó HFP, para esto, y de acuerdo a la norma NMX-AA-134-SCFI-2006, una porción de la muestra a analizar se mezcló con sulfato de sodio anhidro para obtener el material extraíble con hexano (MEH) mediante sonicación (Fig. 2.15). El MEH se concentró, secó y pesó; para posteriormente ser tratado con sílica gel estandarizada para la separación de compuestos polares y determinación gravimétrica. El bioensayo se estableció por un periodo de 20 días realizando un muestreo aleatorio cada cinco días, para analizar el porcentaje de degradación de HFP. (Fig. 2.16)



Fig. 2. 15 Sonicación del suelo con n-hexano y cepas fúngicas



Fig. 2. 16 Suelo contaminado con petróleo y cepas fungicas

2.3.2.4.2 Hidrocarburos de fracción media.

Esta fracción de petróleo fue analizada al inicio a la mitad y final del bioensayo. A cada tratamiento se le extrajeron muestras como lo indica la norma emergente NMX-AA-145-SCFI- 2008, para determinar los HFM. Las muestras se secaron con sulfato de sodio anhidro, se sometieron a sonicación con una mezcla de n-hexano: acetona en relación 1:1 (v/v). Los extractos orgánicos se concentraron en un Kuderna-Danish (K-D), a un volumen final de 2 mL y fueron guardados en viales color ámbar (Fig. 2.17); Cada extracto se hizo pasar por un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama (Fig. 2.18). La determinación cuantitativa

obteniendo como resultado, es un perfil de picos cuya separación está básicamente en función de los pesos moleculares de los hidrocarburos presentes.



Fig. 2. 17 Viales color ambar



Fig. 2. 18 Cromatografo de gases Marca Shimadzu Modelo GC-2010 plus

2.4 Identificación del género de las cepas fúngicas

Para la identificación biológica de las cepas fúngicas petrofílicas, éstas fueron analizadas en un microscopio electrónico de barrido (SEM) marca JEOL, modelo JSM-6010LA (Fig. 2.19); con el fin de observar el aparato reproductor de cada cepa. Para la preparación de las muestras se colocaron las muestras en glutaraldehído 3 % por 20 minutos para la fijación, posteriormente se sumergió en tetraóxido de esmio 1 % por 20 minutos, se sometió a concentraciones crecientes de etanol para la deshidratación desde 50 % a 99 % de concentración, se liofilizaron a -62°C y a 1.2 Pa, por el tiempo necesario y se cubrieron con aluminio.



Fig. 2. 19 Microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6010LA

OBJETIVO 2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE SUPERFICIE, TERMODINÁMICAS, FISICOQUÍMICAS Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE BIOTENSIOACTIVOS PRODUCIDOS POR CEPAS FÚNGICAS PETROFÍLICAS.

Una vez determinadas las cepas fúngicas, se establecieron en el laboratorio los biorreactores para que estos microorganismos sintetizaran biotensioactivos, y poder caracterizarlos mediante una batería de técnicas analíticas.

2.5 Establecimiento de biorreactores para la producción de biotensioactivos

Los biorreactores se diseñaron con matraces erlenmeyer de 2000 mL marca CIVEQ, y un tapón de hule no. 9 trihoradado, a los cuales se les instalaron tres tubos de vidrio con un diámetro externo de 6 mm y diámetro interno de 4 mm. El primer tubo se utilizó como entrada de aire, el cual fue conectado a un compresor de aire de 1,5 watts marca ELITE 802, acoplado con un filtro microbiológico marca MILLIPORE para suministrar aire estéril y evitar así el paso de microorganismos no deseados (Ojeda *et al.*, 2016); un segundo tubo se adaptó como toma de muestra a través de una venoclisis clínica y evitar la introducción de microorganismos externos, y un tercer tubo que sirvió como venteo para despresionar el sistema. (Fig. 2.20)

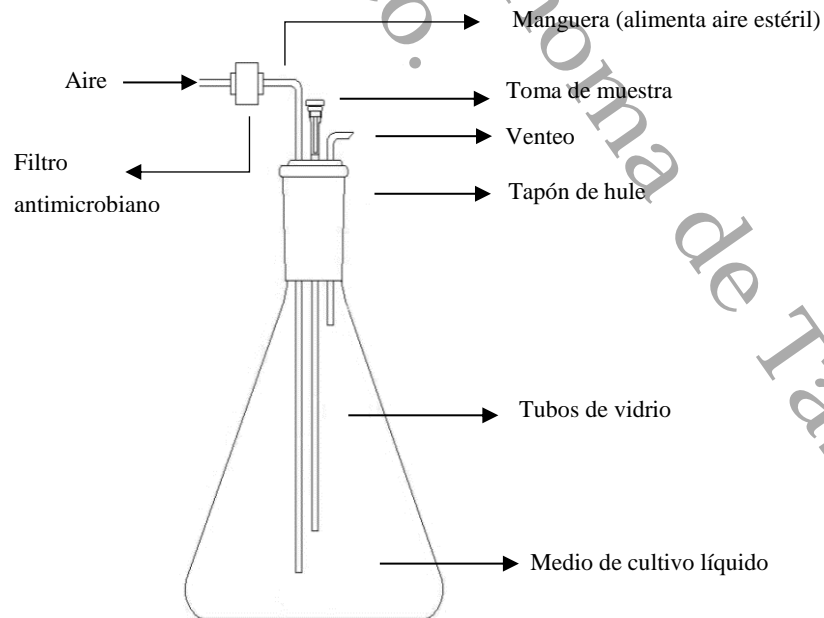


Fig. 2. 20 Representación del biorreactor utilizado para la producción del biotensioactivo (Ojeda *et al.*, 2016)

2.6 Inoculación de las cepas fúngicas en el medio productor de biotensioactivo

En un matraz erlenmeyer de 2000 mL se preparó el medio de cultivo "wunder" productor de biotensioactivo (Wunder *et al.*, 1997)(Fig.2.21). Cada matraz se esterilizó a calor húmedo en un autoclave a 121°C durante 20 min a 1,3 kg/cm² (Ramírez, 2001).

Fig. 2. 21 Medio de cultivo Wunder (T. Wunder *et al.*, 1997)

Reactivos	Cantidad (g/L)
Dextrosa	10
(NH) ₂ SO ₄	1
MgSO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄ (Monobásico)	0,875
K ₂ H ₂ PO ₄ (Dibásico)	0,125
NaCl	0,1
MnCl ₂ *4H ₂ O	0,05
CaCl ₂ *H ₂ O	0,1
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,001
Polipeptona	2

En un ambiente estéril, las placas de agar que contenían las cepas fúngicas petrofílicas fueron lavadas con un asa de platino, e inoculadas en el medio de cultivo. Una vez transcurrido el tiempo de fermentación, (6 días) los biorreactores fueron desarmados en condiciones axénicas para la extracción y purificación del biotensioactivo (Fig. 2.22).



Fig. 2. 22 Medio de cultivo después de la fermentación

2.7 Obtención de biotensioactivos puros

Después de la inoculación de las cepas fúngicas en los biorreactores que contenían el medio wunder, se procedió a realizar el procedimiento para la obtención y purificación del tensioactivo.

2.7.1 Filtración

Finalizado el tiempo de reproducción microbiana, la biomasa se retiró del medio de cultivo con ayuda de un matraz kitasato marca PYREX, y una bomba de vacío marca NOVATECH a 67,73 kilopascales (kPa), utilizando el método de filtración con succión (Silva, 2011). Para filtrar la biomasa, se empleó papel whatman No. 42, y se hizo pasar a través de un embudo buchner de porcelana de 9 cm de diámetro marca KAVALIER (Fig. 2.23).

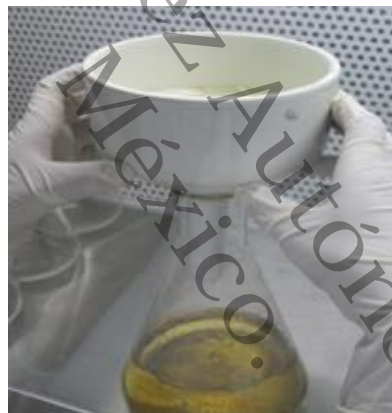


Fig. 2. 23 Filtrado de la biomasa microbiana

2.7.2 Centrifugación

Para eliminar la biomasa que logró pasar el filtro whatman No. 42, el caldo microbiano se hizo pasar por un proceso de centrifugado a 3000 rpm durante 30 min en una centrifuga marca LABNET (Fig. 2.24) (Almazán *et al.*, 2000).



Fig. 2. 24 Centrifugado del caldo microbiano

2.7.3 Primer lavado caldo-acetona

Para eliminar el grueso de las sustancias no tensioactivas, el caldo libre de biomasa se lavó con acetona A.C.S marca FERMONT a una temperatura de 4°C, empleando la relación caldo-acetona: 1:1,2. La acetona se añadió al caldo lentamente a flujo constante, donde se mezcló con ayuda de un termo-agitador marca CIVEQ a 855 rpm durante 15 min (Fig.2.25). En embudos de separación de 500 mL marca PYREX se dejó reposar hasta la precipitación de los sólidos (Fig. 2.26). La acetona fue eliminada en un evaporador rotatorio marca ECISHEL a una temperatura de 40°C y 30 rpm, hasta remover toda la acetona contenida en el caldo (Almazán *et al.*, 2000).



Fig. 2. 25 Separación de residuos no tensioactivos



Fig. 2. 26 Adición de la acetona al caldo

2.7.4 Segundo lavado: caldo-cloroformo-metanol

Este lavado se realizó mediante tres extracciones sucesivas del sobrenadante libre de células, con una mezcla cloroformo-metanol (2:1 v/v) (Almazán *et al.*, 2000).

La solución caldo-mezcla se preparó con una relación 1:1 (Mulligan *et al.*, 1989), y se homogeneizó la solución durante 10 min, después se depositó en embudos de separación de 500 mL durante 30 min. (Fig. 2.27).



Fig. 2. 27 Separación de fases por diferencias de densidades

2.7.5 Obtención del biotensioactivo

El caldo se separó del sobrenadante por diferencia de densidades, y fue llevado a un evaporador rotatorio a 35°C y 30 rpm hasta la sequedad (Fig. 2.28) Los extractos fueron colocados en viales de vidrio color ámbar y refrigerados a 4°C (Fig. 2.29) hasta su caracterización.



Fig. 2. 28 Biotensioactivos purificados



Fig. 2. 29 extracción de biotensioactivos

2.8. Identificación de lípidos polares asociados a la acción tensioactiva

La presencia de glicolípidos, lipopéptidos y fosfolípidos asociados a la acción tensioactiva en los biotensioactivos obtenidos, se determinó mediante

cromatografía en placa fina y mediante el uso de soluciones reveladoras (Hamilton y Hamilton, 1992).

Se prepararon placas de vidrio de silica gel para cromatografía en capa fina (tres placas para cada biotensioactivo), de 2 x 6 cm x 0,25 mm, una para cada determinación. Se le agregaron ocho microlitros (μL) a 1 cm del borde inferior de la placa y fueron sumergidas en un vaso de precipitado de 100 mL, con 25 mL de la solución disolvente y se dejó por 30 minutos. Las placas fueron secadas por 15 minutos para ser rociadas cada una con las soluciones reveladoras y ser secadas en una estufa marca MEMMERT a 105°C.

2.8.1 Preparación de las soluciones para la identificación de lípidos polares

Para la identificación de lípidos polares presentes en los biotensioactivos se preparó una solución disolvente, y tres soluciones reveladoras propuestas por Hamilton y Hamilton (1992) (Fig. 2.30).

La solución disolvente se preparó con cloroformo-acetona-metanol-ácido acético-agua usando la relación de 6:8:2:2:1 v/v, lo suficiente para que las placas de cromatografía queden sumergidas, y pueda acarrear ascendentemente los componentes a lo largo de la placa produciendo "manchas" de los lípidos presentes en la muestra (Hamilton y Hamilton, 1992).

La solución reveladora de los glicolípidos se preparó disolviendo 2 g de difenilamina en 20 mL de etanol, y se agregaron 100 mL de ácido clorhídrico concentrado y 80 mL de ácido acético a la solución; la placa se roció con la solución y se calentó a 105°C por 15-30 min, los glicolípidos aparecerán como zonas azul-gris sobre un fondo ligeramente gris (Hamilton y Hamilton, 1992).

Para la solución reveladora de los lipopéptidos, una solución de ninhídrina se preparó al 2 % en etanol. La placa se roció con la solución, y se calentó a 100°C por 5-10 min. Los compuestos como la fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y sus derivados, aparecieron como manchas rojo-violeta (Hamilton y Hamilton, 1992).

La solución reveladora de los fosfolípidos se preparó disolviendo 0,01 g de azul de bromotimol en 100 mL de solución de NaOH 0.01 M, la placa se roció con la solución y se calentó a 100°C, los fosfolípidos aparecieron como zonas amarillas sobre un fondo azul (Hamilton y Hamilton, 1992)



Fig. 2. 30 Soluciones reveladoras: glicolípidos, lipopéptidos y fosfolípidos

2.9 Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier (FT-IR)

Las muestras de los biotensioactivos puros sintetizados por las cepas fúngicas se caracterizaron estructuralmente mediante espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier (FT-IR); para soportar los resultados obtenidos por cromatografía en placa fina, las muestras de los biotensioactivos se colocaron sobre una pastilla de KBr (sigma Aldrich grado FT-IR). Posteriormente se analizaron en un espectrómetro FT-IR Shimadzu modelo IRAffinity-1 (Fig. 2.31), en un intervalo de 750-4500 cm^{-1} , a una resolución de 2 cm^{-1} y 40 escaneos, los datos obtenidos fueron procesados con el software IRsolution™.

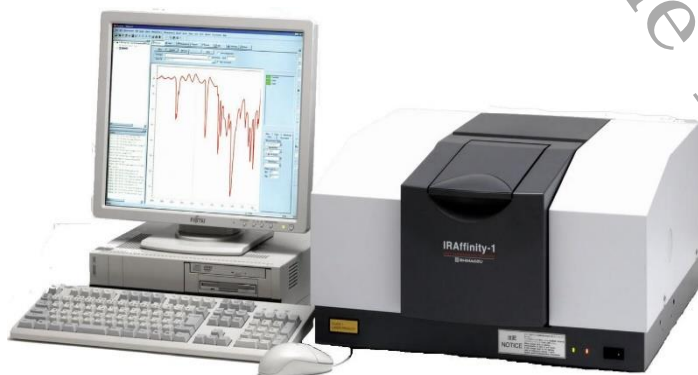


Fig. 2. 31 Espectrómetro FT-IR Shimadzu

2.10 Análisis elemental del biotensioactivo puro

Se realizó el análisis elemental del biotensioactivo por el método de energía dispersiva de rayos X, para ello se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM) marca JEOL, modelo JSM-6010LA. (Fig. 2.32).

Para el análisis de las muestras de biosurfactante, éstas se fijaron sobre una cinta de carbono de doble cara en un porta-muestra de acero, fueron metalizadas y observadas en el microscopio electrónico de barrido en condiciones de bajo vacío (Ojeda *et al.*, 2016).



Fig. 2. 32 Microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6010LA

2.11 Determinación de la tensión superficial del biotensioactivo puro

Para determinar la tensión superficial se utilizó el método del plato, también conocido como el método de Wilhelmy descrito por Álvarez *et al.*, (2009), puesto que no se requiere correcciones para la forma del menisco. Este método nos permite obtener la tensión superficial estática de la solución, aplicables en interfases líquido-aire (Schukin *et al.*, 1988).

