



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO



DIVISIÓN ACADÉMICA DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

**INMOVILIZACIÓN DE BACTERIAS PETROFÍLICAS PRODUCTORAS DE
BIOTENSIOACTIVOS EN ZnO NANOESTRUCTURADO PARA LA
BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS EMULSIONADAS**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA

PRESENTA:

M.C. CECILIA DEL CARMEN DÍAZ REYES

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DRA. LAURA LORENA DÍAZ FLORES

EN CODIRECCIÓN DE:

DRA. MARCIA EUGENIA OJEDA MORALES

CUNDUACÁN, TABASCO, A 09 DE MAYO DE 2025

Declaración de Autoría y Originalidad

En la Ciudad de Cunduacán, Tabasco, el día 09 del mes de mayo del año 2025, el que suscribe M.C. Cecilia del Carmen Díaz Reyes, alumna del Programa de Doctorado en Ciencias en Ingeniería con número de matrícula 192D20001, adscrito a la División Académica de Ingeniería y Arquitectura, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, como autora de la Tesis presentada para la obtención del grado de Doctora en Ciencias en Ingeniería y titulada Inmovilización de Bacterias Petrofílicas Productoras de Biotensioactivos en ZnO Nanoestructurado para la Biorremediación de Aguas Emulsionadas dirigida por la Dra. Laura Lorena Díaz Flores.

DECLARO QUE:

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

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

Cunduacán, Tabasco a 09 de mayo de 2025.



Cecilia del Carmen Díaz Reyes



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ingeniería
y Arquitectura



DIRECCIÓN

OFICIO: DAIA/DIR/600/2025
FECHA: 16 de mayo de 2025
ASUNTO: Autorización de
impresión definitiva

M.C. IBQ: CECILIA DEL CARMEN DÍAZ REYES
PASANTE DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA
PRESENTE

En virtud de haber elaborado su trabajo de Tesis denominado:

"Inmovilización de bacterias petrofilicas productoras de biotensioactivos en ZnO nanoestructurado para la biorremediación de aguas emulsionadas"

Para obtener el grado de **Doctor en Ciencias en Ingeniería** y en el cual ha tenido como Directora de Tesis a la Dra. Laura Lorena Díaz Flores.

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

Sin otro particular, le envío un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE



DRA. DORA MARÍA FRÍAS MÁRQUEZ
DIRECTORA



DIRECCIÓN

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



JEFATURA DE POSGRADO

Cunduacán, Tabasco a 13 de mayo de 2025.

MEM/AP-DAIA/102/2025

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

Una vez hecha la revisión detallada del Trabajo de Tesis denominado:

“Inmovilización de bacterias petrofílicas productoras de biotensioactivos en ZnO nanoestructurado para la biorremediación de aguas emulsionadas”

Desarrollado por la M.C.IBO: **Cecilia del Carmen Díaz Reyes**, del **Doctorado en Ciencias en Ingeniería**, le comunicamos que aceptamos la impresión del trabajo, ya que el mismo ha cumplido con los requisitos necesarios.

COMITÉ SINODAL


DR. ERIK RAMÍREZ MORALES
PRESIDENTE


DR. MIGUEL ÁNGEL HERNÁNDEZ RIVERA
SECRETARIO


DRA. LAURA LORENA DÍAZ FLORES
VOCAL 1


DR. PÍO FUENTES GALLARDO
VOCAL 2


DRA. MARCIA EUGENIA OJEDA MORALES
VOCAL 3


DRA. YOLANDA CÓRDOVA BAUTISTA
VOCAL 4


DR. JOSÉ LUIS CERVANTES LÓPEZ
VOCAL 5

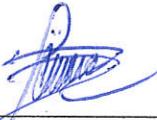
Carta de Cesión de Derechos

Cunduacán, Tabasco a 09 de mayo de 2025

Por medio de la presente manifestamos haber colaborado como AUTORAS en la producción, creación y/o realización de la obra denominada Inmovilización de Bacterias Petrofílicas Productoras de Biotensioactivos en ZnO Nanoestructurado para la Biorremediación de Aguas Emulsionadas.

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

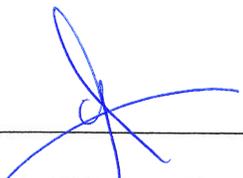
COLABORADORES


M.C. Cecilia del Carmen Díaz Reyes
EGRESADA


Dra. Marcia Eugenia Ojeda Morales
CODIRECTORA


Dra. Laura Lorena Díaz Flores
DIRECTORA

TESTIGOS


Dra. Yolanda Córdova Bautista


Dr. Francisco Alberto Hernández de la Rosa

Dedicatoria

“Porque todo lo puedo en Cristo que me fortalece.”
Filipenses 4:13

A Dios, mi creador. Por regalarme sus dones de sabiduría y entendimiento que me llevaron a terminar la presente tesis doctoral. Por ser en cada uno de los instantes de mi vida y en cada una de mis acciones, mi director, mi luz, mi guía, mi fuerza y todo el amor que hay en mi corazón.

A mi madre Gloria Reyes Arias, mi amiga y compañera de andanzas. Por su amor incondicional y estar siempre a mi lado, incluso en los capítulos más difíciles. Tu cariño servido en tazas de café y en el pozol bien frío, me inspiraron a llenar cada página de esta obra. Eres mi tesoro invaluable.

Hoy me sobran los motivos para decir:

¡Gracias Dios!

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Agradecimientos

A mi casa de estudios, la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco y a la División Académica de Ingeniería y Arquitectura. Por facilitarme los recursos necesarios para mi formación académica, que hoy, me abre puertas expandiendo mis horizontes.

Al CONAHCYT, por el apoyo otorgado 692689, mediante el proyecto 2019-000037-02NACF-09310 para la realización del posgrado.

Al TecNM, campus Villahermosa, mi alma mater y centro de trabajo, por otorgarme la beca comisión para realizar mis estudios de posgrado. No me queda más que retribuir con empeño y compromiso, compartiendo mis conocimientos al servicio de la formación de mis estudiantes.

A mi directora de tesis, la Dra. Laura Lorena Díaz Flores, por darme una oportunidad en medio de una dificultad, por ver mis capacidades antes que mis debilidades, por guiarme y compartir su conocimiento y liderazgo. Su guía me condujo al empoderamiento que hoy me permite tener entre mis manos esta magnífica obra. Gracias Dra., por encontrar los materiales óptimos que forjaron a esta nueva D.C.I.

A todos los integrantes de mi Comité Tutoral por su guía en este proceso, el apoyo de cada uno fue elemental para lograr esta meta. De igual manera especial, a mi codirectora, la Dra. Marcia Eugenia Ojeda Morales, por darme las facilidades para trabajar en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Bioprocesos.

A mis compañeros del grupo de Materiales Avanzados del CICTAT. A Silvia, Isaura, Claudio, Saúl, por su apoyo, su alegría y acompañamiento que hizo más significativo y llevadero este camino.

A mi colega, Hernández De la Rosa, por su asesoramiento y amistad, por ser mi red de contención durante mi trayectoria en el posgrado.

A mi amada familia, José Manuel, Migner y Ángel Gabriel, porque sencillamente son mi inspiración y el motor que mantiene encendido mi corazón.

A mis padres, Trinidad y Gloria. A quienes les debo lo que soy y por lo que estaré eternamente agradecida con Dios por regalarme unos padres excepcionales.

Índice de Contenido

Resumen	14
Abstract.....	15
I. Inmovilización de Bacterias Petrofílicas Productoras de Biotensioactivos en ZnO Nanoestructurado para la Biorremediación de Aguas Emulsionadas	16
1.1 Justificación.....	19
1.2 Pregunta de investigación	19
1.3 Hipótesis	20
1.4 Objetivos	20
1.4.1 Objetivo General.	20
1.4.2 Objetivos Específicos	20
II. Marco Teórico	21
2.1 Fundamentos de la Biotecnología	21
2.2 Biorremediación de Ambientes Contaminados con Hidrocarburos del Petróleo, Mediante el Uso de Microorganismos	22
2.2.1 Generalidades del Petróleo	23
2.3 Aislamientos de Bacterias en Aguas Congénitas.....	25
2.3.1 Bacterias Extremófilas y Productoras de Biotensioactivos.....	26
2.4 Tipos de Biotensioactivos y su Aplicación en la Industria	26
2.5 Inmovilización de Bacterias Potencialmente Degradadoras de Petróleo en Matrices Orgánicas e Inorgánicas	27
2.6 La Nanotecnología en Procesos Ambientales	28
2.6.1 Materiales Nanoestructurados Aplicados en la Remediación de la Contaminación...29	29
2.7 Nanopartículas de Óxido de Zinc (NPZnO)	30
2.7.1 Síntesis de Mecanoquímica para la Obtención de Nanopartículas de ZnO	31
2.7.2 Síntesis de Sol gel para la Obtención de Nanopartículas de ZnO.....	32
2.7.3 Síntesis de Precipitación para la Obtención de Nanopartículas de ZnO	33
2.8 Principios Físicos de las Técnicas Empleadas en el Análisis Físicoquímico, Morfológico y Estructural de los Polvos de ZnO Sintetizados.....	33
2.8.1 Difracción de Rayos X (DRX)	33
2.8.2 Microscopía Electrónica de Transmisión.....	34
2.8.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	35
2.8.4 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	36
2.9 Análisis de las propiedades texturales de las partículas por adsorción (BET).....	37

2.10 La espectrofotometría de absorción por UV-Vis.....	38
III. Metodología	40
3.1 Obtención de las Nanopartículas de Óxido de Zinc	40
3.2 Evaluación Estructural, Textural y Morfológica del Óxido de Zinc Nanoestructurado	41
3.2.1 Síntesis de Nanopartículas de ZnO por el Método de Precipitación	42
3.3 Análisis y Caracterización de las Muestras en Estudio	43
3.4 Aislamiento y Selección de la Cepa <i>Acinetobacter baumannii</i>	44
3.4.1 Análisis Fenotípico a Nivel Colonia	44
3.4.2 Estudio Taxonómico Mediante el Sistema API 20E.....	45
3.4.3 Análisis Estructural de la Célula Bacteriana Mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	45
3.5 Cinética de Crecimiento de la Bacteria <i>Acinetobacter baumannii</i>	45
3.6 Evaluación de la Producción de Biotensioactivo.....	46
3.7 Actividad Biotensoactiva Producido por la Cepa <i>Acinetobacter baumannii</i>	46
3.7.1 Ensayo de la prueba hemolítica.....	46
3.7.2 Prueba de dispersión de aceite.....	47
3.7.3 Ensayo de la gota colapsada.....	47
3.7.4 Índice de emulsión (IE ₂₄)	47
3.8 Extracción del Biotensioactivo.....	48
3.9 Caracterización Físicoquímica del Biotensioactivo	48
3.9.1 Identificación de Lípidos Polares Mediante una Cromatografía en Capa Fina	48
3.9.2 Identificación de Compuestos Orgánicos Mediante Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).....	48
3.9.3 Determinación de la Tensión Superficial del Biotensioactivo.....	49
3.10 Bioensayo para Evaluar la Capacidad Extremófila de la <i>Acinetobacter</i>	49
3.11 Bioensayo para Evaluar la Capacidad de Bacteria para Degradar Petróleo	49
IV. Resultados.....	50
4.1 Análisis Estructural por Difracción de Rayos X (DRX)	50
4.2 Análisis Estructural de Polvos de ZnO por Espectroscopía de Infrarrojo	51
4.3 Tamaños de Cristales Según los Métodos de Síntesis	52
4.4 Evaluación de las Propiedades Biotensioactivas de la Cepa Bacteriana Extremófila <i>Acinetobacter Baumannii</i> Aislada de Agua Congénita	62
4.5 Inmovilización de Cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> en el Alginato de Sodio Funcionalizado con ZnO	78