La técnica consiste en medir la fuerza ($P\omega$) con la que un líquido jala al plato de platino de geometría conocida. Se pone en contacto el plato de platino con el líquido, y éste salta hacia el plato y lo jala hacia el seno del mismo (Fig. 2.33). La superficie del plato es áspera para que el líquido moje mejor el plato.

Para calcular la tensión superficial, el tensiómetro usa la siguiente fórmula:

$$\sigma = \frac{P\omega}{l_b \cos \theta}$$

Donde:

σ : Tensión superficial.

$P\omega$: Fuerza con la que el seno del líquido jala el plato.

l_b : Longitud de mojado (2 veces la longitud del plato más 2 veces su espesor).

θ : Angulo de contacto entre el plato y la superficie del líquido, donde $\cos \theta = 1$ para un plato limpio y en perfectas condiciones.

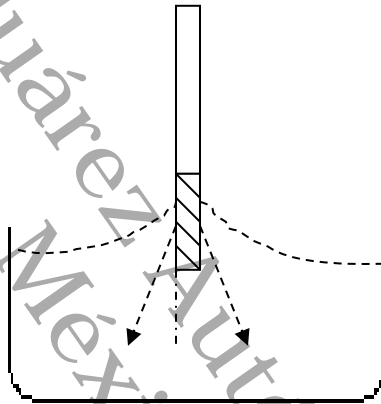


Fig. 2. 33 Vista transversal del plato mojado (Álvarez, 2009)

Las mediciones de tensión superficial estática fueron realizadas en un tensiómetro digital Krüss modelo K 10 ST (Fig. 2.34), el cual permite hacer mediciones de tensión superficial e interfacial de líquidos a una temperatura controlada.

El equipo cuenta con dos geometrías de medición: anillo y plato; por razones de exactitud en la medición de la tensión superficial absoluta se utilizó el plato, debido a que las mediciones hechas con el anillo, requieren de una corrección posterior. Las dimensiones del plato utilizado son 0,1 mm de espesor, 19,9 mm de longitud y una longitud de mojado de 40 mm.



Fig. 2. 34 Tensiómetro digital Krüss modelo K 10 ST (Álvarez, 2009)

Se prepararon diluciones de biotensioactivo/agua grado HPLC a una concentración de 1, 0,7, 0,4, 0,2, 0,1, 0,04, 0,01, 0,001 % p/p. Las diluciones fueron pesadas en viales de 30 mL con agua grado HPLC y tapadas en su interior con cinta teflón para mayor seguridad de sellado, las muestras se dejaron en un baño isotérmico Bis-120 a una temperatura de 35°C por 48 horas para su estabilización. Una vez estabilizadas las diluciones se procede a realizar las mediciones de tensión superficial, para ello es necesario lavar el porta muestra con agua desionizada caliente y posteriormente limpiarla con acetona. Se coloca la dilución en el porta muestra, el cual es colocado dentro de la cámara de calentamiento y se deja estabilizar por un lapso de 15 minutos para homogenizar la muestra a esta temperatura. Durante las mediciones, se deja transcurrir un tiempo de seis minutos para la toma de la lectura. Se tomaron tres lecturas por muestra y se reporta el promedio estadístico de éstas. Las mediciones se realizaron a 30°C.

El tensiómetro fue verificado inicialmente con agua HPLC para obtener una lectura de la tensión superficial aproximadamente de 71,2 N/m, a 30°C.

2.12 Determinación de la concentración micelar crítica (CMC).

La concentración a la cual las micelas se comienzan a formar, se define como la CMC. Ésta se determina por un repentino cambio en la tensión superficial, viscosidad, densidad, etc. La CMC de los biotensioactivos se determinó

representando gráficamente la tensión como una función de la concentración (Álvarez et al., 2009).

El procedimiento es medir la tensión superficial de soluciones de concentración creciente de surfactante dejando un tiempo para equilibrar la superficie con el interior de la solución. Una vez que varias mediciones sucesivas dan el mismo valor dentro de mN/m, se grafica el valor promedio de dichas mediciones en función del logaritmo de la concentración, (Fig. 2.35) La CMC se determinó como el punto en que la tensión superficial se hace casi independiente de la concentración.

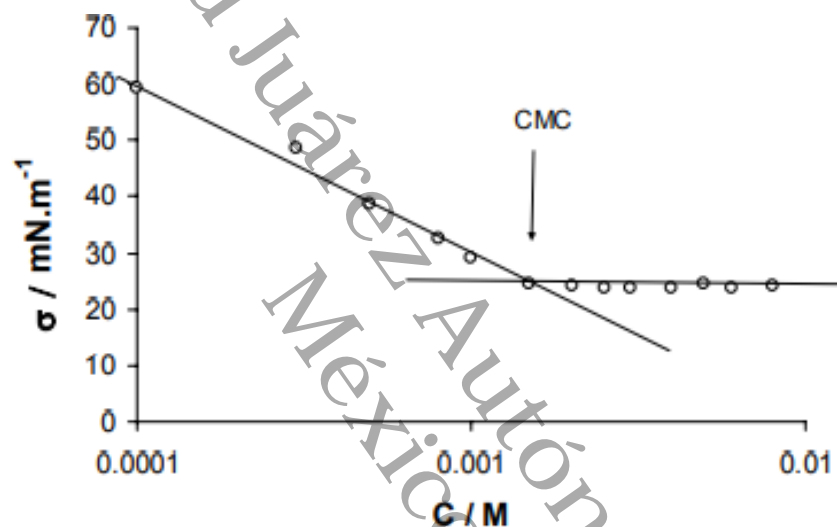


Fig. 2. 35 Concentración micelar crítica de un tensioactivo (Alvarez *et al.*, 2011)

OBJETIVO 3.- EVALUACIÓN DE LA MOJABILIDAD DEL BIOTENSIOACTIVO SOBRE UNA SUPERFICIE SÓLIDA CON CARACTERÍSTICAS DE YACIMIENTOS, A TRAVÉS DEL ÁNGULO DE CONTACTO

2.13 Determinación del ángulo de contacto del biotensioactivo

Las superficies modelo a utilizar fueron portaobjetos de microscopio, 60 X 20 X 1 mm; para la preparación de las heterogeneidades sobre estas superficies se utilizó el octadeciltriclorosilano (OTS) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{SiCl}_3$ (PM=387,94, pureza 95 %) y agua destilada (Araujo *et al.*, 2012).

2.13.1 Alteración de la mojabilidad mediante el uso de un biotensioactivo en un sistema sólido-líquido

Previo al tratamiento para crear los efectos de mojabilidad (reacción de silanización) sobre las láminas de vidrio, éstas se sometieron a un procedimiento riguroso de limpieza descrito por Araujo *et al.*, (1999), que es una modificación del método sugerido por Maoz y Sagiv *et al.*, (1984), este procedimiento garantiza superficies perfectamente mojadas al agua.

2.13.2 Limpieza de sustratos (láminas de vidrio)

Las placas de vidrio fueron sometidas a una limpieza en condiciones ultrasónicas seguida de un remojo en solución de H₂SO₄ (98 %) y H₂O₂ (30 %) con calentamiento 90°C por tres días. A continuación, se realizaron lavados con agua destilada hasta igualar el pH del agua (7±0.2). Posteriormente se remojaron en una solución de HNO₃ 5M por tres días, enseguida se realizaron lavados generosos con agua destilada. De la misma manera, se elabora una solución KOH 4M y se calienta (50°C±1) en un vaso de precipitado, posteriormente las láminas de vidrio se sumergieron durante 3 minutos. Nuevamente, las láminas de vidrio se remojaron en una solución de HNO₃ 5M por 1 día, y se enjuagaron con agua destilada hasta igualar el pH de la misma. Por último, se secaron en un horno a 80°C por 8 horas. El grado de limpieza se determinará mediante medidas del ángulo de contacto.

2.13.3 Modificación de las superficies

Sobre las láminas de vidrio limpias se crearon las condiciones de mojado, realizando un remojo en una solución de octadeciltriclorosilano (OTS) por lapsos de 5 min, y retirándolas rápidamente una vez cumplido este tiempo. Después que ocurre la reacción, los sustratos se secaron a 100°C durante 10 horas y luego se enfriaron en un desecador a vacío. Las láminas se utilizaron inmediatamente (Araujo *et al.*, 2007). Estas modificaciones se hicieron con el fin de poseer la condición básica de mojado sobre una superficie mineral, al petróleo, que servirán de patrón para la aplicación del biotensioactivo, y de este modo, inferir el comportamiento sobre diferentes condiciones de mojado.

2.13.4 Medidas de ángulo de contacto

Como indicador de la mojabilidad de las láminas de vidrio se utilizó el ángulo de contacto externo formado por diferentes concentraciones de emulsiones de biotensioactivo y una muestra de petróleo crudo MAYA de 26° API, sobre las láminas sumergidas en agua destilada; además de diferentes concentraciones emulsiones formadas por 2 tensioactivos químicos y el petróleo, esto con el fin de tener una comparación y determinar si los biotensioactivos, serían capaces de cambiar la mojabilidad de un yacimiento petrolero al igual que los tensioactivos químicos. El ángulo de contacto externo se refiere al ángulo formado por uno de los lados de la gota y una línea que se extiende desde un lado adyacente. Se utilizó una celda rectangular de vidrio (Meléndez *et al.*, 2010), y se dispuso una gota de 10 μL de la emulsion (biotensioactivo/petróleo y tensioactivos químicos/ petróleo). Se tomaron fotos con una cámara de fotos Nikon D80 conectada a una P.C. Sobre el conjunto de fotos se midieron los ángulos de contacto, con un programa de análisis de imagen (imageJ). El volumen de las gotas se controló con una micropipeta que garantizaba la repetitividad del procedimiento (Luengo *et al.*, 2017). La superficie debe estar en contacto con el agua por un período de siete a diez días para asegurar el equilibrio químico con el agua.

Capítulo 3 Resultados y discusiones

3.1 Caracterización de agua congénita

De acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-143-SEMARNAT-2003, se midieron los parámetros que establecen las especificaciones ambientales para el manejo de agua congénita asociada a hidrocarburos. La cual se obtuvo del activo petrolero Samaria-Luna. En la siguiente tabla (Fig. 3.1) se muestran los resultados de los parámetros.

Fig. 3.1 Tabla de resultados de análisis de agua congénita

Parámetro	Resultado	Morales-Bautista et al.,2016	Limites máximos	Unidades
Potencial de hidrógeno	6.58 a 25°C	5.01 a 25°C	5 a 10	Unidades de hidrógeno
Turbiedad	120	220		NTU(unidades neferenométricas)
Sólidos totales	119,376	95,687	32,000	mg/L
Sólidos suspendidos totales	490	4	200	mg/L
Alcalinidad	300	15		mg/L
Cloruros totales	93,701	40	250	mg/L
Conductividad	2.579	1.44		mS/cm
Grasas y aceites	11.6		25	mg/L

3.2.- Obtención de células viables

3.2.1.- Cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) totales del agua congénita

Las siguientes cepas fúngicas (Fig.3.2) totales se obtuvieron con el método de siembra por extensión en agar dextrosa papa mediante la técnica de determinación de viables por el método de sembrado en placa utilizando diluciones seriadas

(Madigan *et al.*, 2012). A continuación, se presentan las diluciones realizadas del agua congénita de la dilución -1 hasta la -6. Cabe destacar que de la dilución -2 fueron aisladas por separadas 9 tipos de cepas con características visibles diferentes y clasificadas de la H1 a la H9 para cada UFC.

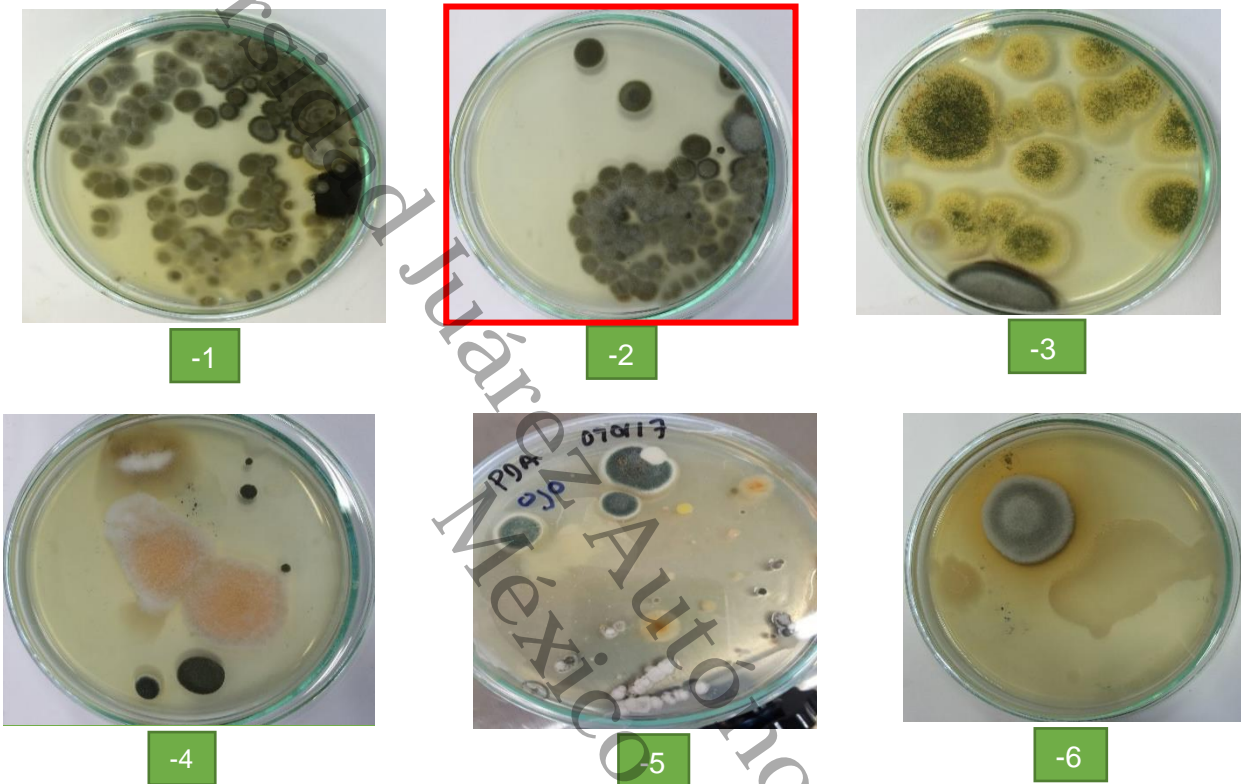


Fig. 3. 2 Cepas fúngicas obtenidas de diluciones -1,...,-6

3.3 Determinación de microorganismos fúngicos petrofilicos

Fase I. Supervivencia en medio sólido

De las 9 cepas fúngicas impregnadas con petróleo como única fuente de carbono se observó que las cepas H1, H2, H3, H5 y H6 (Fig. 3.3), se expresaron en dichas condiciones, sin embargo, las cepas H1, H2 y H5 (Fig. 3.4) tuvieron un mejor crecimiento radial (1.5, 1.7 y 1.8 mm/día respectivamente); según lo reportado por Rivera-Cruz *et al.*, (2004) quienes utilizaron este método para la selección de microorganismos adaptables al petróleo como única fuente de carbono; el crecimiento radial puede sugerir que las cepas fúngicas sintetizan más enzimas para degradar hidrocarburos del petróleo, motivo por el cual solo estas cepas fueron utilizadas para la siguiente fase.

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

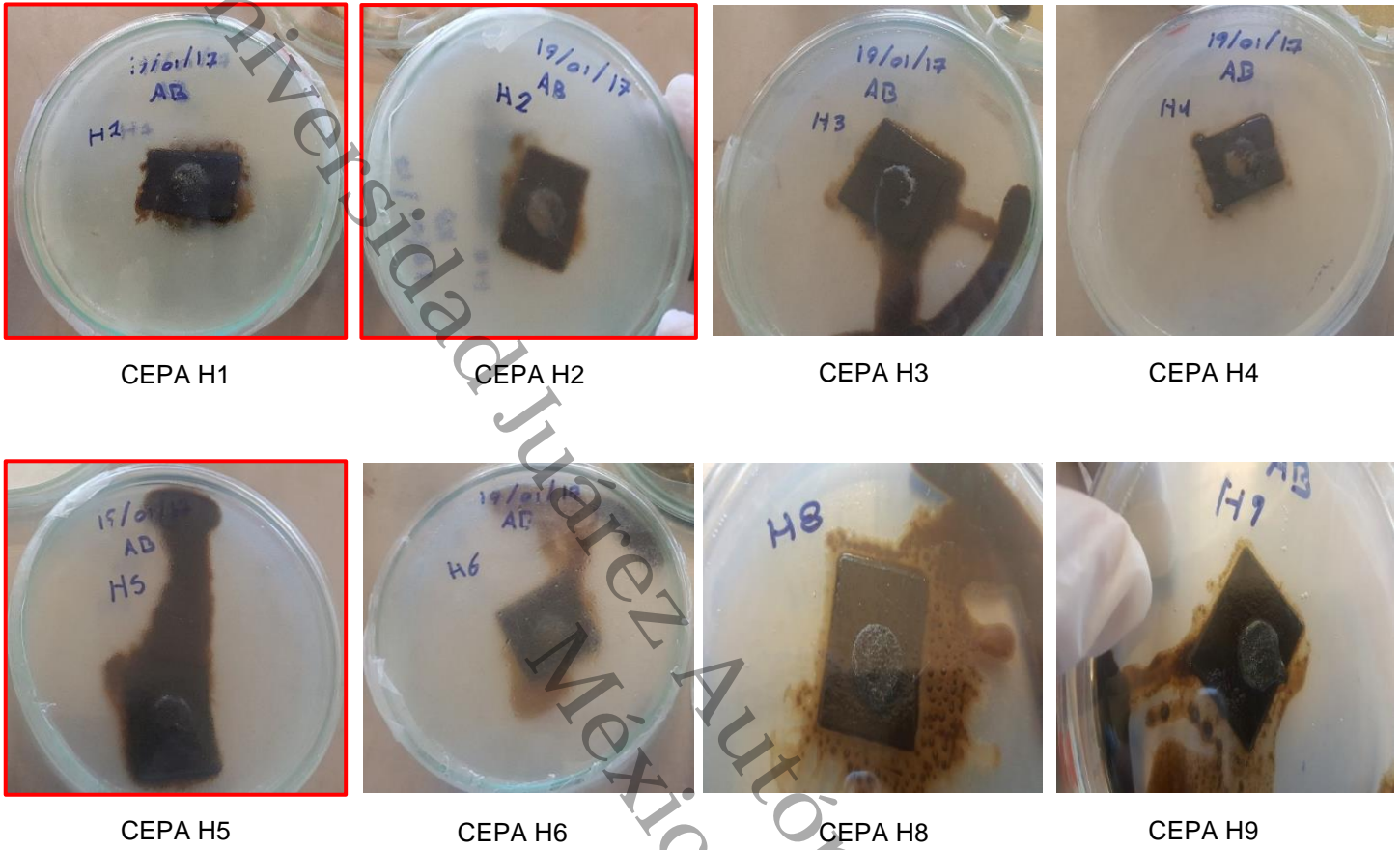


Fig. 3. 3 Crecimiento de microorganismos en medio sólido agar microbiológico con petróleo como única fuente de carbono



Fig. 3. 4 Cepas fúngicas inoculadas y expresadas después de 72 horas

3.4 Determinación del medio de cultivo para la reproducción celular

Fase II Selección del fertilizante (medio mineral líquido)

De acuerdo con los tratamientos realizados a los biorreactores con el medio mineral líquido que contenían las cepas fúngicas seleccionadas (H1, H2 y H5), y los tres diferentes fertilizantes nitrogenados (urea, triple 17 y nitrofoska), el ensayo biológico mostró un crecimiento de biomasa, como lo demuestra la turbidez gradual de los medios de cultivo sumergidos. Se realizó un análisis ANOVA en donde se observó que el máximo crecimiento para las tres cepas fúngicas se tuvo en los biorreactores que contenían nitrofoska (N amoniacal=7%, N nítrico=5%; Fosforo=8%, Potasio=16%, Azufre=24.96%, Magnesio=3%, Boro=0.02%, Hierro=0.06% y Zinc=0.01%). A continuación, se muestran los gráficos obtenidos del análisis estadístico (Fig. 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8). Los resultados se asemejan a lo reportado por Hernández-Rivera *et al.*, (2011) quienes evaluaron el desarrollo de una cepa bacteriana petrofílica utilizando un arreglo factorial 3x4 completamente al azar, con tres fertilizantes (urea, triple 17 y nitrofoska) y sales puras (juntas). Al finalizar obtuvieron mayor crecimiento con los fertilizantes triple 17 y nitrofoska.

En este experimento se usó un diseño factorial completamente aleatorizado de dos factores (3x3). Los factores principales fueron: cepa fúngica y fertilizante. Se empleó el paquete estadístico Statgraphics Centurion™ V. XVIII, a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

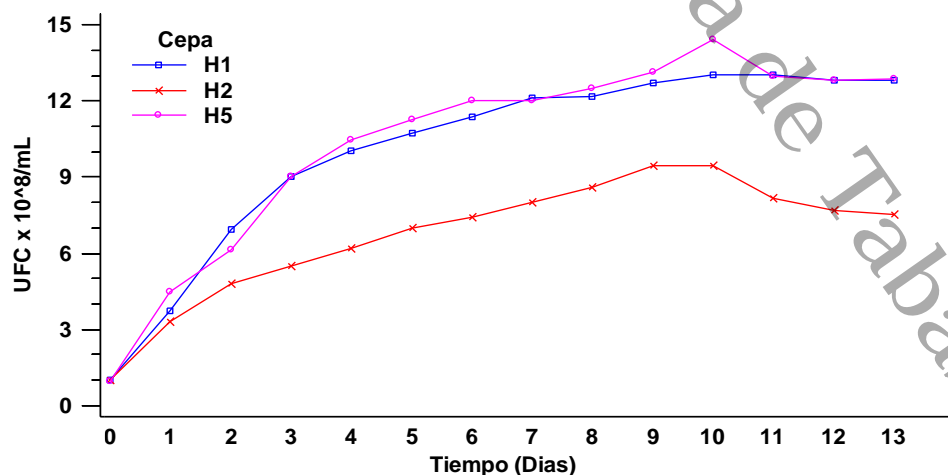


Fig. 3. 5 Gráfica que representa las UFC de las tres cepas fúngicas con respecto al tiempo

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

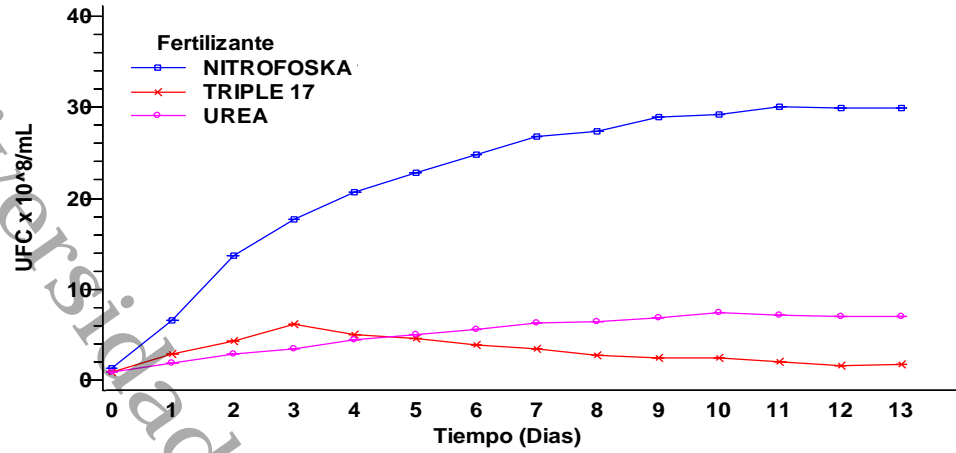


Fig. 3. 6 Gráfica que representa el crecimiento de UFC de la CEPA H1 con los tres diferentes fertilizantes

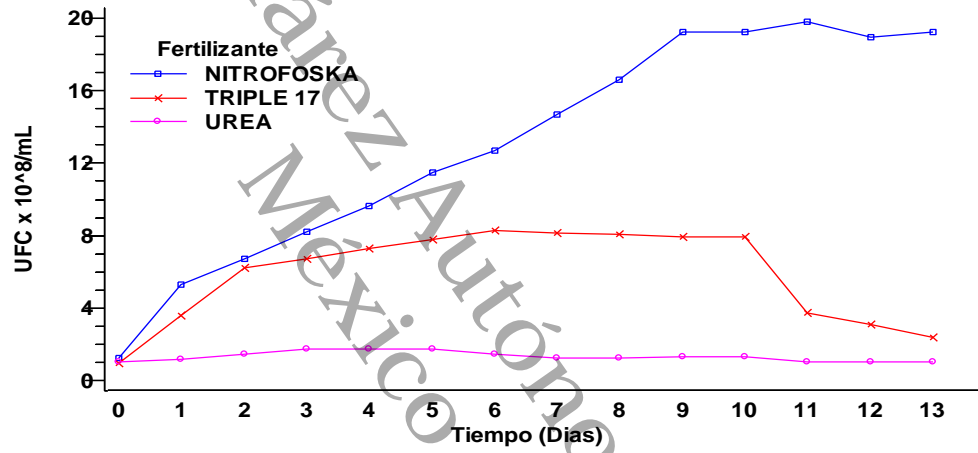


Fig. 3. 7 Gráfica que representa el crecimiento de UFC de la CEPA H2 con los tres diferentes fertilizantes

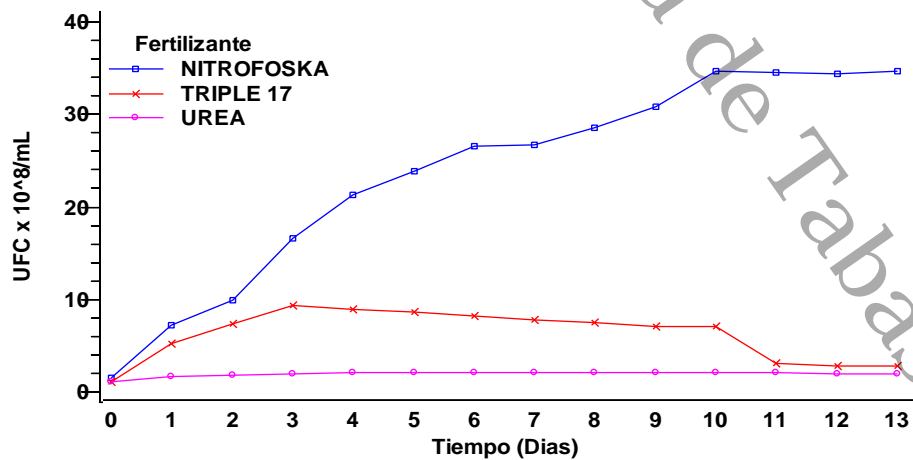


Fig. 3. 8 Gráfica que representa el crecimiento de UFC de la CEPA H5 con los tres diferentes fertilizantes

3.5.-Caracterización del suelo seleccionado para establecimiento de bioensayo y evaluación de hongos petrofílicos

El suelo analizado en este estudio es un suelo arcillo-limoso con características de suelos minerales, debido a que contienen menos del 20 % de materia orgánica, y el contenido de carbono orgánico es menor al 11 % (IUSS-ISRIC and FAO, 2006). Este comportamiento puede ser debido a que las contribuciones del material orgánico están dados mayormente por los aportes de la biomasa aérea (Gaffaney *et al.*, 1996).

En cuanto al contenido del fósforo en el suelo se encontró dentro de clase alta con 35.32 ppm (DOF, 2001), lo anterior indica que existe un historial de fertilidad importante (Córdova-bautista, 2009). (Fig.3.9)

Fig. 3. 9 Caracterización del suelo de Jalpa de Méndez, Tabasco

<i>Tipos de análisis</i>	<i>Determinación</i>		<i>Resultado</i>	
Físicos	Textura	Arcilla (% masa)	49	
		Limo (% masa)	41	
		Arena (% masa)	10	
		Clasificación	Arcillo-limoso	
		Densidad aparente (g/cm ³)	1.0561	
		Densidad real (g/cm ³)	1.0565	
		Humedad (% masa)	23.546	
		Temperatura	30	
	Químicos	pH		6.5
		Carbón orgánico (%)		2.43
Materia orgánica (%)			4.19	
Carbono del extracto (%)			1.716	
Fosforo (mg kg ⁻¹)			35.32	
Magnesio (cmol kg ⁻¹)			8.22	
Calcio (cmol kg ⁻¹)			22.6	
Biológicos	Conteo de células viables		104x10 ⁺⁴	
	(UFC.g ⁻¹ de suelo)			

3.5 Hidrocarburos de fracción pesada (HFP) en suelos en suelos por extracción y gravimetría

En los tratamientos con suelo con petróleo y tratados con las cepas fúngicas H1, H2 y H5 inoculadas en el medio nitrofoska, se observó que hubo una disminución en la degradación de hidrocarburos fracción pesada, en comparación con el suelo contaminado testigo, en el cual el porcentaje de remoción de petróleo no tuvo un cambio significativo durante el experimento. Como puede observarse a continuación (Fig. 3.10), se muestra la remoción de petróleo utilizando dos cepas de *Aspergillus sp.* y una *Penicillium sp.* La mayor remoción se obtuvo en el tratamiento con *Penicillium sp* (20.5 %). De acuerdo a Ojeda (2009), reportaron que los hongos son una tecnología apropiada para la degradación de petróleo en fracción pesada debido a que desarrollaron hifas que tienen la capacidad de degradar hidrocarburos de tipo ramificado.

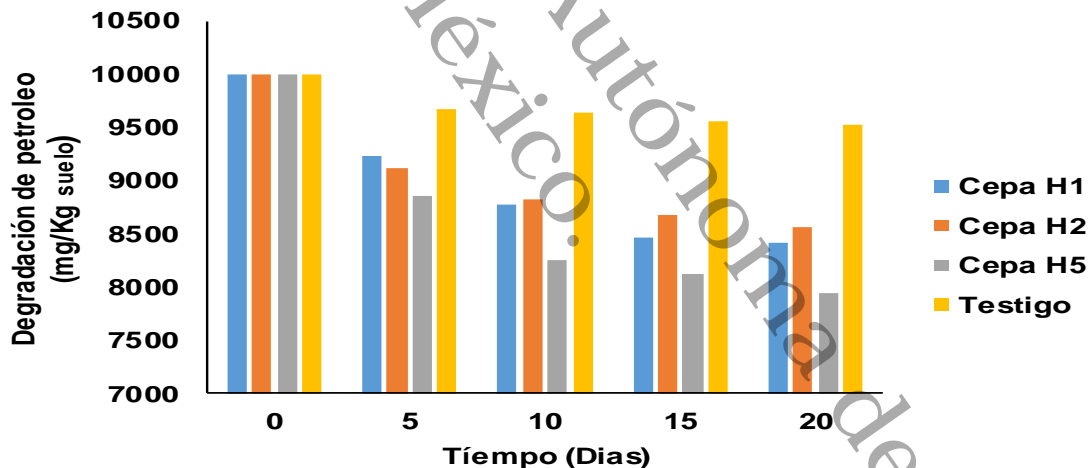


Fig. 3. 10 Degradación de hidrocarburos fracción pesada

3.6 Hidrocarburos de fracción media (HFM) en suelos por cromatografía de gases con detector de ionización de flama

De los tratamientos contaminados tratados con el medio mineral líquido (nitrofoska) que contenía las cepas fúngicas, se determinó que hubo una disminución en los porcentajes de ppm de hidrocarburos de la fracción media, en

los tres tratamientos, en comparación con el suelo contaminado testigo, el cual su porcentaje en ppm no tuvo un cambio significativo, como puede observarse en las Fig. 3.11, 3.12, 3.13 y 3.14, los cuales tuvieron un porcentaje de degradación de 38, 91, 15 y 5 % respectivamente. Por lo que se puede deducir que los hidrocarburos de fracción media fueron degradados por acción de los hongos; Oudot, *et al.*, (1993) que reportaron que los hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* son buenos degradadores de petróleo tanto de fracción pesada como de fracción media.