4.6 Análisis de las Microcápsulas Mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	79
4.7 Análisis de Espectroscopía Ultravioleta-Visible	81
V. Discusión	85
VI. Conclusiones	89
Recomendaciones y Perspectivas	91
Referencias.....	92

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Índice de Tablas

Tabla 1 Tipos de petróleo crudo en función de los grados API.....	24
Tabla 2 Tipos de petróleos mexicanos.....	25
Tabla 3 Principales biotensioactivos de origen microbianos.....	27
Tabla 4 Diseño factorial simple de la evaluación del ZnO nanoestructurado.....	41
Tabla 5 Nomenclatura de las muestras de polvos de ZnO caracterizadas.....	41
Tabla 6 Valores del tamaño de los cristales de ZnO.....	51
Tabla 7 Parámetros fisicoquímicos del agua congénita identificada (AC362) perteneciente al pozo de Petróleos Mexicanos (PEMEX).....	63
Tabla 8 Caracterización de la muestra de petróleo del pozo-362, propiedad de PEMEX, Tabasco.....	63
Tabla 9 Principales hidrocarburos presentes en la muestra de petróleo crudo.....	64
Tabla 10 Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a la cepa AC362-1, respuesta positiva (+).....	65
Tabla 11 Pruebas de la capacidad tensioactiva en CLC.....	70
Tabla 12 Datos experimentales de la biorremediación con el sistema biocatalítico.....	83
Tabla 13 Datos experimentales de la biorremediación con el sistema nanobiocatalítico (AZn).....	84
Tabla 14 Resumen de los hallazgos más relevantes en relación con la literatura actual.....	85

Índice de Figuras

Figura 1 Estructuras cristalinas del óxido de zinc	31
Figura 2 Diagrama de experimentos realizados para alcanzar los objetivos propuestos	40
Figura 3 Esquema de la síntesis de NPZnO, por el medio de precipitación.....	43
Figura 4 Difractograma de Rayos X de nanopartículas de ZnO.....	50
Figura 5 Espectro FT-IR del ZnO, sintetizado por el método de precipitación	52
Figura 6 Tamaño del cristal de los polvos de ZnO obtenidos de diferentes técnicas: 1,2,3 (mecanoquímica de 20, 40, 60 min de molienda), 4 (sol gel) y 5 (precipitación).....	53
Figura 7 Comparación de difractogramas de polvos de ZnO obtenidos por diferentes métodos de síntesis: SG-400, PP-400 y MQ20, 40, 60 min.	54
Figura 8 Micrografías de SEM de las muestras de ZnO sintetizadas por mecanoquímica; a) MQ-20, b) MQ-40, c) MQ-60	56
Figura 9 Micrografías de SEM de las muestras de ZnO sintetizadas por precipitación (PP-400)	57
Figura 10 Micrografías de SEM de las muestras de ZnO sintetizadas por Sol gel (SG-400)	58
Figura 11 Espectrograma de energía dispersiva de muestras de ZnO obtenidas por mecanoquímica a) MQ-20, b) MQ-40, c) MQ-60	59
Figura 12 Espectrograma de energía de muestras de ZnO obtenidas por precipitación (PP400)	60
Figura 13 Espectrograma de energía dispersiva de muestras de ZnO obtenidas por Sol gel (SG-400).....	60
Figura 14 Isotermas de adsorción-desorción de N ₂ , de muestras de ZnO obtenidas por sol gel.	61

Figura 15 Isotermas de adsorción-desorción de N ₂ , de muestras de ZnO sintetizadas por precipitación.....	62
Figura 16 Perfil cromatográfico de un petróleo pesado tipo Maya, del pozo-362 (PEMEX)	64
Figura 17 Micrografía de la <i>Acinetobacter baumannii</i> , analizada por TEM a diferentes escalas: a) concentración de bacterias en un campo de 10 µm; b) Longitud de las bacterias en µm; c) visualización de la división celular en µm; d) formación del diplococo en nm	67
Figura 18 Cinética de crecimiento de la <i>Acinetobacter baumannii</i>	68
Figura 19 Cinética del crecimiento en la producción de biotensioactivo. UFC vs Biotensioactivo (grL-1).....	69
Figura 20 Pruebas de la capacidad biotensioactiva en CLC. a) Prueba hemolítica, b) Dispersión de aceite, c) índice de emulsificación, d) Prueba de la gota colapsada	70
Figura 21 Cromatografía en capa fina en placas de sílice. a) Patrón de referencia, b) Muestra del biotensioactivo BTAC362	71
Figura 22 Espectro de absorción del biotensioactivo (AC362) y corrección de la línea base (AC362-LB).....	72
Figura 23 Tensión superficial del biotensioactivo BTAC362	73
Figura 24 Medición de absorbancia vs tiempo a temperatura 20, 45 y 80 °C en un bioensayo en condiciones extremas	74
Figura 25 Medición de absorbancia vs tiempo a pH 5, 7 y 9 en un bioensayo en condiciones extremas	75
Figura 26 Medición de la absorbancia vs tiempo a concentraciones de 10, 15 y 25 % de NaCl en un bioensayo en condiciones extremas.....	76
Figura 27 Cuantificación bacteriana UFCmL-1 y HTP en el bioensayo de biorremediación.....	77
Figura 28 Inmovilización de cepas bacteriana en alginato de sodio con NPZnO mediante el encapsulamiento.....	79

Figura 29 Micrografía SEM, de la bacteria <i>Acinetobacter baumannii</i> , inmovilizada en alginato de sodio con NPZnO. a) Morfología de la cápsula AZnO, b) Análisis elemental (EDS), c) Tamaño promedio de las células en la matriz polimérica.....	80
Figura 30 Micrografías de las células de <i>Acinetobacter baumannii</i> inmovilizadas en alginato de sodio (ANA), a) Centro activo de la cápsula b) Análisis elemental	80
Figura 31 Ensayo de biorremediación de aguas emulsionadas con HCs, mediante sistemas nanobiocatalítico	81
Figura 32 Curva de calibración de un petróleo pesado (HFP) por espectroscopía UV-vis	82
Figura 33 Degradación de HCs por el sistema biocatalítico evaluada por espectroscopía de UV-vis	83
Figura 34 Degradación de HCs por el sistema nanobiocatalítico evaluada por espectroscopía UV-vis	84

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Inmovilización de Bacterias Petrofílicas Productoras de Biotensioactivos en ZnO Nanoestructurado para la Biorremediación de Aguas Emulsionadas

Resumen

En la actualidad, la nanobiotecnología, ha permitido avances significativos en la remediación de contaminantes. En esta Tesis, se presenta la síntesis de nanopartículas de ZnO obtenidas por mecanoquímica, las cuales mostraron intensidad en el plano (101) típicas al ZnO y tamaños de cristal de 21.08 nm, superficies cuasi esféricas aglomeradas, con distribución de tamaño reducido y diámetros de ~111 nm. Además, de una energía dispersiva, asociada al Zn (1.0118 keV transición α) y al O (0.5249 keV transición α), una composición predominante de zinc (\approx 75-79 % masa) y menor concentración de oxígeno (\approx 18-22 % masa). También, se obtuvieron isotermas con bucle de histéresis estrecho, tamaños de poros de 32 nm y superficie de 41.36 m² g⁻¹. Por otro lado, se aisló una *Acinetobacter baumannii complex* con características extremotolerantes, evaluadas en medio líquido a pH 5, temperatura de 70 °C y salinidad del 30 %, y una población de 0.44, 0.74 y 0.77 DO_{600nm}, respectivamente. También, se obtuvo un biotensioactivo de la bacteria, de tipo lipopéptido asociado a sus grupos O=C-N, C-N. La bacteria presentó capacidad de metabolizar HCs, en un suelo contaminado con una eficiencia de 42.35 %.

Finalmente, se desarrolló un sistema nanobiocatalítico, basado en la inmovilización de la *Acinetobacter b.* en alginato con NPs ZnO. Se obtuvieron capsulas de 1 a 2 μ m, con bacterias de \sim 0.542 y \sim 0.60 μ m de ancho y largo, una composición mayor basada en carbono de 49.89 %, oxígeno 37.55 %, sodio 5.29 %. Se cuantificó una población de 30000 UFCgr⁻¹ de cápsulas. Con base en, lo anterior se realizó la biorremediación de un agua emulsionada a través del sistema nanobiocatalítico, con una eficiencia de 98.94 %. El sistema, promovió la interacción y aumentó la biodisponibilidad del contaminante para su biodegradación. Por lo tanto, esta investigación sugiere una estrategia sustentable para la recuperación de ecosistemas.

Abstract

Currently, nanobiotechnology has allowed significant advances in the remediation of contaminants. In this Thesis, we present the synthesis of ZnO nanoparticles obtained by mechanochemistry, which showed in-plane intensity (101) typical to ZnO and crystal sizes of 21.08 nm, agglomerated quasi-spherical surfaces, with reduced size distribution and diameters of ~111 nm. In addition, of a dispersive energy, associated with Zn (1.0118 keV $\text{I}\alpha$ transition) and O (0.5249 keV $\text{K}\alpha$ transition), a predominant zinc composition (≈ 75 -79 mass %) and lower oxygen concentration (≈ 18 -22 mass %). Also, isotherms with narrow hysteresis loop, pore sizes of 32 nm and surface area of 41.36 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ were obtained. On the other hand, an *Acinetobacter baumannii* complex with extremotolerant characteristics was isolated, evaluated in liquid medium at pH 5, temperature of 70 °C and salinity of 30 %, and a population of 0.44, 0.74 and 0.77 DO600nm, respectively. Also, a biotensioactive was obtained from the bacterium, of the lipopeptide type associated with its O=C-N, C-N groups. The bacterium was able to metabolize HCs in contaminated soil with an efficiency of 42.35 %.

Finally, a nanobiocatalytic system was developed, based on the immobilization of *Acinetobacter b.* in alginate with ZnO NPs. Capsules of 1 to 2 μm were obtained, with bacteria of ~ 0.542 and $\sim 0.60 \mu\text{m}$ in width and length, a major carbon-based composition of 49.89 %, oxygen 37.55 %, sodium 5.29 %. A population of 30,000 CFU g^{-1} of capsules was quantitatively measured. Based on the afore mentioned findings, the bioremediation of an emulsified water was carried out through the nanobiocatalytic system, with an efficiency of 98.94%. The system promoted the interaction and increased the bioavailability of the pollutant for its biodegradation. Therefore, this research suggests a sustainable strategy for ecosystem recovery.

Palabras claves. Biorremediación, *Acinetobacter*, MALDI-TOF, biotensioactivo, microcápsulas.

I. Inmovilización de Bacterias Petrofílicas Productoras de Biotensioactivos en ZnO Nanoestructurado para la Biorremediación de Aguas Emulsionadas

Uno de los desafíos más importantes del siglo XXI es la preservación del suelo, agua y calidad del aire. La contaminación de los ecosistemas ha ido en aumento como resultado del crecimiento demográfico y las actividades antropogénicas. Por otro lado, la actividad petrolera es de las principales fuentes de contaminación e impacto ambiental es donde el derrame accidental de hidrocarburos ocasiona efectos adversos mediante la volatilización, disolución, emulsificación y sedimentación de contaminantes en agua, suelo y aire, tal como se menciona en (Pérez Muñoz y col., 2020).

La sobreexplotación de las fuentes del petróleo con fines energéticos, así como los procesos de manejo, distribución y transporte, ha originado gran parte del efecto negativo socioambiental. En este contexto, México, es el décimo primer productor de petróleo, a nivel mundial, tan solo en Veracruz y Campeche se encuentran más de 2000 pozos marinos, en el Golfo de México. Basándose en el artículo de (Pulster y col., 2020) de la revista *Scientific Reports*, existen informes históricos que reportan que el 5% del petróleo esparcido en aguas de América del Norte, fue relacionado con la extracción y transporte de éste, mientras un 32% provenía de las filtraciones naturales; y un 60% del consumo de petróleo a través de escorrentía terrestre, marinas y deposición atmosférica. Por otra parte, en el proceso de refinación del petróleo, la contaminación de aguas someras por derrames de reactores es frecuente. México cuenta con 7 refinerías de crudo, una de ellas ubicada en el Estado de Tabasco; según (Moscoso-Baeza & de Escobar-Fernández, 2022), de ahí que es evidente que este estado depende económicamente de la explotación de petróleo, y por ende es imperativo proponer soluciones sustentables para la remediación de agua y suelos contaminados por petróleo.

Apoyándose en la descripción de Pérez Muñoz y col. (2020), el petróleo se caracteriza por ser un líquido viscoso negro y de composición química compleja, perteneciente a la familia de los hidrocarburos. La composición elemental del petróleo es carbono (84-87%), hidrógeno (11-14%), azufre (0-8%), oxígeno y nitrógeno (0-4%). Por consiguiente, para mitigar los daños causados por la contaminación con hidrocarburos, se han empleado numerosas tecnologías de remediación. Entre las que se encuentran algunas como: electrorremediación, limpieza de suelos, estabilización, consolidación, tratamiento de aguas, descontaminación química, oxidación, lixiviación y

biorremediación. De las técnicas mencionadas, la mayoría requiere de equipos especiales y grandes inversiones para su desarrollo, tal y como lo mencionan Teklit Gebregiorgis y col., (2023). Una de las técnicas más aplicable debido a su bajo costo y toxicidad es la biorremediación, mediante el uso de bacterias que desarrollar capacidades fisiológicas naturales de degradación de sustratos para oxidar, transformar e inmovilizar, e incluso unirse al contaminante por lo que resulta un método factible de desarrollar. De ahí que (Orellana y col., 2022) exponen que la biorremediación es una estrategia eficiente, ecológica y rentable que implica el uso de bacterias y hongos en monocultivos y consorcios. (Dangi y col., 2019), también explican como el uso de procesos biológicos para limpiar suelo y aguas contaminadas con la biorremediación recibe especial atención por ser de bajo costo y ambientalmente amigable. Ya que este proceso contribuye a la oxidación, degradación, transformación y completa mineralización de estos contaminantes en agua y suelo. Por lo tanto, la optimización de la biorremediación con sistemas biológicos microbianos donde se exploran redes complejas y su interconexión en procesos a nivel molecular, celular, de población, de comunidad y de ecosistema, la hace factible para el saneamiento ambiental.

(Sakamoto y col., 2021) reportaron que la presencia de petróleo en los acuíferos profundos genera microorganismos de los tipos: heterótrofos y autótrofos; entre estos organismos se encuentran: *pseudomonas*, *acinetobacter* y *micrococcus*. Mediante reacciones de oxido-reducción, los heterótrofos reducen el oxígeno, nitrato y sulfato, así como algunos bicarbonatos, mientras que los autótrofos reducen el manganeso, hierro, bicarbonatos y nitrógeno. En relación con los hidrocarburos policíclicos y aromáticos (HPA), estos presentan una toxicidad elevada, así como características mutagénicas y carcinogénicas que pueden ser biorremediados mediante la aplicación de biotensioactivos, moléculas anfifílicas con características tensioactivas, emulsificantes y dispersivas.

(Sakamoto y col., 2021) también exponen que existen microorganismos capaces de producir Biotensioactivos, mejorando así la biodisponibilidad y facilitando la asimilación de los sustratos insolubles al incrementar su solubilidad. Existen bacterias capaces de desarrollarse en ambientes con condiciones extremas, por ejemplo, en concentraciones salinas y pH ácido. Con base en sus condiciones fisiológicas, los microorganismos requieren valores óptimos para su crecimiento, siendo clasificados como halófilos, halotolerantes, alcalófilos o alcalotolerantes.

Con la nanobiotecnología, según (Salem, 2023), los procesos ambientales han mejorado debido a las características estructurales y funcionales de los compuestos a diferentes escalas de tamaño. Al interactuar desde el nivel atómico-molecular hasta una escala nanométrica, se han logrado desarrollar procesos de biocatálisis y métodos para la preparación de ensamblajes o complejos enzimáticos. La nanotecnología y los procesos biotecnológicos tienen sus aplicaciones y productos de base biológica que involucran reacciones químicas como la biocatálisis, la inmovilización de compuestos soportados en diversos nanomateriales. Jain y col. (2024) reportan que algunos de los catalizadores nanoestructurados mejoran la actividad y estabilidad de los bioprocesos. Los nanosopores, especialmente los basados en sílice, ofrecen ventajas como mayor área superficial y propiedades ópticas únicas. Estos, han sido utilizados en la administración de fármacos, control de contaminación y procesos catalíticos debido a sus propiedades de tamaño de poro, morfología y área superficial que influyen en la inmovilización de enzimas y su actividad destacando avances con aplicaciones en biocombustibles y biorremediación.

En las etapas iniciales de nanobiocatálisis, Reshmy (2021) se basó principalmente en la inmovilización de enzimas en soportes nanométricos mediante técnicas tradicionales de inmovilización como la adsorción física, la unión covalente, el atrapamiento y la inmovilización sin portador. Este enfoque atrajo la atención a la inmovilización de enzimas sobre una gran superficie de materiales nanoestructurados, tales como materiales nanoporosos, nanofibras electrohiladas y nanopartículas magnéticas. Es importante resaltar que las nanopartículas con tamaños menos a 100 nm y una superficie específica mayor a $1 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$, resultan ser más reactivas, presentan conductividad eléctrica y magnética, revolucionando los procesos nanobiocatalíticos y favoreciendo la estabilidad y actividad enzimática.

Por lo anterior, este documento presenta el marco teórico, que sustenta esta investigación, los objetivos planteados y la justificación del trabajo; también se describe la parte experimental propuesta y realizada para dar cumplimiento a los objetivos programados. De igual manera, se presentan resultados obtenidos de la fase experimental y la discusión de estos. Por último, las conclusiones de la investigación y recomendaciones futuras.

1.1 Justificación

La producción de petróleo es una de las principales causas de contaminación del suelo y el agua. Los hidrocarburos derivados del petróleo tienen la capacidad de infiltrarse en el mar en grandes cantidades de compuestos insolubles que pueden dispersarse a grandes distancias por las corrientes oceánicas. Por lo tanto, como lo declaran (Pérez Muñoz y col., 2020), entre los desastres ambientales más severos se encuentran los derrames de petróleo en ríos, mares, y océanos. La biorremediación, es una estrategia respetuosa con el medio ambiente, para recuperar sitios contaminados con hidrocarburos, mediante el uso de bacterias, algas, hongos y levaduras. Según (Ayilara & Babalola, 2023), expusieron que estos microorganismos utilizan el contaminante como fuente principal de carbono transformándolo en moléculas inorgánicas como H_2O y CO_2 a través de la degradación aerobia.

Los materiales inorgánicos como los óxidos metálicos se emplean como nanocatalizadores, promoviendo los procesos de nanocatálisis en tratamiento de aguas residuales, a su vez, presentan propiedades antimicrobianas y mejoran la reacción redox. Por otro lado, (Biswas & Rai, 2024) demostraron que la reacción fotocatalítica de nanopartículas metálicas, como el ZnO degradan contaminantes orgánicos, detergentes, tintes, etc. Además, actúan como un fotocatalizador potente, ante factores como el pH, la energía de ancho de banda, siendo que la concentración del contaminante y el tamaño de las partículas los que modulan el proceso de catálisis.

La presente investigación propone diseñar un sistema nanobiocatalítico basado en la inmovilización de bacterias degradadoras de petróleo y productoras de biotensioactivos, sobre una matriz polimérica con ZnO nanoestructurado para eficientar el proceso de biorremediación de aguas emulsionadas con petróleo.

1.2 Pregunta de investigación

¿Cómo afecta el encapsulamiento de las bacterias en una matriz polimérica funcionalizada con ZnO nanoestructurado a la tasa de biodegradación de petróleo en aguas contaminadas?

1.3 Hipótesis

El encapsulamiento de la *Acinetobacter baumannii* en alginato de sodio funcionalizado con NP de ZnO, aumenta la capacidad de la bacteria para metabolizar hidrocarburos derivados del petróleo en el proceso de biorremediación.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General.

Desarrollar un sistema nanobiocatalítico, con bacterias hidrocarbonoclastas productoras de biotensioactivo, inmovilizadas en alginato de Na/ZnO nanoestructurado para la biorremediación de aguas emulsionadas con petróleo.

1.4.2 Objetivos Específicos

1. Identificar las propiedades estructurales y morfológicas de polvos de ZnO sintetizados por mecanoquímica que permita las condiciones idóneas para la interacción (unión) entre el sistema bacteria-nanopartículas.
2. Aislar en condiciones *in vitro* un consorcio de bacterias autóctonas, con características extremófilas, petrofilicas, para la síntesis de un biotensioactivo.
3. Inmovilizar y caracterizar un sistema nanobiocatalítico basado en bacterias degradadoras de petróleo mediante cápsulas de alginato con nanopartículas de ZnO.
4. Evaluar un proceso de biorremediación en aguas emulsionadas con hidrocarburos del petróleo con el sistema nanobiocatalítico, mediante la cinética microbiana y espectroscopía de UV-vis.

II. Marco Teórico

2.1 Fundamentos de la Biotecnología

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD. 2016) define a la biotecnología como la aplicación de principios de la matemática y la ingeniería para los tratamientos de materiales orgánicos e inorgánicos mediante sistemas biológicos para producir bienes y servicios. La biotecnología inició en los años cincuenta con la biología molecular al ser descubierta la estructura del material genético (ADN) por James Watson y Francis Crick en 1953. Así mismo, Manuel Cortés (2023) menciona el surgimiento de la ingeniería genética y las técnicas de ingeniería recombinante, así como rápidos desarrollos en nanotecnología del ADN (material genético artificial). Todos estos avances no hubiesen sido posibles sin la revolucionaria propuesta del Modelo de Doble Hélice hace setenta años atrás. Hoy en día, la biotecnología se considera como una actividad multidisciplinaria cuyo sustento es el conocimiento en diversas disciplinas como la ingeniería bioquímica y la microbiología, que permiten el estudio integral y la manipulación de los sistemas biológicos.

Acosta Murillo (2022), explica como la biotecnología se clasifica por colores, según sus aplicaciones: verde para agricultura; roja para medicina; blanca, también conocida como “industrial”, ha sido empleada para obtener productos químicos, enzimas y catalizadores biológicos. La azul o “marina”, describe las aplicaciones en ambientes marinos y acuáticos. La gris es la biotecnología del ambiente aplicada al mantenimiento de la biodiversidad, a la preservación de las especies y la eliminación de contaminantes mediante el proceso de biorremediación, haciendo uso de plantas y microorganismos para la reducción de contaminantes.

En esta última aplicación, su enfoque principal es la remediación y restauración de los sitios contaminados a bajo costo, y al mismo tiempo, es amigable con el medio ambiente. En el artículo de Yousuf (2020), se reportaron bacterias diazótroficas heterótroficas en ambientes estuarinos y costeros y se evaluó su capacidad fijadora mediante reducción de acetileno, y destacando *Nitratireductor kimnyeongensis* con alta fijación. *Klebsiella pneumonia*, *K. quasipneumonia* y *K. variicola* también mostraron actividad relevante. En general, las bacterias gramnegativas superaron a las grampositivas en fijación de nitrógeno ($p < 0,01$).

Por lo general, los métodos de tratamiento biológico dependen de la capacidad de los microorganismos para degradar residuos aceitosos y convertirlos a compuestos de dióxido de carbono, agua y biomasa. Madigan y col. (2019), mencionan que la eficiencia de degradación, a través de reacciones bioquímicas depende de las condiciones controladas de pH, temperatura, humedad, disponibilidad de componentes que se encuentran en el ambiente, entre otros factores.