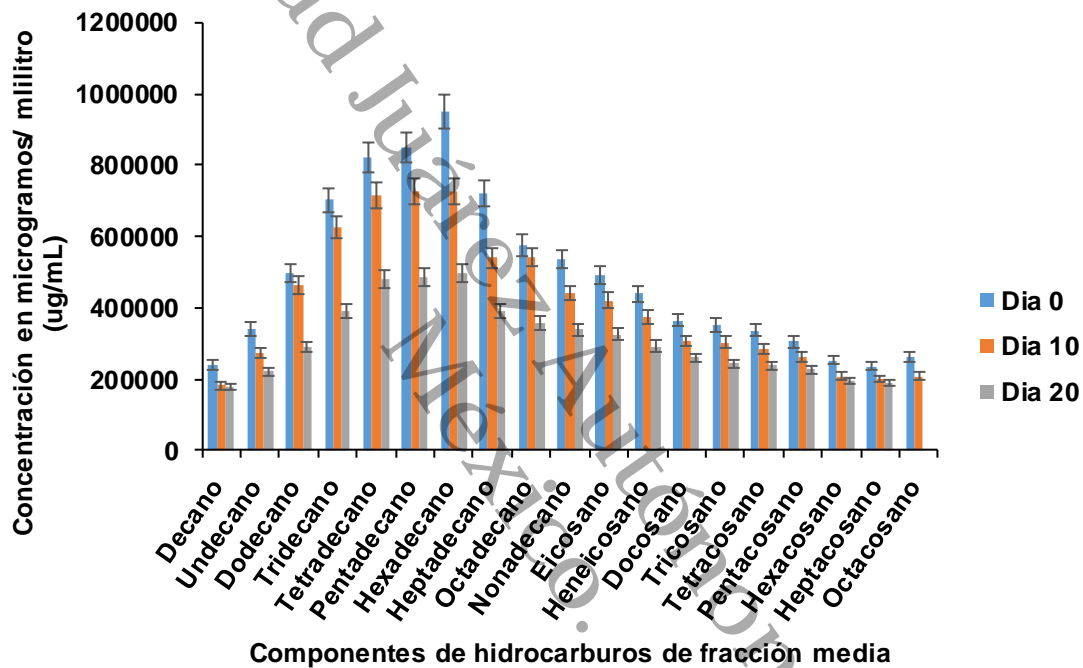


Fig. 3. 11 Degradacion de hidrocarburos fracción media de la cepa H1 *Aspergillus sp*

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

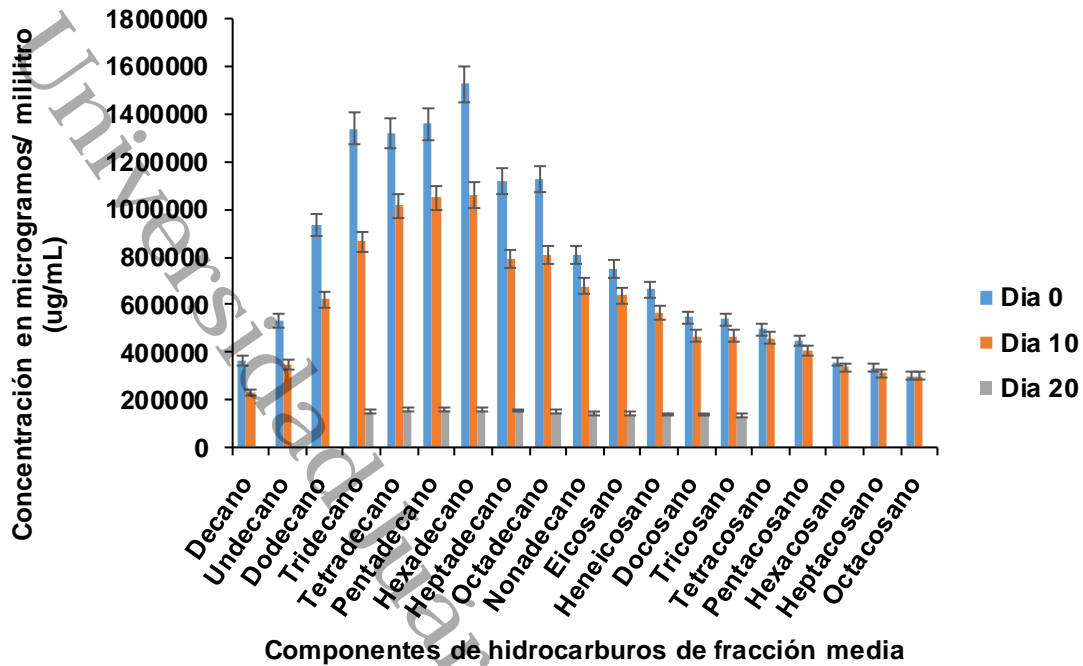


Fig. 3. 12 Degradación de hidrocarburos fracción media de la cepa H2 *Aspergillus sp*

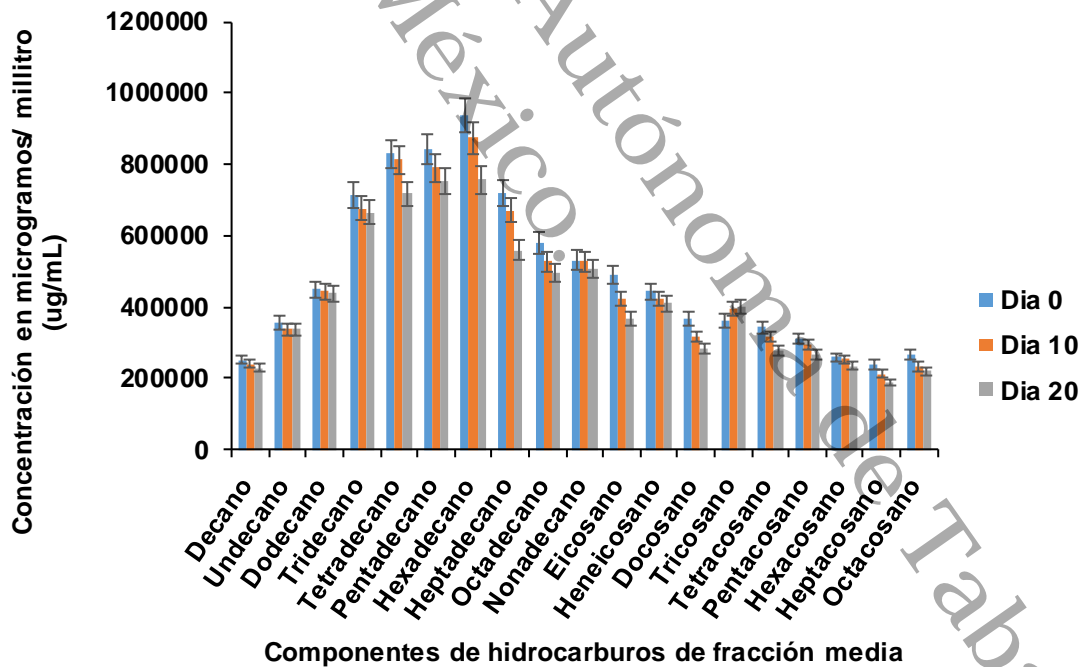


Fig. 3. 13 Degradación de hidrocarburos fracción media de la cepa H5 *Penicillium sp*.

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

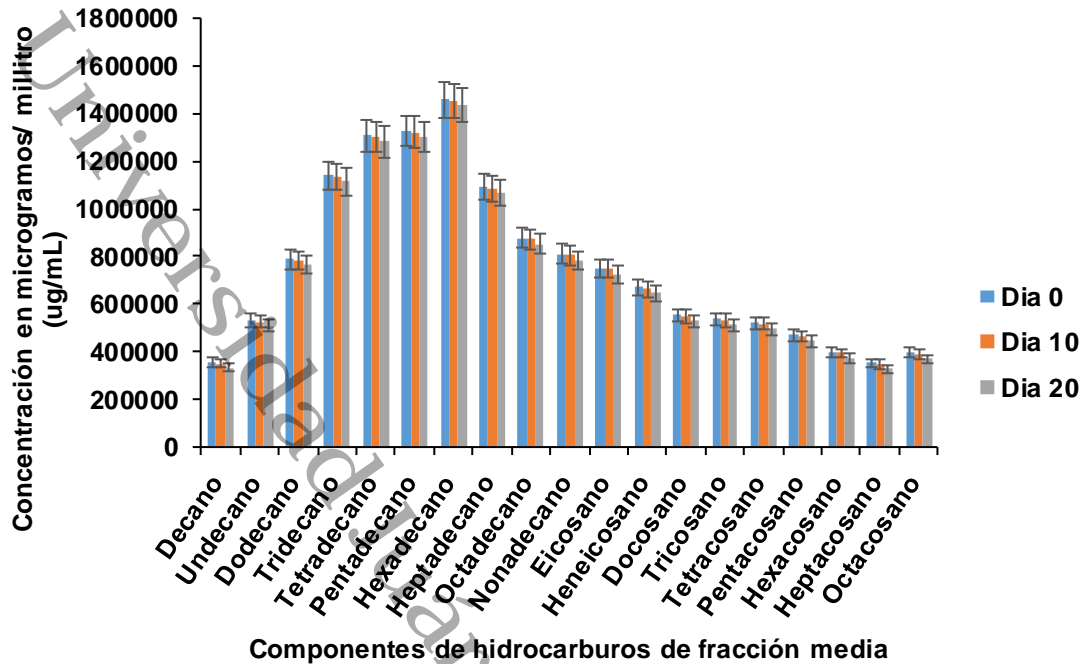


Fig. 3. 14 Degradacion de hidrocarburos fracción media del suelo testigo

3.7 Identificación del género de las cepas fúngicas

Las evaluaciones de las características fisiológicas del MEB revelaron que de las tres cepas analizadas, 2 hongos la cepa H1 y H2, corresponden al mismo género: **Aspergillus sp** (Fig. 3.15 y 3.16) y la cepa H5 corresponde a un **Penicillium sp** (Fig. 3.17), esto fue constatado de acuerdo al libro especializado en microbiología de **Koneman, MD., (2006)**. (Biología de los microorganismos)

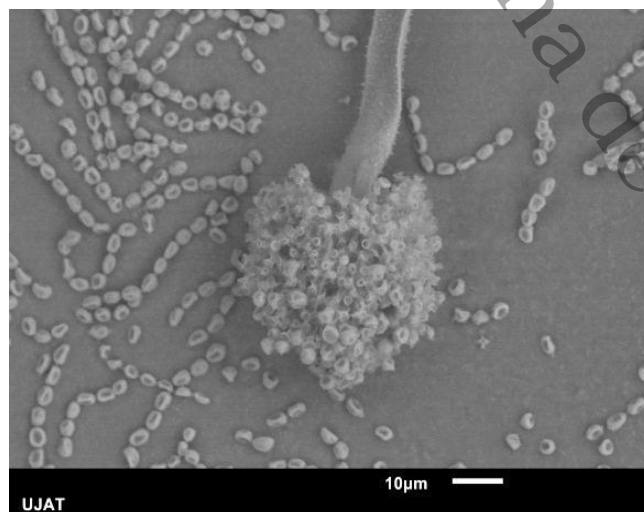


Fig. 3. 15 Cepa H1: Aspergillus sp

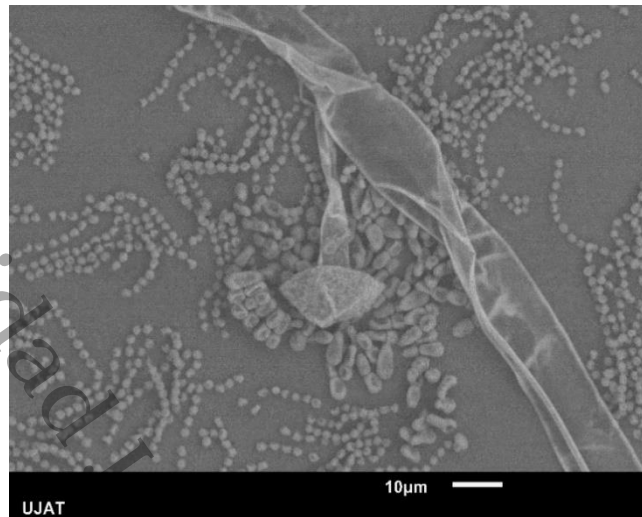


Fig. 3. 16 Cepa H2: Aspergillus sp

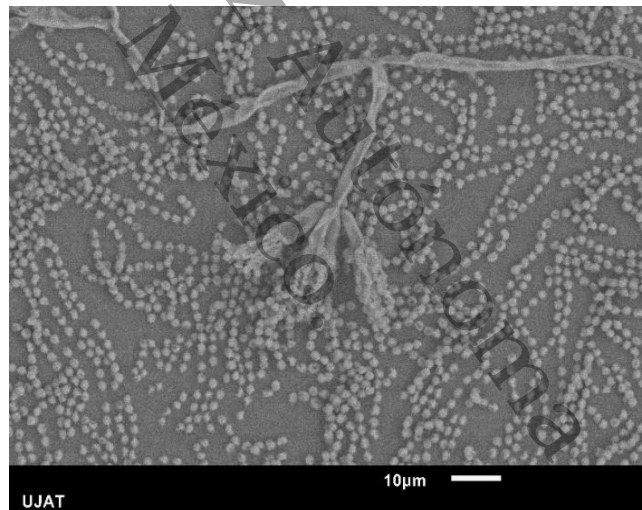


Fig. 3. 17 Cepa H5: Penicillium sp

3.8 Identificación de lípidos polares asociados a la acción tensioactiva.

La aplicación de cromatografía de capa fina, empleada para la identificación de lípidos polares, permitió detectar la presencia de lipopéptidos en los tres biotensioactivos producidos por las cepas H1, H2 y H5 (Fig.3.18) Estos compuestos han sido asociados a la acción tensioactiva de los biotensioactivos (Hamilton y Hamilton, 1990).