2.2 Biorremediación de Ambientes Contaminados con Hidrocarburos del Petróleo, Mediante el Uso de Microorganismos

Las bacterias son organismos pequeños que tienen una maquinaria requerida para el crecimiento y la replicación; están integradas por células eucariotas, proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos. Rodríguez Uribe y col. (2021), explicaron que viven en diferentes medios, algunas pueden sobrevivir en un ambiente ácido, otras en medios alcalinos o salinos. Sus tamaños en longitud pueden variar desde 0.2 μm hasta 8 μm , inclusive contienen diferentes estructuras tanto externas como internas junto con sus funciones específicas. Las bacterias se adaptan a las condiciones severas de latencia (factores físicos) tales como el potencial redox, pH, salinidad, temperatura, presión y escasez de nutrientes. De igual manera, expusieron que los hidrocarburos son una fuente de carbono y energía para el crecimiento bacteriano, de ese modo llegan a colonizar y degradar distintos contaminantes; especialmente los microorganismos que crecen en presencia de hidrocarburos producen una serie de sustancias con propiedades tensioactivas llamadas "biosurfactantes".

La respiración de los microorganismos influye sobre las capacidades metabólicas de modo que se clasifican como: organismos metanogénicos, bacterias sulfato reductoras, microorganismos fermentativos, bacterias reductoras de nitratos y bacterias reductoras de hierro, tal y como lo mencionaron Yousuf y col. (2020). En general, las bacterias gramnegativas superaron a las grampositivas en fijación de nitrógeno ($p < 0,01$), lo que sugiere su papel clave en la producción primaria de bioproductos metabólicos.

Las bacterias reductoras de nitratos utilizan nitratos como aceptores de electrones para reducir nitratos a nitritos y después a nitrógeno molecular o amonio. Según (Hernández Rivera y col., 2020), las metanógenas producen biogás que levanta la presión en yacimientos de petróleo, además, pueden prosperar en un amplio rango

de ambientes anaerobios, teniendo rangos de temperatura que van desde los límites de las mesófilas hasta las extremófilas.

2.2.1 Generalidades del Petróleo

El (Servicio Geológico Mexicano, 2017) publicó que la palabra petróleo viene del latín *Petroleum* que significa aceite de roca. Es un líquido natural oleaginoso e inflamable, constituido por una mezcla de hidrocarburos que se presentan en la naturaleza en lechos geológicos continentales o marítimos, ya sea en estado sólido, líquido o gaseoso, estas tres fases pueden pasar de una a otra por efecto de cambio de presión y temperatura. Los constituyentes del petróleo se clasifican en cuatro grupos orgánicos definidos: saturados (S), aromáticos (A), resinas y asfáltenos (A); a este conjunto se le conoce como "SARA". De igual forma, (Pérez Muñoz y col., 2020) explican como las impurezas se clasifican en *oleofóbicas* y *oleofílicas*; según el tipo, las oleofóbicas son tratadas antes y las oleofílicas durante la refinación. La identificación de los componentes del petróleo representa su calidad y precio en el mercado, por tal razón, es importante clasificarlos de acuerdo con lo siguiente: si su base es parafínica, naftica o mixta.

Según su base parafínica, suelen ser crudos muy fluidos de color claro y peso específico de 0.85 kgL^{-1} . Su fórmula molecular como señaló el Servicio Geológico Mexicano. (2017), está en función al número de átomos de carbono e hidrógenos (C_nH_{n+2}) y, se caracterizan por presentar cadenas largas o ramificadas. Dentro de las cadenas más ligeras se consideran a los gases o ceras parafínicas, mientras que, las de cadena ramificadas son las de fracciones pesadas. Según (Galimzyanov y col., 2025), los crudos de base naftica, son muy viscosos y de coloración oscura, sus moléculas presentan la fórmula C_nH_{n+2} , formando estructuras cíclicas. Dentro de los más predominantes son los naftenos de un solo anillo (de 5 a 6 Carbonos), mientras que, los componentes más pesados son los de dos anillos que se encuentran en la nafta. El Servicio Geológico Mexicano (2017), también indica que, los hidrocarburos de base mixta son llamados aromáticos, y se caracterizan por poseer anillos insaturados, con estructuras complejas de dos o tres anillos fusionados, que se encuentran en las fracciones más pesadas del crudo.

Con base en lo anterior, el crudo pesado tiene menos hidrocarburos saturados y mayores compuestos polares, sin embargo, cabe resaltar que los de fracción ligera, resultan ser más tóxicos, pero presenta mayor degradabilidad de sus componentes. De acuerdo con American Society for Testing & Materials (ASTM), existe otra clasificación según su composición con base al contenido de azufre (S) presente en el petróleo y gas en forma de ácido sulfhídrico H₂S, tioles, mercaptanos, sulfuros, polisulfuros, etc., o azufre elemental; a esta propiedad se le atribuye el término dulce (Sweet) y agrio (Sour), con valores inferiores al 0.50 % y superior al 0.50 % de S, respectivamente. Con referencia al, *American Petroleum Institute* (API), el petróleo crudo se clasifica con base a su densidad en °API (Tabla 1). Esta escala es un comparativo del peso del combustible contra el peso del agua a una temperatura específica de 289 °K (15.56 °C). ASTM International. (2024).

Tabla 1

Tipos de petróleo crudo en función de los grados API

Crudo	Densidad (g.cm⁻³)	Densidad Grados API
Extrapesado	>1.0	10.0
Pesado	1.0 – 0.92	10.0 – 22.3
Mediano	0.92 – 0.87	22.3 – 31.1
Ligero	0.87 – 0.83	31.1 – 39.0
Superligero	<0.83	>39.0

En la Tabla 2 se enlistan los tipos de crudos mexicanos y sus valores de contenido de azufre, volumen de agua (%), sedimentos (%) y densidad °API. Esta última es considerada por (API) como una de las más importantes siendo el petróleo, ligero el más cotizado del mercado. Moscoso-Baeza y de Escobar-Fernández (2022), dicen que en México existe una mezcla de crudos, y desde el 2018 el país se mantiene en el undécimo lugar con mayor reserva de producción de petróleo crudo y principal fuente energética.

Tabla 2

Tipos de petróleos mexicanos

Benchmark	°API	Azufre (% en peso)	Agua y sedimentos (% volumen)
Maya	21.0 – 22.0	3.4 – 3.80	0.5
Istmo	32.0 – 33.0	1.80	0.5
Olmecca	38.0 – 39.0	0.73 – 0.95	0.5
Altamira	15.0 – 16.5	5.5 – 6.00	1.0

2.3 Aislamientos de Bacterias en Aguas Congénitas

En México, (Montiel Garza, 2019) menciona que, la empresa paraestatal *Petróleos Mexicanos (PEMEX)*, realiza la desalación y deshidratación del crudo mediante la separación del agua por campo eléctrico que debilita la barrera interfacial agua-aceite; lo que genera un efluente de agua residual que representa un problema potencial durante el proceso de producción de hidrocarburos, impactando al ambiente marino y afectando a la flora y fauna. Las aguas congénitas son un tipo de agua residual que se halla dentro de la roca, asociada a la presencia de hidrocarburos, puede contener sales disueltas como cloruro de calcio, sodio, carbonato de sodio, cloruro de potasio, sulfato de calcio, bario, incluso algunos metales pesados. En mayo de 2003, se aprobó la Norma Oficial Mexicana NOM-143-SEMARNAT-2003, publicada en el (Diario Oficial de la Federación, 2005), que establece las especificaciones ambientales para el manejo del agua congénita. En México durante el 2002, en la explotación de petróleo crudo y de gas natural, se produjeron 12.09 millones de metros cúbicos de agua congénita de los cuales se reinyectó 86.4% y se dispuso en cuerpos receptores el 14.6% restante.

Se ha descubierto vida microbiana en ambientes marinos extremos, que han sido clasificados como extremófilos y termófilos. Según (Joseph, 2023), estos organismos presentan una complejidad celular con mecanismos bioquímicos efectivos de protección de órganos y celular, que les permiten la adaptación a las condiciones adversas. (Rao y col., 2022) argumentaron que, a través de técnicas microbiológicas se llevan a cabo aislamientos de microorganismos, su identificación y adaptación en condiciones *in vitro*. Con el paso del tiempo, han adquirido mayor relevancia en áreas biomédicas, farmacéuticas, agrícolas, etc.

2.3.1 Bacterias Extremófilas y Productoras de Biotensioactivos

(Madigan y col., 2015) afirmaron que la biodiversidad microbiana representa el 60 % de la biomasa total en el planeta, habitan en el subsuelo marino y terrestre, y tienen mayor diversidad metabólica. Así mismo, (Rao y col., 2022) explicaron que, en el planeta existen ambientes extremos que presentan temperaturas altas entre 55–121 °C o bajas de 22 a 20 °C, salinidad de NaCl 2–5 M, alcalinidad con pH>8 y acidez con pH<4, que sustentan la vida de otros grupos de microorganismos que sobreviven a tan diversas condiciones. (Lara-Severino y col., 2017) hallaron otros microorganismos heterótrofos como *pseudomonas*, *acinetobacterias* y *micrococcus* que reducen el oxígeno, nitrato, sulfato, y algunos bicarbonatos, mediante reacciones de oxido-reducción. Mientras que los autótrofos reducen el manganeso, hierro, bicarbonatos y nitrógeno. Generalmente, para su crecimiento óptimo, las bacterias requieren condiciones fisiológicas de salinidad y pH y se categorizan en halófilas, halotolerantes, alcalófilos o alcalotolerantes.

2.4 Tipos de Biotensioactivos y su Aplicación en la Industria

De ahí que (Joseph, 2023), reportó un aumento en el interés por investigar y desarrollar proyectos biotecnológicos empleando microorganismos aislados de hábitats con altas concentraciones de salinidad, hidrofobicidad, y temperaturas extremas. expusieron la producción de metabolitos microbianos como exopolímeros, lipopolisacáridos extremoenzimas y biotensioactivos, compuestos anfífilos que solubilizan fases inmiscibles y actúan como emulsionantes, espesantes, antioxidantes y agentes quelantes. Según Ali y col. (2020), los biotensioactivos tienen aplicaciones en las industrias farmacéutica y médica, alimentaria, cosmética, pesticida, petrolera y de biodegradación. Por otro lado, los hidrocarburos policíclicos y aromáticos (HPA) presentan alta toxicidad, propiedades mutagénicas y carcinogénicas. Aunque, (Ahmad y col., 2018) afirmaron que estos son biorremediados a través del uso de biotensioactivos, que son moléculas anfífilas con propiedades tensioactivas, emulsionantes y dispersantes. Algunos ejemplos se enlistan en la Tabla 3, que presenta los principales biotensioactivos de origen microbiano que mejoran la biodisponibilidad, facilitan la asimilación de sustratos insolubles e incrementan la solubilidad.