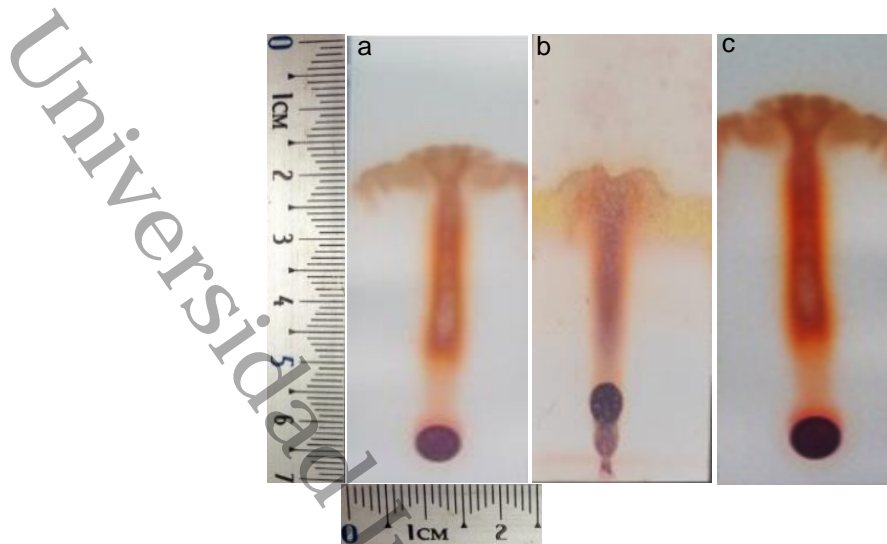


Fig. 3. 18 Detección de lipopéptidos asociados con actividad tensioactivas de las cepas H1 (*Aspergillus* sp) (a), H2 (*Aspergillus* sp) (b) y H5 (*Penicillium* sp).(c)

3.9 Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier (FT-IR).

La técnica de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), se utilizó para corroborar los resultados obtenidos con la cromatografía en capa fina e identificar el tipo de lípidos polares que correspondan a cada uno de los tres biotensioactivos. De los resultados se obtuvieron las gráficas del % de transmitancia vs longitud de onda en las cuales se destacaron las bandas mas importantes de absorción que fueron localizadas en $3,500\text{ cm}^{-1}$ (enlace O-H, típico de polisacáridos), entre $2,086$ y $2,007\text{ cm}^{-1}$ (banda C-H: cadenas de hidrocarburos alifáticos), entre $1,642$ - $1,637\text{ cm}^{-1}$ (enlace O=C-N). Las tres muestras de biotensioactivos proporcionaron datos muy similares por lo que los resultados obtenidos concuerdan con lipopéptidos (Fig. 3.19). El análisis FT-IR de los biotensioactivos fue similar a los resultados obtenidos en trabajos anteriores (Onwurah, 1999; Kuiper *et al.*, 2004; Das y Mukherjee, 2007; Ojeda *et al.*, 2015) que utilizaron el FT-IR como herramienta analítica para la caracterización de los biotensioactivos.

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

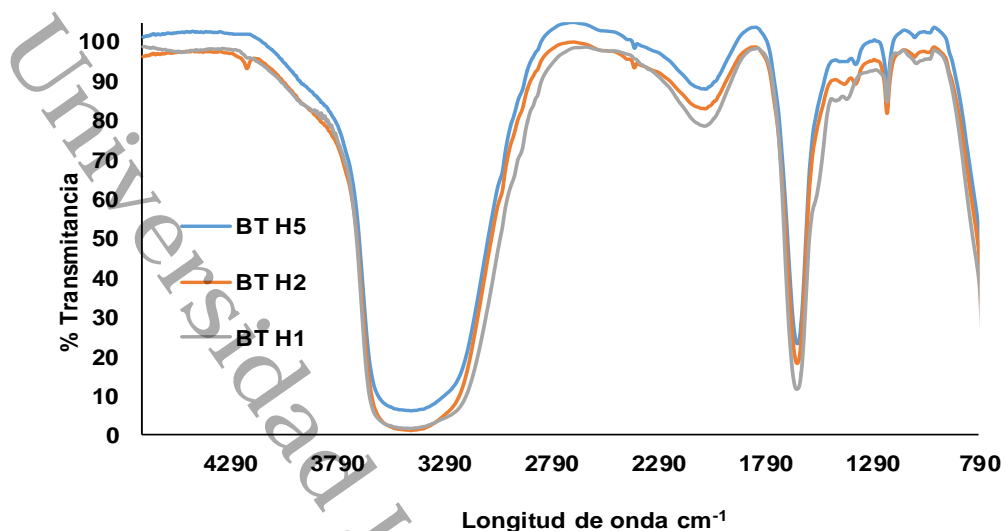


Fig. 3. 19 FT-IR de las tres muestras de biotensioactivos fungicos

3.10 Análisis elemental de los biotensioactivos fúngicos

Se el determino contenido total para H1, H2 y H5. El análisis cualitativo elemental que se realizó reveló el peso y porcentaje atómico de los diversos elementos presentes (Fig. 3.20). Los cuales mostraron altas proporciones de carbono, nitrógeno y oxígeno que son constituyentes de los lipopéptidos. Los lipopéptidos presentan enlaces covalentes, que se conocen como enlaces peptídicos, entre el grupo carboxilo y el grupo amino de los aminoácidos (Madigan *et al.*, 2012).

Fig. 3. 20 Analisis elemental de las muestras de los tres biotensioactivos

	BS H1		BS H2		BS H5	
	ms%	mol%	ms%	mol%	ms%	mol%
C	54.67	61.46	53.64	60.23	46.19	55.66
N	17.62	16.98	14.92	14.36	12.3	12.71
O	23.11	19.5	28.58	24.09	27.73	25.09
Na	1.23	0.72	0.43	0.25	4.06	2.55
P	1.21	0.53	1.04	0.45	2.5	1.17
S	0.7	0.29	0.31	0.13	1.2	0.54
Cl	0.26	0.1	0.08	0.03	1.36	0.55
K	0.88	0.3	0.29	0.1	4.42	1.63
Ca	0.32	0.11	0.18	0.06	0.25	0.09

3.11 Determinación de la tensión superficial

Una característica deseable en un tensioactivo es la capacidad para disminuir la tensión superficial de los líquidos, los resultados de esta prueba mostraron que los biotensioactivos producidos por las cepas *H1*, *H2* y *H5* son capaces de disminuir la tensión superficial del agua desde 72 mN/m (valor correspondiente a la tensión superficial del agua grado HLPC a 25°C) hasta 48.22 mN/m (Fig. 3.21) 47.82 mN/m (Fig. 3.22), y 49.95 mN/m (Fig. 3.23) respectivamente. El biotensioactivo producido por la cepa *H2* (*Aspergillus sp*) reduce mejor la tensión superficial en comparación con los biotensioactivos producidos por las cepas *H1* (*Aspergillus sp*) y *H5* (*Penicillium sp*) estos valores son concuerdan con los resultados obtenidos por Ban y Sato (1993), quienes estudiaron el hongo *Penicillium spiculisporum* para obtener un biotensioactivo, y el cual logro bajar la tensión superficial del agua grado HPLC de 72 mN/m hasta 56 mN/m; sin embargo después de obtener ese resultado realizaron diferentes experimentos donde evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de sales y diferentes temperaturas al biotensioactivo, lograron reducir la tensión superficial hasta 33 mN/m, por lo que podría ser viable estos análisis para evaluar el comportamiento de los tres biotensioactivos.

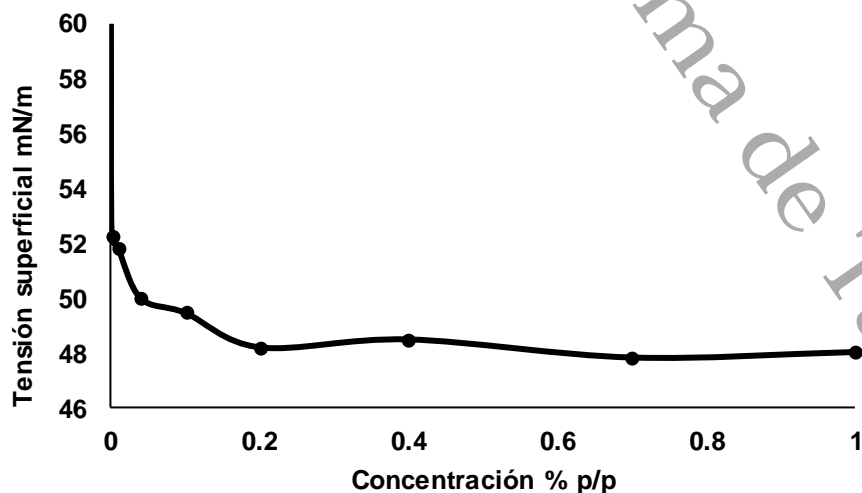


Fig. 3. 21 Tensión superficial en función de la concentración de biotensioactivo en agua, medida a 30°C. Biotensioactivo producido por la cepa *H1* (*Aspergillus sp.*)

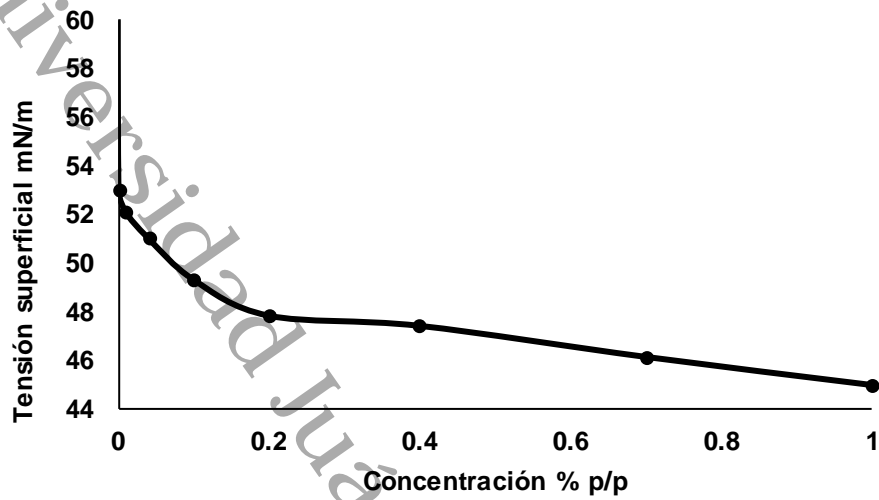


Fig. 3. 22 Tensión superficial en función de la concentración de biotensioactivo en agua, medida a 30°C. Biotensioactivo producido por la cepa H2 (*Aspergillus sp.*)

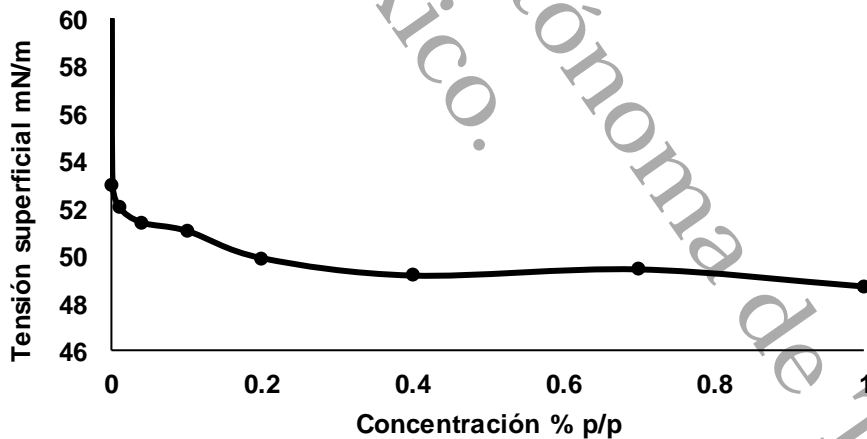


Fig. 3. 23 Tensión superficial en función de la concentración de biotensioactivo en agua, medida a 30°C. Biotensioactivo producido por la cepa H5 (*Penicillium sp.*)

3.12 Concentración micelar crítica (CMC)

Una característica importante de las sustancias tensioactivas es la formación de micelas en un entorno polar, y está estrechamente relacionada con la concentración micelar crítica (CMC), la cual representa la concentración mínima de tensioactivo

para que ocurra espontáneamente la formación de micelas, y es también una forma de medir la eficiencia de un tensioactivo.

Los valores obtenidos de CMC de los biotensioactivos producidos por las cepas H1 y H2 correspondientes a organismos fúngicos del genero *Aspergillus sp* fueron de 0.3 % peso en promedio, mientras que para el biotensioactivo fúngico del genero *Penicillium sp* la CMC fue de 0.43 % peso en promedio. La formación rápida de emulsiones puede mejorar la eficiente en la biodisponibilidad en un derrame petrolero. La concentración micelar crítica es un intervalo de concentraciones, no un valor exacto y absoluto, ya que las transiciones de fase ocurren paulatinamente (Aparicio, 2012).

3.13 Determinación del ángulo de contacto del biotensioactivo

3.13.1 Preparación de las superficies

Por medio de las reacciones de silanización se crearon heterogeneidades sobre las láminas de vidrio limpias usando una solución de octadeciltriclorosilano (OTS) con un tiempo de exposición de 5 minutos, tomando en cuenta que el grado de alteración de la mojabilidad (de mojado al agua a mojado al aceite) depende del tiempo de exposición entre el reactivo y la muestra (Araujo, 2007)


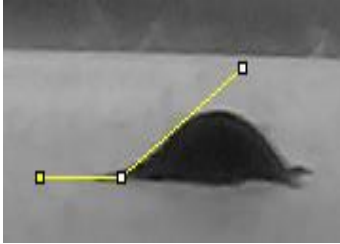
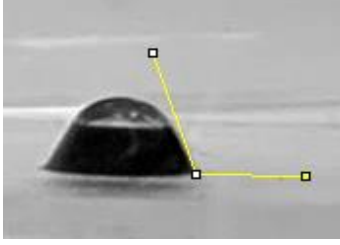
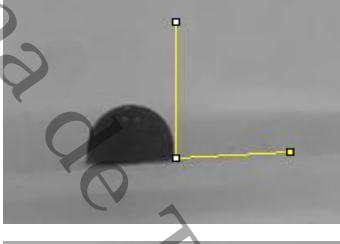

3.13.2 Medición de los ángulos de contacto después de la aplicación del OTS

En esta parte se reportan resultados de la medición de ángulos de contacto sobre las superficies con las heterogeneidades de mojabilidad (mojado al aceite), con el fin de establecer el cambio de mojabilidad experimentado.

Los resultados obtenidos para los ángulos de contacto, una vez aplicado la emulsion de tensioactivos/petróleo y tensioactivos químicos/petróleo sobre las láminas de vidrio se presentan en las tablas siguientes (Fig. 3.24, 3.25, 3.26, 3.27 y 3.28).