Tabla 3

Principales biotensioactivos de origen microbianos

Clase	Fuente microbiana
Glicolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas cepacia</i>
	<i>Lysinibacillus sphaerica</i>
	<i>Rhodococcus sp</i>
	<i>Nocardia farcinica</i>
	<i>Candida bombicola</i>
	<i>Starmerella bombicola</i>
	<i>Candida sphaerica</i>
	<i>Candida magnolia</i>
	<i>Torulopsis petrophilum</i> <i>Torulopsis apícola</i>
Lipopéptidos	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Kocuria marina</i>
	<i>Bacillus licheniformis</i>
Fosfolípidos	<i>Pseudomonas putida</i>
	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Biosurfactantes poliméricos	<i>Candida lipolytica</i>
	<i>Acinetobacter calcoceticus</i>

2.5 Inmovilización de Bacterias Potencialmente Degradadoras de Petróleo en Matrices Orgánicas e Inorgánicas

El uso de células bacterianas inmovilizadas en el área ambiental se ha incrementado por la gran biodiversidad de microorganismos identificados fenotípica y genotípicamente. Existen procesos biotecnológicos llevados a cabo mediante el uso de células inmovilizadas, y que emplean técnicas como adsorción y atrapamiento en matrices poliméricas bajo mecanismos de interacción iónica. Para esto, (Ambaye y col., 2021) reportaron el uso de materiales con áreas superficies grandes ($>1.0 \text{ gm}^{-2}$) tales como el carbón activado, agar, gel de poliacrilamida, alginatos, quitosano, residuos lignocelulósicos, etc. La aplicación de estos materiales es principalmente el campo ambiental como la agricultura, biocontrol, aplicación de pesticidas y fertilizantes,

degradación de contaminantes en aguas subterráneas, etc. Como indicaron (Farias y col., 2021), los materiales de soporte deben cumplir con algunas características como, alta resistencia mecánica, porosidad, biodegradabilidad, entre otras. De ahí que, en procesos de sorción de contaminantes, las células bacterianas inmovilizadas favorecen la disolución y difusión del fluido a través de los poros del soporte, además, la presencia de sustancias tensioactivas incrementa la transferencia y favorecen el consumo y transporte difusivo del contaminante a través de la matriz del soporte.

Azees y col. (2022) reportaron la inmovilización de *S. cerevisiae* en alginato de calcio con NP magnéticas para aumentar la producción de bioetanol de trigo, logrando un rendimiento óptimo de (49.71 gL^{-1}) . Por otro lado, se obtuvieron 45.66 gL^{-1} y 36.52 gL^{-1} de bioetanol mediante células inmovilizadas y células libres respectivamente, en condiciones óptimas de pH 4.5, 72 h a $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Por otra parte, (Reyes Reyes, 2018) señaló que, un consorcio bacteriano de cinco cepas degradadoras de crudo de los géneros *bacillus sp.*, *pseudomonas sp.*, *serratia sp.*, *raoultella sp.* y *enterobacter sp.*, inmovilizadas en matrices orgánicas (alginato de sodio y poliuretano), resultaron más eficientes en términos de cantidad de biomasa bacteriana.

2.6 La Nanotecnología en Procesos Ambientales

Según indicó Salem (2023), la nanotecnología, es una disciplina diversa e interdisciplinaria, examina numerosas áreas de la ciencia y la tecnología a escala nanométrica. Dado que las estructuras biológicas como el ARN, ADN y orgánulos subcelulares pueden considerarse nanoestructuras, la nanotecnología y la biotecnología también han estado estrechamente vinculadas a la nanociencia.

Araújo y col. (2022), expuso como la nanobiotocatálisis ha desarrollado nuevas biotransformaciones que abarcan interacciones moleculares complejas a nivel atómico entre el medio ambiente y todos los componentes de la reacción. Dando a los materiales nanoestructurados una especial atención como soporte para la inmovilización de enzimas, se han desarrollado diversos trabajos sobre nanobiotocatálisis. En la investigación de (Silva-Torres y col., 2019), se sintetizaron nanojaulas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ con un tamaño medio de 170 nm, utilizados como soporte para la inmovilización covalente con enzimas ligninolíticas fúngicas (versátil peroxidasa y lacasa). En este estudio, ambas enzimas tienen la capacidad de degradar una amplia gama de contaminantes, las nanocajas de lacasa exhibieron una tasa catalítica 18 veces mayor

inmovilizadas, en comparación a las enzimas libres. Por otro lado, Sadeghi, A. (2024), expusieron que las levaduras encapsuladas tienen diversas aplicaciones industriales en diferentes áreas de la biotecnología, como la biorremediación de toxinas o metales pesados, la biofiltración y la producción de biocatalizadores o bioetanol.

Ahmad y Reddy (2019), demostraron mediante un consorcio inmovilizado sobre nanopartículas de óxido de zinc el aumento de la producción en promedio de 4.5 L de biogás, a partir de aguas residuales. Además de la reducción de CH₄ y la demanda química de oxígeno a 84.5 y 95.7 %, respectivamente. Además, este bioproceso se realizó en un reactor aerobio que permitió examinar la capacidad de retención de biomasa en términos de sólidos volátiles y actividad metanogénica específica. Finalmente, los científicos están desarrollando mecanismos de inmovilización microbiana en soportes nanoestructurados para la obtención de nuevos nanobiocatalizadores con altas propiedades específicas.

2.6.1 Materiales Nanoestructurados Aplicados en la Remediación de la Contaminación

Ali, N. (2020), definió que los nanomateriales son sistemas que contienen partículas al menos con una dimensión en el nanómetro (10^{-9} del metro). Trata de materiales o estructuras a escala nanométrica y se define como el diseño, la fabricación y aplicación de nanoestructuras o nanomateriales y la comprensión fundamental de las relaciones entre las propiedades físicas o de los fenómenos y sus dimensiones. La nanotecnología, con base a Aziz y col. (2020), involucró una transición de la mecánica clásica a la mecánica cuántica. Es decir, el contar con materiales de dimensiones cercanas a las distancias interatómicas, pone de manifiesto la necesidad de atender conceptos de uniones químicas, fuerzas de interacción, y fuerzas de enlace, lo cual implica trabajar con sistemas más complejos. Según Chávez-Hernández, J. A., (2024), la Agencia del Medio Ambiente (EPA) de EUA, clasifica a los nanomateriales en:

- Basados en carbono: estos suelen adoptar formas de esferas huecas y otras de formas cilíndricas que reciben el nombre de nanotubos, como el grafeno y nanotubos de carbono.
- Los basados en metales: se encuentran las nanopartículas de oro, y plata y óxidos metálicos como el dióxido de titanio (TiO₂).
- Puntos cuánticos, como los puntos cuánticos de cerio.

- Dendrímeros: son nanoestructuras poliméricas ramificadas, presentan propiedades importantes para el área de la catálisis, y la administración de fármacos.
- Compuestos: son aquellas que combinan estructuras orgánicas e inorgánicas.

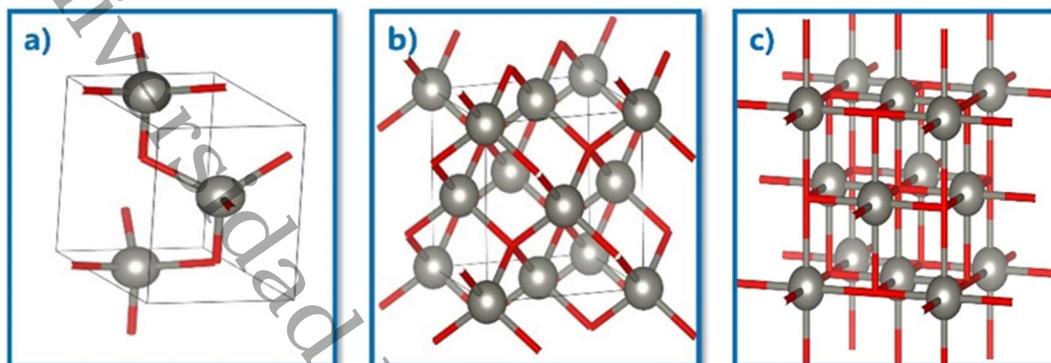
Esta clasificación ayuda a identificar sus propiedades, aplicaciones y riesgos potenciales en diferentes industrias, favoreciendo un enfoque más seguro en su uso y regulación. Por otra parte, (Cadena Castro y col., 2018) mencionaron que, los nanomateriales híbridos (NHM), son una clase de nanomateriales biocompatibles, empleados como dispositivos para la administración de agentes terapéuticos activos o agentes para bioimágenes. Las NPs metálicas/óxidos metálicos son un tipo de NHM que presentan nuevas propiedades eléctricas, ópticas magnéticas y químicas, así como también interactúan con polímeros, surfactantes, óxidos metálicos y otras moléculas orgánicas. En este sentido, el diseño y la aplicación de materiales nanoestructurados representa un área importante de creciente interés.

2.7 Nanopartículas de Óxido de Zinc (NPZnO)

Nunes y col., (2019), señalaron que, los óxidos metálicos de transición nanoestructurados son de interés en nanobiotecnología por sus propiedades ópticas y eléctricas, con sus cristales semiconductores unidos con la energía de enlace (60 meV). De igual manera explicaron que el ZnO, posee una alta transmitancia en el rango visible y una banda prohibida amplia (~3.3 eV), lo que lo hace ideal para dispositivos optoelectrónicos como celdas solares y LEDs UV. Por otro lado, presenta una excelente estabilidad térmica y dureza moderada, buena adherencia en sustratos, siendo útil en recubrimientos y protectores. En la Figura 1 se presentan las tres estructuras cristalinas.

Figura 1

Estructuras cristalinas del óxido de zinc



El ZnO presenta tres estructuras cristalinas: a) zinc blenda, b) wurtzita y c) sal de roca; siendo esta última la más estable, su celda unitaria la conforman cuatro átomos ordenados de la forma ABAB (Zn-O-Zn-O). Con base a (Sharma y col., 2022) la estructura cristalina hexagonal wurtzita es considerada termodinámicamente estable, pertenece al grupo espacial $P6_3mc$ ($C4_6v$) compuesta por la combinación alternada de planos de oxígeno y de zinc que se apilan a lo largo de eje c, con una distancia de separación conocida como el parámetro de red. Los parámetros de red para el ZnO, en condiciones moderadas de presión y temperatura, oscilan entre 3.2475 – 3.253 Å, para a y 5.213 – 2075 Å para c. En consecuencia, el ZnO nanoestructurado, se considera importante en la industria de la cerámica, aunado a, su baja toxicidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad lo hace en un material de interés para la biomedicina y en sistemas ambientales.

2.7.1 Síntesis de Mecanoquímica para la Obtención de Nanopartículas de ZnO

El término mecanoquímica se refiere a las reacciones químicas que involucran reactivos en cualquier estado de agregación, pero comúnmente se usa para reacciones sólido-sólido, en donde la energía necesaria para llevar a cabo la reacción involucra un proceso o tratamiento mecánico. Este método se ha empleado en los últimos años para sintetizar materiales, que a temperaturas habituales de trabajo no muestran la reactividad necesaria para su formación, o bien, según (Vazquez Olmos y col., 2018), para la preparación de compuestos que, en condiciones normales (presión y temperatura), son estables o no pueden ser obtenidos por métodos de síntesis

convencionales la activación mecanoquímica es una alternativa, ya que los sólidos cambian su reactividad, debido a la acumulación de defectos en situación de no equilibrio, lo cual repercute en la disminución de las energías de activación para que se lleven a cabo algunas reacciones químicas. La acción mecánica que se ejerce sobre los reactivos permite llevar a cabo una reacción química que hace posible obtener nuevos compuestos, con dimensiones nanométricas. (Singh y col., 2019) mencionaron que en general, la energía mecánica que se aporta a los reactivos en estado sólido puede acumularse en la deformación plástica de los cristales, produciendo defectos cristalinos. Para la obtención de nanoestructuras de óxidos metálicos involucra la molienda de las sales metálicas de partida, generalmente cloruros o acetatos, en presencia de una base (NaOH o KOH), el producto obtenido se lava con agua y posteriormente con acetona, separando por centrifugación; en algunos casos se puede llevar a cabo un tratamiento térmico por 400, 600 y 800 °C, durante 2 horas, tal como lo demostraron (Salahuddin y col., 2015). Por lo tanto, la mecanoquímica se considera una técnica sencilla y de bajo impacto ambiental.

2.7.2 Síntesis de Sol gel para la Obtención de Nanopartículas de ZnO

Existen diversos métodos de síntesis para la obtención de ZnO que dan como resultado partículas con diferentes características morfológicas y variaciones en sus propiedades físicas. El método sol gel, es una técnica de vía húmeda que permite obtener nanopartículas a partir de soluciones precursoras, donde se disuelve acetato de zinc en agua destilada y se combina con hidróxido de sodio bajo agitación constante, lo cual provoca la formación de un precipitado blanco. Luego, con base a (Murguía y col., 2022), el xerogel formado se somete a un tratamiento hidrotérmico a temperaturas de 100 °C, 120 °C y 140 °C durante 24 horas. Mediante esta síntesis, las micropartículas de ZnO se lavan, se secan a 80 °C. Por último, el material se somete a un proceso de calcinación a 500 °C durante tres horas para mejorar su cristalinidad. Esta técnica, obtenida de (Vignesh y col., 2022), influye en la morfología, tamaño de partícula y porosidad del material, así también, el proceso de calcinación favorece la cristalinidad del material. Por tal razón, siendo el método sol gel de baja temperatura representa un proceso eficiente y reproducible.

2.7.3 Síntesis de Precipitación para la Obtención de Nanopartículas de ZnO

Para desarrollar dispositivos confiables es necesario conocer la morfología, la estructura cristalina y ajustar sus parámetros, en los métodos de preparación. Según la metodología de (Uribe-López y col., 2021), el método de precipitación consiste en el depósito de un óxido hidratado o de un hidróxido sobre la superficie de un soporte, como resultado de un aumento gradual y homogéneo del pH de la solución en la que el soporte es suspendido. Los agentes basificantes típicos son, NaOH, KOH, los carbonatos o las bases de retardo como la urea. El precipitado puede ser nucleado por la superficie del soporte, donde toda la fase activa es ligada al soporte precipitándose al fondo de la solución. Este método, así como las adsorciones iónicas presentan la ventaja sobre la impregnación de la mayor parte de los contraiones del precursor metálico puede eliminarse de manera eficiente por medio de lavados repetidos de la muestra luego del depósito del precursor metálico. De acuerdo con Aziz, A. (2020) y Kulkarni (2015), la obtención de las nanopartículas se logra luego de un tratamiento térmico del precursor metálico en interacción con el soporte, en atmósfera de gases reductoras u oxidantes dependiendo de las propiedades químicas de las especies depositadas y el estado de oxidación deseado del material depositado. En la sección del desarrollo metodológico se presenta la simplicidad del método de síntesis por precipitación de nanopartículas de óxido de zinc.

Si bien, las diferentes propiedades físicas y químicas del ZnO tienen un impacto significativo en el rendimiento fotocatalítico de las nanopartículas. En la presente investigación se evaluará la biocompatibilidad de las nanopartículas de ZnO como soporte para el encapsulamiento de bacterias, para la degradación de agua emulsionada con hidrocarburos y la eficiencia del proceso de biocatálisis.

2.8 Principios Físicos de las Técnicas Empleadas en el Análisis Físicoquímico, Morfológico y Estructural de los Polvos de ZnO Sintetizados.

2.8.1 Difracción de Rayos X (DRX)

En esta técnica la energía de radiación de los rayos X se transfiere a un electrón que se encuentra en las capas más internas del átomo. El fotoelectrón removido transporta cierta energía cinética. Esta energía corresponde a la energía inicial del fotón de rayos X ($h\nu$) menos la barrera de potencial que el electrón debe vencer para poder salir de la muestra, este es conocido como energía de enlace y función de trabajo. La

característica de tener una longitud de onda del orden de los Armstrong, que es el rango común para las distancias interatómicas en los sólidos. Según, Sharma y col. (2022), el fenómeno de difracción ocurre durante la interacción entre un haz de rayos X y un sólido cristalino, además del proceso de absorción.

Conforme a (Modena y col., 2019), la difracción de rayos X, permite determinar los componentes, forma y tamaño del cristal, que se obtiene analizando el ancho total a la mitad del máximo (FWHM) de las reflexiones de Bragg, dado que cada pico de Bragg está asociado con una dirección cristalográfica única, el FWHM. De acuerdo con Arab, O. y col. (2023), los diferentes tamaños para las diferentes direcciones cristalográficas se asocian con una forma específica de los cristalitas. Para una dirección cristalográfica definida, el valor medio del tamaño del cristal se puede estimar utilizando la ecuación 1 de Scherrer.

$$D_{hkl} = K\lambda / B \cos\theta \quad (1)$$

Donde D_{hkl} es el tamaño del cristallito en la dirección perpendicular a los planos de la red, hkl son los índices de Miller de los planos que pertenecen al pico que se está analizando, K es un factor numérico conocido como el factor de forma del cristallito, λ es la longitud de onda de los rayos X, B_{hkl} es la FWHM del pico de difracción en radianes y θ es el ángulo de Bragg.

2.8.2 Microscopía Electrónica de Transmisión.

La microscopía electrónica de transmisión (MET) es, una de las técnicas de caracterización de nanopartículas más importantes de acuerdo con (Modena y col., 2019). Esta técnica emplea un haz de electrones enfocado sobre una muestra delgada (menor a 200 nm) para producir micrografías de materiales con una alta resolución espacial lateral. Xiao y col. (2024) señalaron que, además, la microscopía electrónica de transmisión proporciona una gran cantidad de información sobre la morfología, la microestructura y la dinámica de las propiedades químicas de los materiales a escala micro y nano.

Esta técnica, permite estudiar la estructura cristalina de regiones microscópicas seleccionadas de materiales cristalinos al confinar y enfocar en el espacio el haz incidente y detectar el patrón de difracción de electrones resultante. (Torres-Gomez y col., 2020) explicaron que debido a que presenta una alta resolución espacial y

selectividad, la TEM permite la identificar el tamaño, la forma y la estructura cristalina a nivel de partícula individual con resolución nanométrica. Para comprender las interacciones de los electrones incidentes, se analiza desde dos enfoques: Los electrones que ionizan a los átomos de la muestra y los electrones que se dispersan debido a la interacción con la muestra. (Paraguay-Delgado, 2020)

Los procedimientos de preparación de muestras, medición y análisis pueden resultar laboriosos, ya que la microscopía electrónica de transmisión representa un método con elevados costos de adquisición y mantenimiento.

2.8.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido permite obtener imágenes de la superficie de la muestra al detectar los electrones secundarios emitidos por la muestra. Patil, R. M. y col. (2022), explicaron que la microscopía electrónica de barrido (SEM), es un método no invasivo que utiliza un haz enfocado de electrones de alta energía se pueden obtener imágenes de materiales con anchos que varían en promedio de 1 cm a 5 μm utilizando técnicas SEM convencionales y aumentos que varía de 20 \times a alrededor de 30 000 \times , resolución espacial de 50 a 100 nm. Además, la energía del haz que utiliza es más bajas en comparación con la caracterización por TEM, lo que resulta en una profundidad de penetración limitada del haz y, por lo tanto, es sensible a la superficie de la muestra.

Sin embargo, aún existen vacíos en la comprensión de cómo optimizar sus parámetros para diferentes materiales. Bielicka, M. y col. (2025), explicaron que muchos estudios se enfocan en materiales específicos, pero faltan directrices que orienten el ajuste de variables como el voltaje de aceleración, el tamaño del punto y la ampliación. Estos parámetros afectan directamente la calidad de la imagen y deben adaptarse según las propiedades del material, como la conductividad, en especial, el voltaje de aceleración es crucial, ya que determina la penetración de los electrones y la interacción con el material, influyendo en el contraste y la claridad.

Por lo tanto, la caracterización por SEM es mucho más fácil de usar y permite mediciones más rápidas, presenta costos de adquisición y mantenimiento más bajos. Así también, permite estudiar la composición y emplear soportes conductores para obtener imágenes de alta resolución para muestras no conductoras mediante una

película metálica delgada (5 a 10 nanómetros), donde la ionización de la superficie se puede reducir mediante la interacción con el gas a baja presión en la cámara de medición. Para evitar la oxidación y la contaminación del filamento, así como para reducir las colisiones entre las moléculas de aire y los electrones, el filamento y la muestra deben alojarse en una cámara de vacío.

Por último, las imágenes de SEM solo proporcionan datos acerca de la estructura de la superficie de la muestra, mientras que TEM interactúa con todo el volumen de la muestra, por lo que brinda información sobre la estructura de la muestra.

2.8.4 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Conforme lo expuesto por Lutomia, D. y col. (2025), la técnica FT-IR se basa en la medición de la absorción de la radiación electromagnética en la región del infrarrojo medio, entre 4000 y 400 cm^{-1} . El principio básico es la excitación de los modos de vibración y rotación de los enlaces entre las moléculas al ser irradiados con un haz de luz infrarroja, por la presencia de grupos funcionales. Por lo general, una molécula puede absorber radiación IR si posee un momento dipolar variable en el tiempo, y su frecuencia de oscilación es la misma que la frecuencia de la luz IR incidente, en una molécula las vibraciones involucran varios pares acoplados de átomos o enlaces covalentes, cada uno de los cuales debe considerarse como una combinación de los modos normales.

Por lo tanto, según Patil, R. M. (2022), el espectro IR, de absorción o transmisión con la frecuencia IR incidente, sirve como una característica "huella digital molecular" que se puede utilizar para identificar muestras orgánicas e inorgánicas. Por lo tanto, esta técnica sirve como una herramienta versátil para caracterizar nanomateriales, proporcionando información detallada sobre su composición química, grupos funcionales y modificaciones superficiales. (Lutomia, D. y col. 2025).

La región infrarroja se puede subdividirse en tres regiones denominadas infrarrojo cercano, medio y lejano, cuyos límites aproximados corresponden a $0.78 - 2.5$, $2.5 - 50$, $50 - 1000\text{ }\mu\text{m}$ del intervalo de longitud de onda, respectivamente. La región donde se producen los modos de vibración y rotación de los enlaces entre los átomos al ser irradiados con un haz está entre 2.5 y $25\text{ }\mu\text{m}$ ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) lo cual se considera como la región del IR cercano.

De acuerdo con (Kumar y col., 2019), cuando la energía de excitación vibracional de las moléculas está en el rango de 10^{13} - 10^{14} Hz corresponde a la radiación IR y las transiciones vibracionales de los grupos funcionales, por lo tanto, los espectros de absorción, emisión y reflexión en el infrarrojo, de especies moleculares, se pueden explicar asumiendo que todos son el resultado de los distintos cambios energéticos producidos en las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales y rotacionales.

Sin embargo, la espectroscopia IR presenta algunas limitaciones, como la incapacidad para determinar el peso molecular de las sustancias, la posición relativa de diferentes grupos funcionales en una molécula y la pureza de una sustancia desconocida. A pesar de estas desventajas, la miniaturización de dispositivos de detección IR y el uso de fuentes de luz avanzadas han mejorado la calidad de los espectros, además reduce el tiempo de adquisición de datos y mejora la relación señal/ruido lo que la convierte en una herramienta valiosa en el análisis de nanomateriales.

2.9 Análisis de las propiedades texturales de las partículas por adsorción (BET)

En (Kulkarni, Synthesis of Nanomaterials—I (Physical Methods), 2015), expusieron que la técnica de adsorción de nitrógeno es un parámetro fundamental para la caracterización de nanomateriales y sólidos porosos. Este método se basa en la adsorción física de gases a bajas temperaturas para calcular la cantidad de gas retenido en la superficie del material, lo que permite determinar el área superficial, distribución del tamaño de poro y volumen de poro accesible de un material determinado.