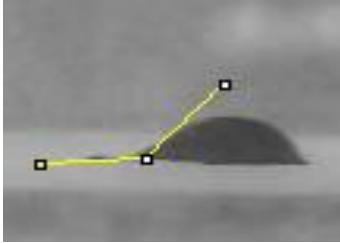
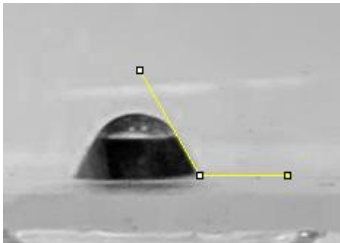
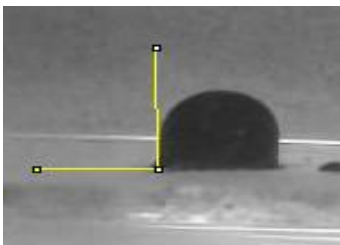
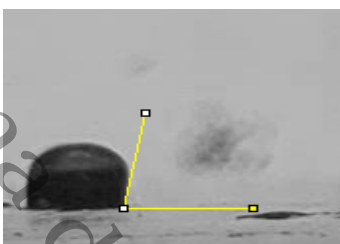
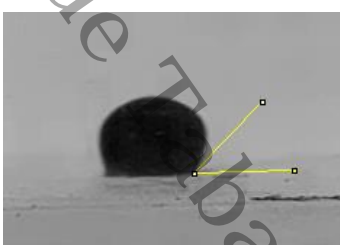
EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

Fig. 3. 24 Cambios en la mojabilidad de las láminas de vidrio tratadas con el OTS y sumergidas en agua destilada, con tiempo de inmersión de 5 min y con diferentes emulsiones de biotensioactivo H1

<i>Muestra (V/V)</i>	<i>Tiempo de inmersión</i>	<i>Ángulo</i>		<i>Estado de mojabilidad</i>	<i>Gota de emulsión sobre superficie</i>
		<i>de contacto</i>	<i>(°) (±1)</i>		
Crudo	5 min	149		MC	
Crudo/ BT (95/5)	5 min	147		MC	
Crudo/ BT (90/10)	5 min	119		MI	
Crudo/ BT (80/20)	5 min	85		MI	
Crudo/ BT (70/30)	5 min	30		MA	

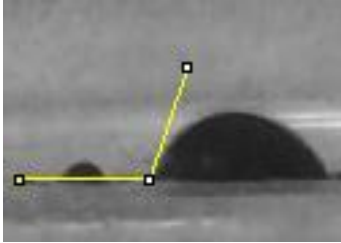
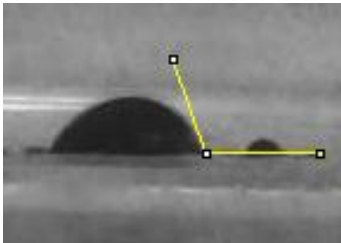
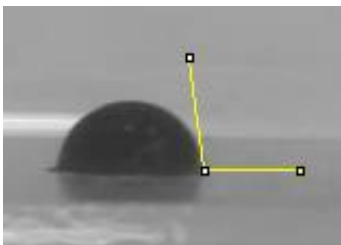
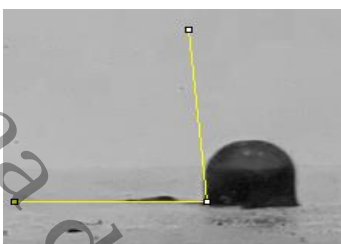
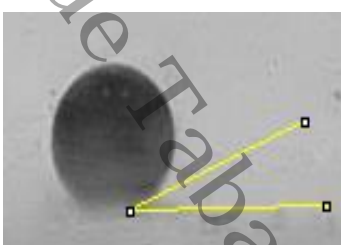
EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

Fig. 3. 25 Cambios en la mojabilidad de las láminas de vidrio tratadas con el OTS y sumergidas en agua destilada, con tiempo de inmersión de 5 min y con diferentes emulsiones de biotensioactivo H2

Muestra (V/V)	Tiempo de inmersión	Ángulo de contacto (°) (±1)	Estado de mojabilidad	Gota de emulsión sobre superficie
Crudo	5 min	135	MC	
Crudo/ BT (95/5)	5 min	121	MC	
Crudo/ BT (90/10)	5 min	89	MI	
Crudo/ BT (80/20)	5 min	80	MI	
Crudo/ BT (70/30)	5 min	44	MA	

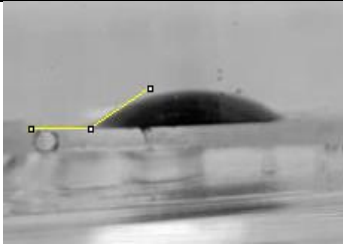
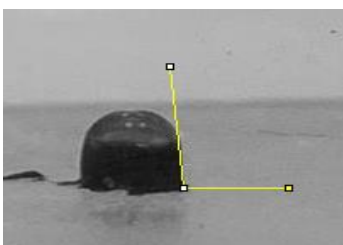
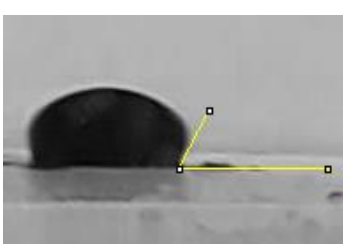
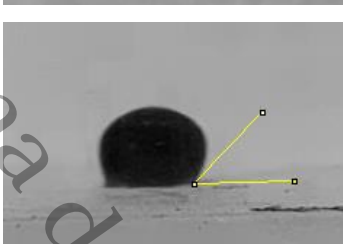
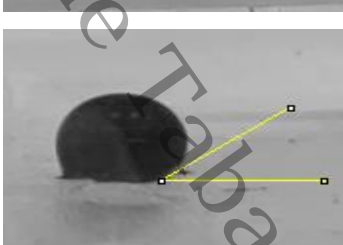
EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

Fig. 3. 26 Cambios en la mojabilidad de las láminas de vidrio tratadas con el OTS y sumergidas en agua destilada, con tiempo de inmersión de 5 min y con diferentes emulsiones de biotensioactivo H5

Muestra (V/V)	Tiempo de inmersión	Ángulo de contacto (°) (± 1)	Estado de mojabilidad	Gota de emulsión sobre superficie
Crudo	5 min	122	MC	
Crudo/ BT (95/5)	5 min	109	MI	
Crudo/ BT (90/10)	5 min	97	MI	
Crudo/ BT (80/20)	5 min	85	MI	
Crudo/ BT (70/30)	5 min	11	MA	

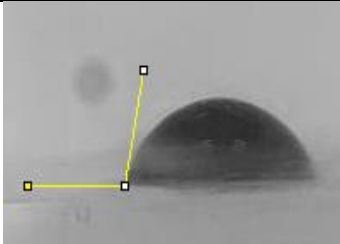
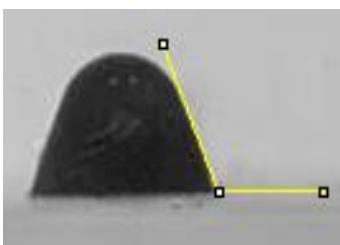
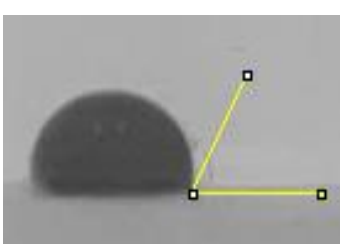
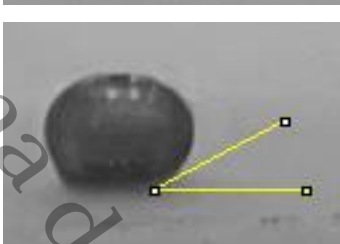
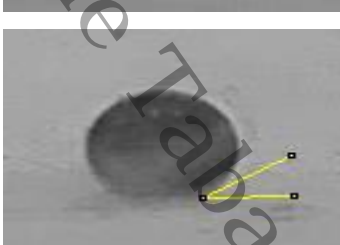
EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

Fig. 3. 27 Cambios en la mojabilidad de las láminas de vidrio tratadas con el OTS y sumergidas en agua destilada, con tiempo de inmersión de 5 min y con diferentes emulsiones de tensioactivo ANIÓNICO

Muestra (V/V)	Tiempo de inmersión	Ángulo de contacto (°) (±1)	Estado de mojabilidad	Gota de emulsión sobre superficie
Crudo	5 min	147	MC	
Crudo/ BT (95/5)	5 min	95	MI	
Crudo/ BT (90/10)	5 min	61	MI	
Crudo/ BT (80/20)	5 min	44	MA	
Crudo/ BT (70/30)	5 min	32	MA	

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

Fig. 3. 28 Cambios en la mojabilidad de las láminas de vidrio tratadas con el OTS y sumergidas en agua grado HPLC, con tiempo de inmersión de 5 min y con diferentes emulsiones de tensioactivo NO IÓNICO

Muestra (V/V)	Tiempo de inmersión	Ángulo de contacto (°) (±1)	Estado de mojabilidad	Gota de emulsión sobre superficie
Crudo	5 min	122	MC	
Crudo/ BT (95/5)	5 min	109	MI	
Crudo/ BT (90/10)	5 min	64	MI	
Crudo/ BT (80/20)	5 min	29	MA	
Crudo/ BT (70/30)	5 min	21	MA	

Los resultados de estas variaciones: ángulos de contacto, y cambio de mojabilidad en sus tres condiciones (mojado al agua (MA), mojado intermedio (MI) y mojado al crudo (MC)), se observan que las muestras de crudo (petróleo) solo presentan un ángulo de contacto externo entre 121° y 180° , lo que indica una condición de mojado al crudo. Se deduce que, la superficie presenta una afinidad muy marcada hacia este fluido, por lo cual, la gota de aceite se esparce fácilmente sobre la misma. (Melendez *et al.*, 2012)

Para las muestras de emulsiones de crudo/biotensioactivos y crudo/tensioactivos químicos con diferentes concentraciones de volumen/volumen, se midieron ángulos de contacto externo de 61° a 120° , para una condición de mojado intermedio, ya que cuando el ángulo de contacto es cercano a 90° , es decir las partículas son parcialmente hidrofóbicas, estabilizan eficientemente las emulsiones pues las partículas son mojables en ambos líquidos y por lo tanto se establecen en la superficie de la gota (Langevit *et al.*, 2004). Este tipo de mojabilidad se presenta como la condición ideal cuando se habla de recuperación de petróleo en el yacimiento. Además se midieron ángulos de contacto externo de 0° a 60° para una condición de mojado al agua. Las interacciones químicas que existen entre las moléculas del agua y la superficie son más fuertes que las interacciones entre la superficie y el aceite. Esto significa que las fuerzas que actúan en el sistema son repulsivas (Melendez *et al.*, 2012)

Los límites de los ángulos de contacto fueron tomados de lo reportado por Anderson (1986), de la relación aproximada de los índices de mojabilidad entre ángulos de contacto.

Es importante considerar que hablamos de una disolución del biotensioactivo, lo cual implica que al ser menos costosas que los tensioactivos químicos y al obtener resultados similares son factibles económicamente al ser utilizado en un yacimiento.

Capítulo 4 Conclusiones

Un tensioactivo con base en lipopeptidos sintetizado por diversos hongos del genero *Penicillium* y *Aspergillus* tienen la capacidad de reducir los hidrocarburos de fracción pesada, hidrocarburos de fracción media del petróleo y la tensión superficial líquido- líquido. Además de mejorar la mojabilidad de una interfase sólido-líquido, es decir, realizar el cambio de ser mojado al crudo a ser mojado al agua.

De acuerdo a los estudios realizados en este trabajo se logra concluir que los biotensioactivos de origen fúngicos son viables para poder competir con los tensioactivos de origen químico, ya que presentaron condiciones similares, por lo que podrían ser utilizados para la recuperación mejorada del petróleo.

Referencias

1. Abdallah, W., Buckley, J. S., Carnegie, A., Edwards, J., Herold, B., Fordham, E., & Hussain, H. (1986). Fundamentals of wettability. *Technology*, 38(1125-1144), 268.
2. Abdallah, W., Buckley, J., Carnegie, A., Edwards, J., Herold, B., Fordham, E., & Hussain, H. (2007). Fundamentos de la mojabilidad. *Seminario Schlumberger sobre mojabilidad. Oilfield Review*, 19, 48-67.
3. Abu-Ruwaida, A.S., Banat, I.M., Haditirto, S., and Khamis, A. (1991a.) Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant producing *Rhodococcus bacterium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 7, 53-61
4. Al-Bahry, S.N.; Al-Wahaibi, Y.M.; Elshafie, A.E.; Al-Bemani, A.S.; Joshi, S.J.; Al-akhmari, H.S.; Al-Sulaimani, H.S. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2013**, 81, 141–146.
5. Almazán V, González J, Pérez J, Dieguez F, Villaverde M, Pérez G, Joseph N, Gan R (2000) Purificación e identificación de la naturaleza química de un tensoactivo producido por *Pseudomonas aeruginosa* Cepa Ido-330. *Revista Biología*, 14 (2), 172-177.
6. Álvarez J (2009) Caracterización fisicoquímica y reológica de fluidos microestructurado formados por los sistemas: 4 vinil benzoato del cetil trimetil amonio (CTAVB)/agua, ADN/agua y pluronic P103/agua. Tesis Doctoral Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México, 82 pp.
7. Anderson, W. (1986). Wettability literature survey-part 2: Wettability measurement. *Journal of petroleum technology*, 38(11), 1-246.
8. Aparicio R (2012) Determinaciones de las concentraciones micelares críticas (CMC) para el sistema p-Fluorobenzoato del cetiltrimetilamonio (CTAPFB)/Agua. Tesis de licenciatura. Centro universitario de ciencias exactas e ingenierías. División de ingeniería química. Departamento de ingeniería química. Universidad de Guadalajara. Jalisco, México 38 pp.
9. Aparna, A.; Srinikethan, G.; Hedge, S. Effect of addition of biosurfactant produced by *Pseudomonas ssp.* on biodegradation of crude oil. In *International Proceedings of Chemical, Biological & Environmental Engineering*. Proceedings of the 2nd International Proceedings of Chemical, Singapore, Singapore, 26–28 February 2011; Volume 6, pp. 71–75.
10. Aramberri I., B. P. Binks, J. H. Clint y P. D. I. Fletcher. (2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizados por polímeros y agentes tensoactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 7: 211-231
11. Ayirala, S. C., Vijapurapu, C. S., & Rao, D. N. (2006). Beneficial effects of wettability altering surfactants in oil-wet fractured reservoirs. *Journal of petroleum science and engineering*, 52(1-4), 261-274.

12. Bachmann, R.T., Johnson, A.C., Edyvean, R.G.J., 2014. Biotechnology in the petroleum industry: an overview. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 86, 225–237.
13. Ban, T., & Sato, T. (1993). Aqueous microbial biosurfactant solutions exhibiting ultra-low tension at oil-water interfaces. In *Developments in Petroleum Science* (Vol. 39, pp. 115-125). Elsevier.
14. Banat I, Makkar R, y Cameotra S (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:495-508.
15. Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J., and Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 87,427–444.
16. Begley, M., Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P. (2009). Identification of a novel two-peptide lantibiotic, lichenicidin, following rational genome mining for Lan M proteins. *Applied Environmental Microbiology* 75,5451-5460.
17. Bernabé V (2007) Caracterización y determinación de surfactantes y otros componentes en productos de limpieza con aplicación en control de calidad de formulaciones industriales. Universidad de Valencia. Tesis doctoral. Valencia. 21-26.
18. Bernheimer, A.W., and Avigad, L.S. (1970). Nature and Properties of a Cytolytic Agent Produced by *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology* 61,361-369.
19. Besson, F., and Michel, G. (1992). Biosynthesis of iturin and surfactin by *Bacillus subtilis*. Evidence for amino acid activating enzymes. *Biotechnol. Let* 14,1013–1018.
20. Borzeix, C., and Frederique, K. (2003). Use of sophorolipids comprising diacetyl lactones as agent for stimulating skin fibroblast metabolism. US patent 659,62-65.
21. Busscher, H.J., Vander Kuij-Booij, M., and Vander Mei, H.C. (1996). Biosurfactants from thermophilic dairy Streptococci and their potential role in the fouling control of heat exchanger plates. *J Ind Microbiol Biotechnol* 16(1),15-21.
22. Busscher, HJ, Van Hoogmoed, C.G., Geertsema-Doornbusch, G.I., Van der Kuij-Booij, M., and Van der Mei, H.C. (1997). *Streptococcus thermophilus* and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida* spp. on silicone rubber. *Appl. Environ. Microbiol* 63,3810– 381.
23. Campos, J.M.; Stamford, T.L.M.; Sarubbo, L.A.; Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Banat, I.M. (2013) Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnol. Prog.*, 29, 1097–1108.
24. Campos-Garcia, J., Caro, A.D., Najera, R., Miller-Maier, R.M., Al-Tahhan, R.A., Soberon-Chavez, G., 1998. The *Pseudomonas aeruginosa rhlG* gene encodes an NADPH-dependent α -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid
25. Cantarero Malagón, A. S. (2010). Determinación de tensioactivos aniónicos en matrices ambientales. Comportamiento del jabón en una parcela agrícola.
26. Casas, J.A., and Garcia-Ochoa, F. (1999). Sophorolipid production by *Candida bombicola* medium composition and culture methods. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88, 488-494.