Las propiedades texturales de las partículas se determinan mediante la evaluación de las isotermas de adsorción. De acuerdo con Gökırmak Söğüt & Gülcan, (2023), una isoterma, es un gráfico que muestra la variación de la cantidad de material adsorbido con la presión o la concentración bajo condiciones de equilibrio a temperatura constante. El rendimiento del proceso de adsorción se ve afectado en gran medida por los parámetros como la presión, temperatura, propiedades adsorbentes y el área superficial. Un proceso de adsorción se comprende mejor a partir de las isotermas, pero no se puede obtener información sobre la velocidad de adsorción a partir de ellas utilizando diferentes técnicas de análisis de datos, como el método Brunauer Emmett-Teller (BET). (Modena y col., 2019) reportaron como las isotermas de sorción se

subdividen en ocho tipos diferentes según la definición de la IUPAC. Así mismo, mediante datos experimentales se clasifican en microporoso (tamaño de poro inferior a 2 nm), mesoporoso (entre 2 y 50 nm) o macroporoso (superior a 50 nm). El área superficial específica del volumen (VSSA) puede emplearse para clasificar a los materiales no porosos como nanomateriales. La VSSA se define mediante la ecuación (2):

$$VSSA = SSA \rho \times SV \quad (2)$$

Donde S es la superficie externa de la muestra, V es el volumen sólido, SSA es el área superficial específica (superficie por masa) y ρ es la densidad del material. Según la recomendación de la Comisión Europea (CE), se considera un nanomaterial si presenta una VSSA mayor a $60 \text{ m}^2 \text{ cm}^{-3}$. Así también, Gökırmak Söğüt & Gülcan, (2023) expusieron que la medición de la superficie BET es esencial en diversas aplicaciones científicas e industriales, tales como catálisis, adsorción de contaminantes y desarrollo de sensores avanzados. En los nanomateriales, una alta área superficial específica conduce a una mayor reactividad química, lo que mejora los procesos catalíticos, además, en la fabricación de dispositivos electrónicos, así como en el almacenamiento de energía (baterías y supercapacitores), que puede lograr una mayor capacidad de carga y eficiencia.

Sin embargo, la medición precisa de la superficie BET requiere condiciones controladas de temperatura y presión, ya que factores como la presencia de impurezas o la heterogeneidad de la superficie pueden afectar los resultados. Por lo tanto, la determinación precisa del área superficial específica es clave para el desarrollo de materiales avanzados y su aplicación en múltiples campos, asegurando un mejor rendimiento y eficiencia en procesos industriales y de investigación.

2.10 La espectrofotometría de absorción por UV-Vis

Patil y col. (2022), explican que, esta técnica analítica mide la luz que pasa a través de una muestra y se basa en el principio de que la radiación UV es absorbida por las moléculas, lo que provoca la excitación de los electrones desde el estado fundamental a un estado de mayor energía.

Según Thermo Fisher Scientific, la espectrofotometría UV-Vis, es utilizada para caracterizar materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos mediante la medición de la absorción de luz en las regiones ultravioleta (190-400 nm) y visible (400-800 nm) del espectro electromagnético. De acuerdo con Dey y col. (2025), la longitud de onda de un material puede estimarse midiendo la cantidad de luz que absorbe o dispersa la muestra, la cual es proporcional a la concentración de las moléculas, de acuerdo con la ley de Beer- Lambert.

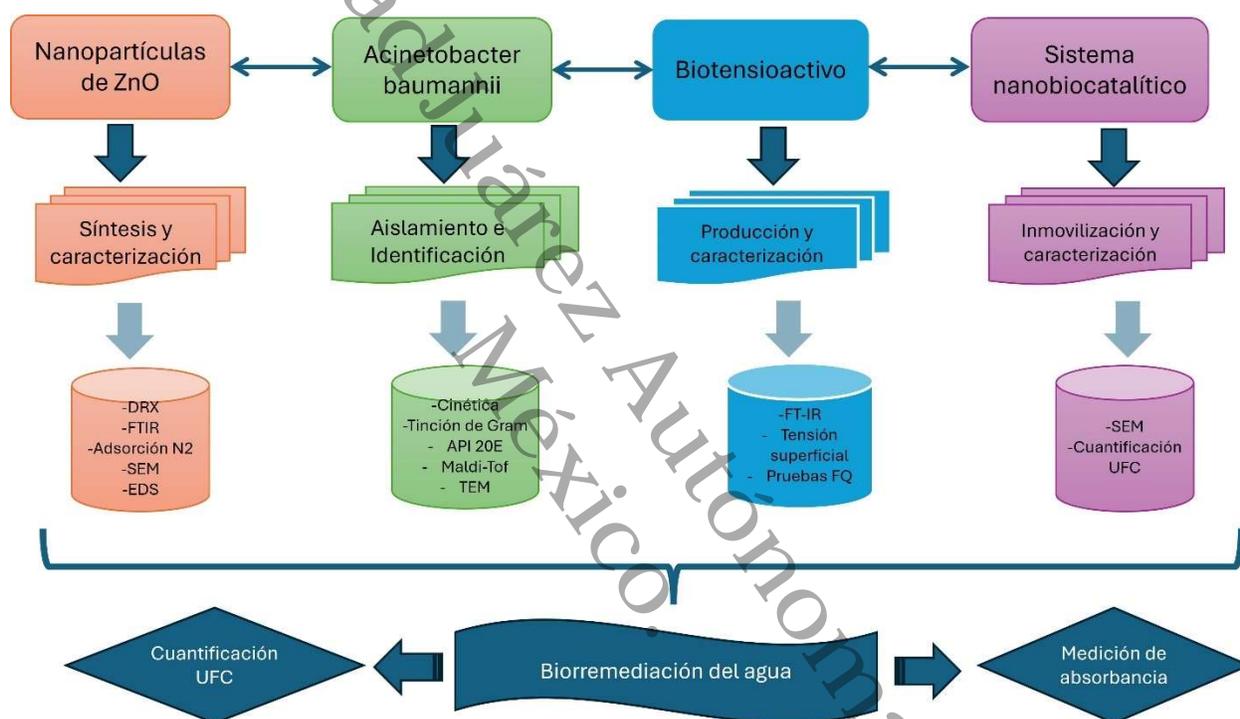
En el ámbito de los nanomateriales, (Kumar y col., 2019) evidenciaron que la espectrofotometría UV-Vis es fundamental para determinar la relación entre el espectro de absorción y la distribución del tamaño de partículas, como los nanocristales cuánticos y nanopartículas metálicas en los sistemas de dispersión coloidal. Esta técnica se distingue por su sencillez de manejo y rápido análisis, lo que la hace una herramienta útil en varias disciplinas como la medicina, la investigación y el análisis forense. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el rendimiento del dispositivo puede degradarse por el ruido de la fuente de luz y los componentes electrónicos del espectrofotómetro.

III. Metodología

La metodología desarrollada en esta tesis se presenta en el diagrama esquemático de la Figura 2, que establece mediante bloques la experimentación con el sustrato, la bacteria, las nanopartículas de ZnO y el sistema nanobiocatalítico, con el fin de alcanzar los objetivos propuestos.

Figura 2

Diagrama de experimentos realizados para alcanzar los objetivos propuestos



3.1 Obtención de las Nanopartículas de Óxido de Zinc

En este trabajo de tesis se propuso realizar la inmovilización de bacterias de *Acinetobacter b.* en un soporte polimérico funcionalizado con NPZnO. Inicialmente, se consideró el tamaño de la partícula de ZnO como variable de estudio, dado que este impactaría en la integridad de la bacteria al ser inmovilizada en un polímero. Por tal razón, se propuso un diseño simple de experimentos donde las variables de estudio fueron; el método de síntesis (Sol-gel, Mecanoquímica, Hidrotermal y Precipitación) bajo las condiciones de los tratamientos de secado y térmico, propuestos en la Tabla 4. Las

NPs de ZnO se caracterizaron mediante DRX, FT-IR, SEM, EDS, ADSORCIÓN DE N₂ y UV-vis, para identificar sus propiedades estructurales, morfológicas y texturales, ya que estas favorecerían el proceso de inmovilización y el desempeño nanobiocatalítico.

Tabla 4

Diseño factorial simple de la evaluación del ZnO nanoestructurado

Método de síntesis	Tratamiento			Caracterización
	Secado	Térmico		
	80 °C	400 °C	500 °C	
Sol-gel (SG)	X	X	X	DRX, SEM Y TEM, ADSORCIÓN N ₂ Y UV-VIS
Hidrotermal (HT)	X	X	X	
Precipitación (PP)	X	X	X	
Mecanoquímica (MS)	X	X	X	

3.2 Evaluación Estructural, Textural y Morfológica del Óxido de Zinc Nanoestructurado

Los polvos de ZnO obtenidos a partir de las síntesis de Sol gel, precipitación y mecanoquímica; fueron identificadas como SG-400, PP-400, MQ-20, MQ-40, respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5

Nomenclatura de las muestras de polvos de ZnO caracterizadas

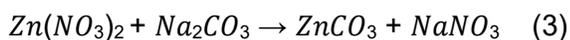
Etiqueta	Características de las muestras
SG-400	Muestra de polvo sintetizada por sol gel con relación molar de los precursores de acetato de zinc dihidratado, monoetanolamina (96 %, Sigma-Aldrich) y 2-propanol.
PP-400	Muestra de polvo sintetizada por precipitado, con relación molar de los precursores de nitrato de zinc hexahidratado a (98 %, Sigma-Aldrich®) y carbonato de sodio anhidro (99 %, Baker®).
MQ-60	Muestra de polvo sintetizada por mecanoquímica con 60, 40 y 20 min. respectivamente de molienda de precursores a base de cloruro de zinc, carbonato de sodio y cloruro de sodio.

Las muestras fueron caracterizadas mediante difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido (SEM) y área superficial (BET). El análisis de DRX se realizó con el difractómetro de polvos Malvern Panalytical Mod. Empyrean, en un rango de medición de 25-80°, en escala 2θ grados con una radiación CuKα a 40 KV 30mA. Así como el tamaño del cristal se calculó mediante la ecuación de Scherrer. Además, la forma y tamaño de los polvos se analizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) acoplada con un sistema de detección de energía dispersiva de rayos X (EDS). Para el estudio morfológico, las muestras fueron recubiertas con oro-paladio y analizadas mediante detector de electrones secundarios a 12-18 kV de voltaje de aceleración en condiciones de alto vacío a diferentes aumentos (50000-150000 X). Las mediciones del tamaño de las partículas de ZnO se obtuvieron mediante el software Imagen J 1.52a. El área superficial se determinó por la adsorción de N₂, a partir de las isotermas de adsorción y desorción, las cuales se analizaron en un equipo Quanta chrome Autosorb-iQ-AG. Previo al análisis, las muestras fueron desgasificadas a 300 °C durante 3 h. con Gökırmak Söğüt & Gülcan (2023).

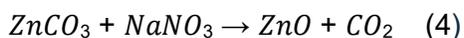
3.2.1 Síntesis de Nanopartículas de ZnO por el Método de Precipitación

La síntesis de polvos de ZnO, se realizó por el método de precipitación directa. Se preparó una disolución precursora de ZnNO₃ (Sigma Aldrich®) a 0.25 M, a la cual se le añadió una disolución precipitante de Na₂CO₃ (Sigma Aldrich®) a 0.25 M, se utilizó agua desionizada como disolvente. El producto de la reacción fue una suspensión viscosa de color blanca, que se mantuvo bajo agitación constante a temperatura de 28 ± 1 °C durante 24 h. La suspensión fue filtrada a gravedad y lavada 3 veces con 25 mL de agua desionizada, el producto precipitado se dejó secar en la estufa a 70 °C durante 3 h. Luego, se dejó reposar durante 24 h. y el polvo blanco resultante fue calcinado en el horno a 400 °C con una rampa de 2 °C/min durante 4 horas; el mecanismo de reacción es expresado mediante las ecuaciones 3 y 4.

Mecanismo de precipitación.