27. Cassidy, D., & Hudok, A. (2001). Microorganism selection and biosurfactants production in a continuously and periodically operated bioslurry reactor. *Journal of Hazardous Materials*, 84, 253
28. Castorena-Cortés G., I. Zapata-Peñasco, T. Roldán-Carrillo, J. Reyes-Avila, M. Mayol-Castillo, S. Román-Vargas, 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
29. Celik G.Y., B. Aslim, and Y. Beyatli. (2008). Enhanced crude oil biodegradation and rhamnolipid production by *Pseudomonas stutzeri* strain G11 in the presence of Tween-80 and Triton X-100. *Journal of Environmental Biology*. 29. 867-870.
30. Chozo, A., Román, G., Méndez, E., & Jefferson, K. (2017). Rendimiento de surfactantes producidos por bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo, 2015.
31. Cirigliano, M., and Carman, G. (1984). Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol* 48,747–750.
32. Cirigliano, M.C., Carman, G.M. (1985). Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol* 50(4),846-850.
33. Clint, J. (1992). *Surfactants aggregations*. New York: Chapman and Hills.
34. Coelho, P.A., Queiroz-Machado, J., and Sunkel, C.E. (2003). Condensin-dependent localization of topoisomerase II to an axial chromosomal structure is required for sister chromatid resolution during mitosis. *J. Cell Sci* 116(23),4763-4776.
35. Cooper, D.G., and Paddock, D.A (1984). Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl Environ Microbiol* 47,173–176.
36. Cooper, D.G., and Paddock, D.A. (1983). *Torulopsis petrophilum* and surface activity. *Appl Environ Microbiol* 46,1426-1429.
37. Córdova-Bautista, Y., Rivera-Cruz, M. C., Ferrera-Cerrato, R., Obrador-Olán, J. J., & Córdova-Ávalos, V. (2009). Detección de bacterias benéficas en suelo con banano (*Musa AAA Simmonds*) cultivar 'Gran enano' y su potencial para integrar un biofertilizante. *Universidad y ciencia*, 25(3), 253-265.
38. Coutinho J. O. P. A., M. P. S. Silva, P. M. Moraes, A. S. Monteiro, J. C. C. Barcelos, E. P. Siqueira and V. L. Santos. (2013). Demulsifying properties of extracellular products and cells of *Pseudomonas aeruginosa* MSJ isolated from Petroleum-contaminated soil. *Bioresource Technology*. 128: 646-654.
39. Das, K., and Mukherjee, A.K. (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from petroleum oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology* 98,1339–1345.
40. Das, P., Mukherjee, S., and Sen, R. (2009). Antiadhesive action of a marine microbial surfactant. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 71,183-186.

41. De Almeida, D. G., Soares Da Silva, R. D. C. F., Luna, J. M., Rufino, R. D., Santos, V. A., Banat, I. M., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. *Frontiers in microbiology*, 7, 1718.
42. de la Federación, D. O. (2011). Acuerdo 592. Recuperado de http://www.reformapreescolar.sep.gob.mx/normatividad/acuerdos/acuerdo_592.pdf.
43. Desai, J.D., Banat, I.M., 1997. Microbial production of surfactants and their comercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 47–64.
44. Drouin, C.M., and Cooper, D.G. (1992). Biosurfactant and aqueous two phase fermentation. *Biotechnol. Bioeng* 40,86-90.
45. Elraies, K. A., & Tan, I. M. (2012). The application of a new polymeric surfactant for chemical EOR. In *Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR) Processes and Bioremediation of Oil-Contaminated Sites*. IntechOpen.
46. El-Sheshtawy, H. S., Aiad, I., Osman, M. E., Abo-ELnasr, A. A., & Kobisy, A. S. (2015). Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. *Egyptian Journal of Petroleum*, 24(2), 155-162.
47. El-Sheshtawy, H.S., El-Tabei, A. S., Kobisy, A. S., and Doheim, M.M. (2013). Application of Biosurfactant Produced by *Bacillus licheniformis* and Chemical Surfactant in Biodegradation of Crude Oil: Part I. *Biosci., Biotech. Res. Asia*, Vol. 10(2), 515-526.
48. FAO 2007. Base Referencial Mundial del Recurso Suelo. Primera actualización 2007. Informes sobre Recursos Mundiales de Suelos No. 103. FAO, Roma. Italia
49. Fernandes, P.A.V., Arruda, I.R., Santos, A.F.B., Arajo, A.A., Maior, A.M.S., and Ximenes, E.A. (2007). Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. *Braz J. Microbiol* 38,704-709.
50. Fiechter, A. (1992). Biosurfactants: moving towards industrial application. *Tibtech* 10,208–217.
51. Francisca, F. M. (2001). Evaluación de suelos contaminados con fluidos orgánicos mediante ondas electromagnéticas.
52. Frazetti, A., Caredda, P., Ruggeri, C., Colla, P.L., Tamburini, E., Papacchinis, M., and Bestetti, G. (2009). Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. Strain BS29 in soil remediation technologies. *Chemosphere* 75,801-807.
53. Gaffney, J. S., Marley, N. A., & Clark, S. B. (1996). *Humic and fluvic acids and organic colloidal materials in the environment*(No. ANL/ER/CP-89942; CONF-9608110-1). Argonne National Lab., IL (United States).
54. Gan, B.S., Kim, J., Reid, G., Cadieux, P., and Howard, J.C. (2002). *Lactobacillus fermentum* RC-14 inhibits *Staphylococcus aureus* infection of surgical implants in rats. *J. Infect. Dis* 185,1369-1372.

55. Gautam, K.K., and Tyagi, V.K. (2005). Microbial surfactants: A review. *J. Oleo. Sci* 55,155–166.
56. Georgiou, G., Lin, S., and Sharma, M. M. (1992), Surface active compounds from microorganisms. *Biotechnology* 10,60-65.
57. Gillman, G. P., Sinclair, D. F., & Beech, T. A. (1986). Recovery of organic carbon by the Walkley and Black procedure in highly weathered soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 17(8), 885-892.
58. Guerra-Santos, L., Kappeli, O., and Fiechter, A. (1986) Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 24,443-448.
59. Gutierrez, T., Mulloy, B., Black, K., and Green, D.H. (2007a). Glycoprotein emulsifiers from two marine Halomonas species: chemical and physical characterization. *J Appl Microbiol* 103,1716–27.
60. Haferburg, D., Hommel, R., Claus, R., and Kleber, H.P. (1986). Extracellular microbial lipids as biosurfactants. *Adv. Biochem. Eng. Biotech* 33,53-93.
61. Hamilton R, and Hamilton S (1992). Lipid Analysis, IRL Press, the practical Approach Series, U.S.A. pp. 65-93.
62. Hernández M, Ojeda M, Martínez J y Córdova Y (2011) Optimal parameters for the development of the hydrocarbonoclastic microorganism *Proteus* sp. *Soil Sci.Plant Nutr.* 11: 29-43.
63. Hernández-Rivera, M. A., Ojeda-Morales, M. E., Martínez-Vázquez, J. G., Villegas-Cornelio, V. M., & Córdova-Bautista, Y. (2011). Optimal parameters for In Vitro development of the hydrocarbonoclastic microorganism *Proteus* sp. *Journal of soil science and plant nutrition*, 11(1), 29-43.
64. Herrera Silva, L. R. (2013). Estudio de alternativas de Recuperación Mejorada para la incorporación de nuevas reservas y Aumento de la Producción en la Formación Napo “T” Inferior del Campo Tiguino.
65. Huibers, P. D., Lobanov, V. S., Katritzky, A. R., Shah, D. O., & Karelson, M. (1997). Prediction of critical micelle concentration using a quantitative structure–property relationship approach. *Journal of Colloid and Interface Science*, 187(1), 113-120.
66. Husain, D.R., Goutx, M., Acquaviva, M., Gilewicz, M., and Bertrand, J.C. (1997). The effect of temperature on eicosane substrate uptake modes by a marine bacterium *Pseudomonas nautica* strain 617: relationship with the biochemical content of cells and supernatant ts. *World J. Microbiol. Biotechnol* 13,587-590.
67. International Union of Soil Science - International Soil Reference and Information Centre and Food and Agriculture Organization of the United Nations (IUSS Working Group WRB. IUSS-ISRIC and FAO). 2006. World reference base for soil resources. A framework for international

- classification, correlation and communication. 2nd edition. World Soil Resources Reports No. 103. Rome, Italy. 114 p
68. Jadhav, V.V., Yadav, A., Shouche, Y.S., Aphale, S., Moghe, A., Pillai, S., Arora, A., Bhadekar, R.K., 2013. Studies on biosurfactant from *Oceanobacillus* sp. BRI 10 isolated from antarctic sea water. *Desalination* 318, 64-71.
69. Jarvis, F.G., and Johnson, M.J. (1949). A glyco-lipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Am Chem Soc* 71,4124-4126.
70. Jenneman, G.E., Knapp, R.M., McInerney, M.J., Menzie, D.E., Revus, D.E., (1984). Experimental studies of in-situ microbial enhanced oil recovery. *Soc. Petrol. Eng. J.* 24, 33–37.
71. Jiménez C. B. E. (2001). La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada. México: Limusa, Colegio de Ingenieros Ambientales de México, A.C., Instituto de Ingeniería de la UNAM y FEMISCA. México D.F. 926 p.
72. Jiménez D, Medina S y Gracida J (2010) Propiedades, aplicaciones y producción de biotensioactivos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 1:65-84.
73. Juni, E. (1978). Genetics and physiology of *Acinetobacter*. *Annu Rev Microbiol* 32,349–71.
74. K. Khazainah, M Mushaireen, J. Kamauruzaman, A. Rahman, M. Zetty, Md. Zaini, Md., Azlina, (2011) Lowering of palm oil cloud point by enzymatic acidolysis. *World Appl. Sci. J.* 1228-31.
75. Kakugawa, K., Tamai, M., Imamura, K., Miyamoto, K., and Miyoshi, S. (2002). Isolation of yeast *Kurtzmanomyces* sp. I-11, novel producer of mannosylerythritol lipid. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 66,188-191.
76. Kang, S.W., Kim, Y.B., Shin, J.D., and Kim, E.K. (2010). Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial biosurfactant, sophorolipid. *Appl. Biochem. Biotechnol* 160,780–790.
77. Kapadia, S. G., & Yagnik, B. N. (2013). Current trend and potential for microbial biosurfactants. *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 4(1), 1-8.
78. Kappeli, O., and Finnerty, W.R. (1979). Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane grown *Acinetobacter*. *J. Bacteriol* 140,707–712.
79. Khire, J.M., and Khan, M.T. (1994). Microbially enhanced oil recovery (MEOR), Importance and mechanism of MEO. *Enz. Microbiol. Tech* 16,170-172.
80. Khoshima A., and M. R. Dehghani. (2016). Phase behavior of glycol ether surfactant systems in the presence of brine and hydrocarbon: Experiment and modeling. *Fluid Phase Equilibria.* 414: 101-110.
81. Kitamoto, D., Haneishi, K., Nakahara, T., and Tabuchi, T. (1990). Production of mannosylerythritol lipids by *Candida antarctica* from vegetable-oils. *Agric Biol Chem* 54,37-40.

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

82. Kitamoto, D., Yanagishita, H., Shinbo, T., Nakane, T., Kamisava, C., and Nakahara, T. (1993). Surface-active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *J. Biotech* 29,91-96.
83. Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana.
84. Kosaric, N., Cairns, W.L., and Gray, N.C.C. (1987). *Biosurfactants and Biotechnology*, Marcel Dekker, New York.
85. Krauss, E.M., and Chan, S.I. (1983). Complexation and phase transfer of nucleotides by gramicidine S. *Biochemistry* 22,4280-4285.
86. Kretschmer, A., Bock, H., and Wagner, F. (1982). Chemical and physical characterization of interfacial- active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol* 44,864–870.
87. Kuiper, L., Hermsen, W., & Mendez, M. (2004). Discovery of Hard Nonthermal Pulsed X-Ray Emission from the Anomalous X-Ray Pulsar 1E 1841–045. *The Astrophysical Journal*, 613(2), 1173.
88. Lai, C.C., Huang, Y.C., Wei, Y.H., and Chang, J.S. (2009). Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *J. Hazard Mater* 167,609-614.
89. Lang, S., and Wagner, G. (1987). Structure and properties of biosurfactants. 21-47. In Kosaric N, Cairns WL, Gray, NCC (eds.) *Biosurfactants and biotechnology*. Marcel Dekker, Inc., New York.
90. Langevin, D., Poteau, S., Hénaut, I., & Argillier, J. F. (2004). Crude oil emulsion properties and their application to heavy oil transportation. *Oil & gas science and technology*, 59(5), 511-521.
91. Laurencio, H., & Delgado, Y. (2008). *Reological properties of emulsions of petroleum weighed in water. Rev Chilena of engineering.*, 16, 244–249.
92. Lin, S.C., Carswell, S.K., Sharma, and M.M. (1994). Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41,281-285.
93. Lu, J.R.; Zhao, X.B.; Yaseen, M. (2007) Biomimetic amphiphiles: Biosurfactants. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 12, 60–67.
94. Luengo, J., Minazzoli, C., D'Angelo, M. V., Cachile, M. A., & Freytes, V. M. (2017). Estudio de mojabilidad y caracterización del sistema PDMS-vidrio en dispositivos microfluídicos. In *ANALES AFA* (Vol. 28, No. 1, pp. 10-14).
95. M. Madigan, M. Martinko, A. Stahl, D. Clark, *Brock (2012) Biology of microorganisms*. 13a. Edition. Pearson Higher education. España.
96. MacCormack, W.P., and Fraile, E.R. (1997). Characterisation of a hydrocarbon degrading psychrotrophic Antarctic bacterium. *Antarctic Science*. 9,150- 155.
97. Makkar, R.S., and Cameotra, S.S. (1997). Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74,887-889.

98. Makkar, R.S., Cameotra, S.S., Banat, I.M., (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *Appl. Microbiol. Biotechnol. Exp.* 1 (1), 1–5.
99. Maneera, S., and Dikit, P. (2007). Characterization of cell-associated bioemulsifier from *Myroides* sp. SM1, a marine bacterium. *Songklanakarin J Sci Technol.* 29,769–79.
100. Maneerat, S., and Phetrong, K. (2007). Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Songklanakarin J Sci Technol.* 29,781–91.
101. Maneerat, S., Bamba, T., Harada, K., Kobayashi, A., Yamada, H., and Kawai, F. (2006). A novel crude oil emulsifier secreted in the culture supernatant of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1. *Appl Microbiol Biotechnol.* 70,254–9.
102. Maneerat, S., Nitoda, T., Kanzaki, H., and Kawai, F. (2004). Bile acids is new products of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1. *Appl Microbiol Biotechnol.* 67,683–699.
103. Marfisi, S., & Salager, J. L. (2004). *Deshidratación de crudo-Principios y Tecnología.* Universidad de los Andes, Caracas, Venezuela. Langevin, D., Poteau, S., Hénaut, I., & Argillier, J. F. (2004). Crude oil emulsion properties and their application to heavy oil transportation. *Oil & gas science and technology*, 59(5), 511-521.
104. Martínez, M. A. T. (2014). Exploración de la proteína transmembranal OmpA para la recuperación mejorada de hidrocarburos presentes en sistemas porosos (Doctoral dissertation, Uniandes).
105. McFarland, D. J., McCane, L. M., David, S. V., & Wolpaw, J. R. (1997). Spatial filter selection for EEG-based communication. *Electroencephalography and clinical Neurophysiology*, 103(3), 386-394.
106. McNeill, G.P., and Yamane, T.J. (1991). Enzymatic synthesis of surfactants. *Am. Oil chemists soc.* 68,6-10.
107. Meléndez, H., Rondón, J., Cabrera, M., Garcia, E., Lugo, C., & Rivas, C. (2012). Estudio experimental de la alteración de la mojabilidad mediante el uso de un surfactante extraído del aceite del pino TOFA en el sistema crudo liviano/agua/SiO₂. *Avances en Química*, 7(3), 151-158.
108. Mireles, J.P., Toguchi, A., and Harshey, R.M. (2001). Salmonella enteric serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilmforming abilities: Surfactin inhibits biofilm formation. *J. Bacteriol.* 183,5848–5854.
109. Morales-Bautista, C. M., Lobato García, C. E., Méndez-Olán, C., & Alor Chávez, M. D. J. (2016). Evaluación del tratamiento del intercambio catiónico en dos suelos aluviales contaminados con aguas congénitas. *Interciencia*, 41(10).
110. Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y., and Imanaka, T. (1993). A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *J. Bacteriol.* 175 (20),6459-6466.
111. Mukherjee, S., Das, P., and Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol.* 24,509–515.

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

112. Mülligan C, Mahmoudides B y Gibbs (1989) The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biotechnol.*, 12:199-210.
113. Mulligan, C.N., and Gibbs, B.F. (2004). Types, production and applications of biosurfactants. *Proc. Indian Nat. Sci. Acad.* 1,31–55.
114. Mulligan, C.N., Yong, R.N., and Gibbs, B.F. (2001). Remediation technologies for metalcontaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology.* 60(1-4), 193-207.
115. Mulqueen, P. (2003). Recent advances in agrochemical formulations. *Adv Colloid Interface Sci.* 106,83–107.
116. Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T.K., and Sivachidambaram, P. (2008). Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Curr. Sci.* 94,736–747.
117. Nazar, M. F., Shah, S. S., & Khosa, M. A. (2011). Microemulsions in enhanced oil recovery: a review. *Petroleum science and technology*, 29(13), 1353-1365.
118. Nerurkar, A.S., Hingurao, K.S., and Suthar, H.G. (2009). Bioemulsifiers from marine microorganisms. *Journal of Science Industrial Research.* 68,273-277.
119. Neu, T.R., Härtner, T., and Poralla, K. (1990). Surface active properties of viscosin: A peptidolipid antibiotic. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32,518-520.
120. Neu, T.R., Vander mei, H.C., and Busscher, B.H.J. (1992). Biofilm accociation with health. *In-Biofilm Science and Technology, NATO ASI series*, Kluwer Academic publishers, Dordrecht. 21-34.
121. Nishio, E., Ichiki, Y., Tamura, H., Morita, S., Watanabe, K., and Yoshikawa, H. (2002). Isolation of bacterial strains that produce the endocrine disruptor, octylphenol diethoxylates, in paddy fields. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66,1792–1798.
122. NMX-AA-005-SCFI-2013. Análisis de agua-medición de grasas y aceites recuperables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas-método de prueba
123. NMX-AA-034-SCFI-2015 Análisis de agua - medición de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas – método de prueba
124. NMX-AA-036-SCFI-2001 Análisis de agua – determinación de acidez y alcalinidad en aguas naturales, residuales y residuales tratadas – método de prueba
125. NMX-AA-073-SCFI-2001 Análisis de agua – determinación de cloruros totales en aguas naturales, residuales y residuales tratadas – método de prueba
126. NMX-AA-093-SCFI-2000 Análisis de agua – determinación de la conductividad electrolítica – método de prueba
127. NMX-AA-134-SCFI-2006 Suelos – hidrocarburos fracción pesada por extracción y gravimetría – método de prueba
128. NMX-AA-038-SCFI-2001 Analisis de agua.- Determinación de turbiedad en aguas naturales, residuales y residuales tratadas método de prueba.

129. NMX-AA-145-SCFI-2008, suelos-hidrocarburos fracción media por cromatografía de gases con detector de ionización de flama-método de prueba.
130. NMX-EC17025-IMNC-2018, Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
131. Norma oficial mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.
132. Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 Que establece las especificaciones de fertilidad, calidad y clasificación de suelo, estudio, muestre y análisis.
133. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación.
134. Norma Oficial Mexicana NOM-143-SEMARNAT-2003, Que establece las especificaciones ambientales para el manejo de agua congénita asociada a hidrocarburos.
135. Obayori, O.S., Ilori, M.O., Adebuseye, S.A., Oyetibo, G.O., Omotayo, A.E., and Amund, O.O. (2009). Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. strain LP1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1615-1623.
136. Ojeda, M., Domínguez, M., Hernández, M., Zavala, J. (2016). Biosurfactant Synthesized by *Azospirillum lipoferum* ALM1B2: Characterization and Application for Environmental Protección. *Water Air Soil Pollut.* 227:181 DOI 10.1007/s11270-016-2871-6
137. Ojeda-Morales, M. E., Domínguez-Domínguez, M., Hernández-Rivera, M. A., & Zavala-Cruz, J. (2015). Biosurfactant production by strains of *azospirillum* isolated from petroleum-contaminated sites. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(12), 401.
138. Oloke, J.K., and Glick, B.R. (2005). Production of Bioemulsifier by an unusual isolate of salmonred melanin containing *Rhodotorula glutinis*. *Afr. J. Biotechnol.* 4(2),164-171.
139. Onwurah, I. N. E. (1999). Restoring the crop sustaining potential of crude oil polluted soil by means of *Azotobacter* inoculation. *Plant Prod. Res, J*, 4, 6-16.
140. Oudot, J., Dupont, J., Haloui, S., & Roquebert, M. F. (1993). Biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating tropical fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 25(9), 1167-1173.
141. Patil, J.R., and Chopade, B.A. (2003). Bioemulsifier production by *Acinetobacter* strains isolated from healthy human skin. US patent no. US 2004/0138429 A1.
142. Pei, X., Zhan, X., and Zhou, Z. (2009). Effect of biosurfactant on the sorption of phenantherene onto original and H₂O₂-treated soils. *J. Environ. Sci.* 21,1378-1385.
143. PEMEX. (2015). Annual statistical report 2015. *Petróleos Mexicanos*. [http://www.pemex.com/acerca/informes_publicaciones/Documents/anuari_estadistico_2015/anuario-estadistico2015_131014.pdf].
144. Peng, F., Liu, Z., Wang, L., and Shao, Z. (2007). An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants. *J Appl Microbiol.* 102,1603–11.

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

145. Pepi, M., Cesaro, A., Liut, G., and Baldi, F. (2005). An Antarctic psychrotrophic bacterium *Halomonas* sp. ANT-3b, growing on n-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipid. *FEMS Microbiol Ecol.* 53,157–66.
146. Perfumo, A., Smyth, T. J. P., Marchant, R., & Banat, I. M. (2010). Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, 1501-1512.
147. Qiao N., and Z. Shao. (2010). Isolation and characterization of a novel biosurfactant produced by hydrocarbon-degrading bacterium *Alcanivorax dieselolei* B-5. *Journal of Applied Microbiology.* 108: 1207-1216.
148. R Maoz, J Sagiv. (1984). On the Formation and Structure of Self- Assembling Monolayers. *J. Colloid Interface Sci J.* 100: 465 (1984).
149. Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Lakshmanaperumalsamy, P., Marchant, R., and Banat, I.M.(2003). The potential of bacterial isolates for emulsification with range of hydrocarbons. *Acta Biotechnol.* 4,335–345.
150. Raiger L. L. J., y N. I. López. (2009). Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Revista Química Viva.* 3: 146-161.
151. Ramírez R, Luna B, Velázquez O, Vierna L, Mejía A, Tsukuzi G, Hernández L, Müggenburg I, Camacho A y Urzúa M (2001) *Manual de Prácticas de Microbiología General.* Facultad de Química, UNAM. México, D.F. 309 pp.
152. Reisfeld, A., Rosenberg, E., and Gutnick, D. (1972). Microbial degradation of crude oil: Factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures. *Appl. Microbiol.* 24(3),363–368.
153. Riojas H, Torres L, Mondaca I, Balderas J y Gortáres P (2010) Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Química Viva,* 3 (9), 120-145.
154. Rivardo, F., Turner, R.J., Allegrone, G., Ceri, H., and Martinotti, M.G. (2009). Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. Prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 86,541-553.
155. Rivera, M. D. C., Ferrera, R., Volke, V., Rodríguez, R., & Fernández, L. (2002). Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra latinoamericana,* 20(4).
156. Rivera-Cruz, M. D. C. (2004). Clasificación de suelos tropicales influenciados por derrames de petróleo en Tabasco. *Tecnociencia Universitaria,* 3, 6-25.
157. Rodrigues, L., Mei, H.C.V., Teixeira. J., and Oliveira, R. (2004). Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses. *Applied Environ. Microbiol.* 70,4408-4410.

158. Rodrigues, L., Vander Mei, H., Banat, I.M., Teixeira, J., and Oliveira, R. (2006b). Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 46,107–112.
159. Rodriguez E (1982) Improved medium for isolation of *Azospirillum* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:990-991.
160. Rosenberg, E., Rubinovitz, C., Legmann, R., and Ron, E.Z. (1988). Purification and chemical properties of *Acinetobacter calcoaceticus* A2 biodispersan. *Appl Environ Microbiol* 54,323- 326.
161. Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C., and Gutnick, D.L. (1979). Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl Environ Microbiol.* 37,402– 8.
162. Rostas, M., and Blassmann, K. (2009). Insects had it first: surfactants as a defense against predators. *Proc R Soc B.* 276,633–638.
163. Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Campos Takaki, G.M.; Sarubbo, L.A. (2014) Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Electron. J. Biotechnol.*, 17, 34–38.
164. Sandrin, C., Peypoux, F., and Michel, G. (1990). Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Appl Biochem.* 12, 370–375.
165. Sarafzadeh, P., Niazi, A., Oboodi, V., Ravanbakhsh, M., Hezave, A. Z., Ayatollahi, S. S., & Raeissi, S. (2014). Investigating the efficiency of MEOR processes using *Enterobacter cloacae* and *Bacillus stearothermophilus* SUCPM# 14 (biosurfactant-producing strains) in carbonated reservoirs. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 113, 46-53.
166. Schukin E, Pertsov A y Améline E (1988) "Química Coloidal", Ed. Mir, Moscú.
167. Sen, R., (2008). Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR. *Prog. Energy Combust. Sci.* 34, 714–724.
168. Sheppard, J.D., Jumarie, C., Cooper, D.G., and Laprade, R. (1991). Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes. *Biochem Biophys Acta.* 1064,13-23.
169. Shulga, A.N., Karpenko, E.V., Eliseev, S.A., Turovsky, A.A., and Koronelli, T.V. (1990). Extracellular lipids and surface-active properties of the bacterium *Rhodococcus erythropolis* depending on the source of carbon nutrition. *Mikrobiologiya.* 59,443-447.
170. Silva J, Rocha M, Rufino D, Luna M, Silva O y Sarubbo A (2014) Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. *Colloid Surface B.* 117:36-41.
171. Singer, M.E., and Finnerty, W.R. (1990). Physiology of biosurfactant synthesis by *Rhodococcus* species H13A. *Can. J. Microbiol.* 36,741-745.
172. Singh, A., Hamme, J.D., and Ward, O.P. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology. Part 2. Application aspects. *Biotechnol. Adv.* 25,99-121. Singh,

EFFECTO EN LA MOJABILIDAD DE UN SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO PRODUCIDO POR UN TENSIOACTIVO SINTETIZADO POR UNA CEPA FÚNGICA PETROFÍLICA

173. Singh, M., and Desai, J.D. (1989). Hydrocarbon emulsification by *Candida tropicalis* and *Debaryomyces polymorphus*. *Indian J Exp Biol.* 27(3),224–226.
174. Sobrinho, H.B.; Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Porto, A.L.F.; Sarubbo, L.A. (2013) Biosurfactants: Classification, properties and environmental applications. In *Recent Developments in Biotechnology*, 1st ed.; Studium Press LLC: Houston, TX, USA; Volume 11, pp. 1-29.
175. Sotelo Ruiz, E. D., González Hernández, A., Cruz Bello, G., Moreno Sánchez, F., & Cruz Cárdenas, G. (2011). Los suelos del Estado de México y su actualización a la base referencial mundial del recurso suelo 2006. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 2(8), 71-84.
176. Souza E, Vessoni P y Sousa O (2014) Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *Int. Biodeter. Biodegr.* 89:88-94.
177. Suzuki, T., Hayashi, K., Fujikawa, K., and Tsukamoto, K. (1965). Elucidation of the structure of polymyxin B1, *J. Biol. Chem.* 57,226.
178. T Wunder, J Marr, S Kremer, O Sterner, H Anke (1997) 1-Methoxypyrene and 1, 6-dimethoxypyrene: two novel metabolites in fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons
179. Teichmann, B., Linne, U., Hewald, S., Marahiel, M.A., and Bolker, M. (2007b). A biosynthetic gene cluster for a secreted cellobiose lipid with antifungal activity from *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*. 66,525- 533.
180. The World Factbook, 2015, [\(https://WWW.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/mx.html\)](https://WWW.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/mx.html).(2015)
181. Thimon, L., Peypoux, F., Wallach, J., and Michel, G. (1995). Effect of the lipopeptide antibiotic iturinA, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cell. *FEMS School let.* 128, 101-106.
182. Titan Oil Recovery I. • (2010-2012). Obtenido de: <http://www.titanoilrecovery.com/titanprocess1.html>.
183. Ueno, Y., Hirashima, N., Inoh, Y., Furuno, T., and Nakanishi, M. (2007). Characterization of biosurfactant-containing liposomes and their efficiency for gene transfection. *Biol. Pharm. Bull.* 30,169-172.
184. Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U., and Jung, G. (1986). Fengycin— a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *The J. Antibiotics* 39 (7),888- 901.
185. Villeneuve, P. (2007). Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnol. Adv.* 25, 515-536.
186. Volke-Sepúlveda, T., & Velasco-Trejo, J. A. (2003). Biodegradación de hidrocarburos del petróleo en suelos intemperizados mediante composteo. *Centro Nacional de Capacitación e Investigación Ambiental, Instituto de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México.*
187. Y Araujo. (2007). Estado del arte en métodos tensiométricos para la Determinación de la Adsorción de Surfactantes a Interfases Fluido-líquido. Informe técnico. Intevap S.A.

188. Y Araujo. (1999). Estudio Experimental de la Influencia de Heterogeneidades de Mojabilidad sobre las Fluctuaciones de la Línea de Contacto. Tesis Doctoral, UCV, Caracas-Venezuela
189. Yakimov, M., Amro, M., and Bock, M. (1997). The potential of *Bacillus licheniformis* strains for in situ enhanced oil recovery. *Journal of Petroleum Science Engineering*. 18,147-60.
190. Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V., and Fredrickson, H.L. (1995). Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl Environ Microbiol*.61,1706–1713.
191. Youssef, N., Simpson, D.R., Duncan, K.E., McInerney, M.G., Folmsbee, M., Fincher, M., and Knapp, R.M. (2007). In situ biosurfactant production by *Bacillus* strains injected into a limestone petroleum reservoir. *Applied Environ. Microbiol*. 73,1239-1247.
192. Zhao, X. (1999). Mannosylerythritol lipid is a potent inducer of apoptosis and differentiation of mouse melanoma cells in culture. *Cancer Res*. 59,482–486.
193. Zinjarde, S., and Pant, A. (2002). Emulsifier from tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *J Basic Microbiol*. 42,67–73.
194. Zosim, Z., Guntick, D.L., and Rosenberg, E. (1982). Properties of hydrocarbon in water emulsion. *Biotechnol. Bioeng*. 24,281;292.