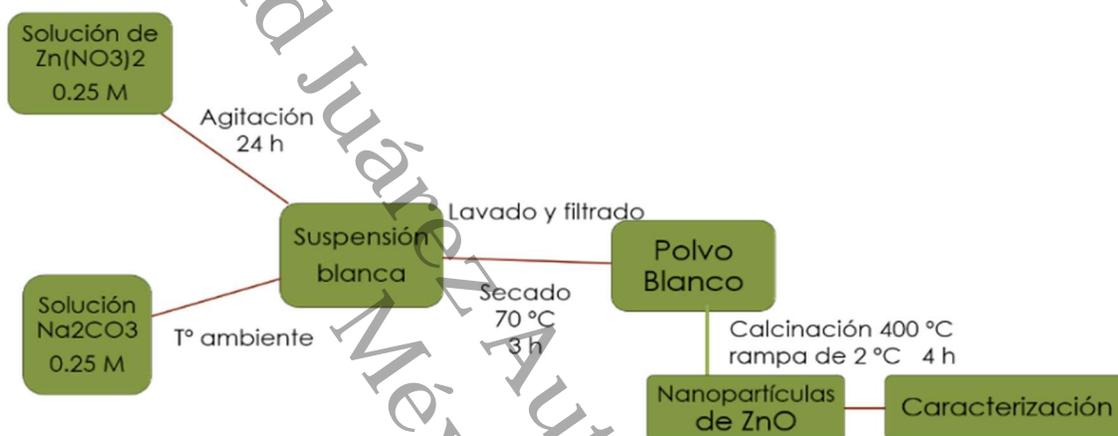
Formación del ZnO



El tratamiento térmico a 400 °C, favoreció la formación, además de la cristalización del óxido de zinc nanoestructurado (NP ZnO).

Figura 3

Esquema de la síntesis de NPZnO, por el medio de precipitación



3.3 Análisis y Caracterización de las Muestras en Estudio

La muestra de agua congénita se recolectó del pozo-362, propiedad de Petróleos Mexicanos (PEMEX), y analizada de acuerdo con el procedimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-143-SEMARNAT-2003. Se analizaron otros parámetros fisicoquímicos como: alcalinidad, turbiedad, conductividad, cloruros totales y pH, según lo establecido en las normas mexicanas: NMX-AA-036-SCFI-2001, NMX-AA-038-SCFI-2001, NMX-AA-093-SCFI-1986, NMX-AA-073-SCFI-2001 y NMX-AA-008-SCFI-2000.

La caracterización del petróleo crudo se realizó a partir de una muestra obtenida del pozo-362, ubicado en el estado de Tabasco propiedad de PEMEX Exploración y Producción. Las muestras de petróleo se analizaron bajo los métodos normalizados de American Society for Testing and Materials (ASTM International, 2007), Universal Oil Products (UOP) y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) (API).

Las propiedades fisicoquímicas evaluadas fueron: densidad (ASTM D70), grados API (ASTM D287, D70), viscosidad Saybolt (ASTM D88) y punto de inflamación (ASTM D92). Los hidrocarburos de fracción media se determinaron por cromatografía de gases con detector de ionización de flama de acuerdo con la NMX-AA-145-SCFI-2008.

3.4 Aislamiento y Selección de la Cepa *Acinetobacter baumannii*

La cepa bacteriana se aisló del agua congénita, de acuerdo con la metodología de Madigan y col. (2019). Se preparó 250 mL del medio de cultivo agar Bushnell-hass (BH) de la marca HIMEDIA® y se suplementó con 1 % de petróleo estéril como única fuente de carbono, según (Khan y col., 2017). Las placas con BH se inocularon con 0.1 mL de muestra y sembradas por la técnica de extensión, se incubaron a 35 ± 2 °C por 72 h. La selección de cepas se realizó a partir de las colonias viables expresadas en el medio de cultivo e identificadas como AC362-1, AC362-2, AC362-3. Las cepas se purificaron en placas con medio de agar nutritivo (DIBICO®) mediante estrías cruzadas e incubaron a 35 ± 2 °C durante 24 h.

La mineralización del petróleo por la bacteria *Acinetobacter b.* se realizó mediante una prueba cualitativa en medio de cultivo inorgánico triple 17 para esto, se emplearon biorreactores a nivel matraz con 200 mL del medio estéril. Los tratamientos se realizaron por duplicado adicionándoles a cada unidad 5 mL de inóculo de las cepas puras y como fuente de carbono se utilizó el 1 % de petróleo crudo y se mantuvieron homogenizados a través de un sistema de aireación durante 10 días a una tasa de flujo volumétrico de $1.21 \times 10^{-4} \text{ m}^3\text{s}^{-1}$.

3.4.1 Análisis Fenotípico a Nivel Colonia

En la prueba de la mineralización, la cepa AC362-1 evidenció mayor presencia a la degradación del crudo, lo cual esta cepa fue seleccionada para su identificación fenotípica y bioquímica siguiendo los procedimientos microbiológicos. El análisis fenotípico de las cepas se realizó, basado en Madigan y col. (2019), a nivel colonia en placa con medio BH, bajo el microscopio óptico y se examinaron su elevación, tamaño, borde, consistencia y color, características atribuidas al género. Así mismo, la pared celular se evaluó mediante la prueba de tinción de Gram. El procedimiento consistió en frotar una colonia sobre un portaobjeto fijado al mechero, añadiendo dos gotas de reactivo cristal violeta por 1 min, el cual se retiró con enjuagues de agua destilada, después se agregaron dos gotas de solución yodurada de lugol por 1 min. El frotis

nuevamente se lavó y se cubrió con alcohol etílico al 70 % durante 20 s, luego se añadieron dos gotas safranina al 0.5 % por 2 min, se enjuagó y secó a temperatura ambiente finalmente, se observó al microscopio a 10X y 100X.

3.4.2 Estudio Taxonómico Mediante el Sistema API 20E

Esta prueba permite la rápida identificación de bacilos Gram negativos, la cual consiste en una galería de 21 test bioquímicos estandarizados y miniaturizados. El procedimiento consistió en suspender una colonia bacteriana en solución salina al 0.9 %, con la cual, se inocularon los microtubos con los cultivos deshidratados y se incubaron a 37 °C por un periodo de 24 a 48 h. Los resultados obtenidos a partir de las reacciones se compararon con la tabla de lectura de la galería de prueba, obteniendo un perfil numérico a través del software apiweb™ REF 40011 (bioMerieux, France) y se interpretó según el procedimiento del fabricante.

3.4.3 Análisis Estructural de la Célula Bacteriana Mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

El análisis estructural de la célula bacteriana se realizó por la técnica de Microscopía electrónica de transmisión. La biomasa celular fue lavada con 20 mL de solución amortiguadora de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ a 0.2 M y pH de 7.2. Los lavados fueron mediante centrifugación a 3000 rpm por 10 min este procedimiento se repitió cuatro veces. Las células se fijaron con 1 mL de glutaraldehído ($\text{CHO}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$) al 2 %, dentro de un tubo estéril y se sonicó por 5 min. Del concentrado celular, se depositó una gota sobre una rejilla de Cu 200 mesh y se fijó con glutaraldehído durante 5 min. Posteriormente, las células se fijaron sobre un porta muestra y se deshidrataron mediante lavados con una serie de soluciones de etanol de concentración gradual (30 al 100 %) durante 10 min por cada solución. La muestra se dejó reposar a 28 ± 1 °C y se examinó por HRTEM JEOL JEM 2100 a 200 Kv de alta resolución con filamento de LaB_6 . El tamaño y la morfología celular se analizó usando el software GATAN digital Micrograph, calibrado con una muestra patrón de oro en el plano 1.09 mm con un margen de error de ± 0.1 %. (Paraguay-Delgado, 2020)

3.5 Cinética de Crecimiento de la Bacteria *Acinetobacter baumannii*

En condiciones axénicas, en un biorreactor se prepararon 400 mL de medio de cultivo con caldo nutritivo de composición (gL^{-1}): extracto de carne, 1.0; extracto de levadura, 2.0; peptona caseína, 5.0; NaCl, 5.0. El medio se inoculó con 10 mL de

biomasa de *Acinetobacter b.* y se midió la absorbancia hasta alcanzar 0.3 de DO_{600} . El biorreactor fue conectado a un sistema de aireación con flujo volumétrico de $1.21 \times 10^{-4} \text{ m}^3\text{s}^{-1}$. El muestreo se realizó tomando una alícuota de 10 mL del cultivo de biomasa para la cuantificación de la densidad óptica ($DO_{600\text{nm}}$) en un espectrofotómetro GENESYS 20, Spectronic. El conteo de las UFCs se realizó por el método de diluciones y recuento en placa derivado de Madigan y col. (2019), durante un periodo de 96 h de experimentación. Los datos se registraron para determinar la curva de crecimiento de la bacteria.

3.6 Evaluación de la Producción de Biotensioactivo

La producción de biotensioactivo se llevó a cabo en etapas: fermentación, separación de fases por centrifugación, precipitación ácida y extracción. La fermentación se realizó en un biorreactor con 1.0 L de medio Kim compuesto de: extracto de levadura, 0.2; extracto de carne, 5.0; glucosa o dextrosa, 2.0; KH_2PO_4 monobásico, 0.2; K_2HPO_4 dibásico, 0.3; MgSO_4 , 0.1; NaSO_4 , 0.1; CaCl_2 : 0.1; FeSO_4 , 0.1 y una proporción carbono/nitrógeno de 2:1, específico para la producción de biotensioactivos (Panatula y col., 2024). El medio Kim se esterilizó en autoclave a 121°C , 15 minutos a 15 psi y se le adicionó el 10 % de biomasa bacteriana cultivada en caldo nutritivo con absorbancia de 0.3 ($OD_{600\text{nm}}$). El biorreactor fue conectado a un sistema de aireación con flujo volumétrico de $1.21 \times 10^{-4} \text{ m}^3\text{s}^{-1}$, por un periodo de 120 h. Durante el bioensayo, se obtuvieron muestras de 50 mL a diferentes tiempos (0, 24, 48, 72 y 120 h), para la medición de la absorbancia y cuantificación de unidades formadoras de colonia (UFC), los muestreos se realizaron por triplicado. La curva de crecimiento de la población bacteriana se realizó a partir de los datos experimentales. Por otro lado, las muestras de cultivos fueron centrifugadas a 5500 rpm por 30 min para separar la biomasa celular de la fase líquida o CLC (caldo libre de células), por último, se las muestras se preservaron para otras pruebas posteriores.

3.7 Actividad Biotensioactiva Producido por la Ceba *Acinetobacter baumannii*

3.7.1 Ensayo de la prueba hemolítica

Las muestras de CLC se sembraron en placas de Petri con agar base sangre suplementado con 5 % (v/v) de sangre de cordero. Sobre los medios de cultivo agar sangre se extrajeron porciones circulares de agar, dejando una forma de pozo de 0.8 a 1.0 cm de diámetro; cada pozo fue inoculado con 0.1 mL con muestras de CLC de

diferentes periodos de tiempo. El control de la prueba se realizó por triplicado empleando medio de cultivo estéril. Las placas con cultivo fueron incubadas a temperatura ambiente (28 ± 1 °C). La actividad hemolítica se determinó por la formación de una zona clara (halo) alrededor del pozo, y se midió utilizando el software FIJI de ImageJ win-32. (Ali y col., 2020).

3.7.2 Prueba de dispersión de aceite

En placas de Petri estériles se depositaron 30 mL de agua destilada y se inoculó 100 μ L de petróleo sobre la superficie del agua formando una capa fina, después se añadió 10 μ L de CLC. El control de la prueba se realizó con caldo cultivo estéril. Esta prueba se realizó por triplicado, basándose en los procedimientos según (Ambaye y col., 2021), la presencia de sustancias tensioactivas se observó mediante la formación de una zona de aclaramiento en la superficie del petróleo. La zona de aclaramiento se midió con un vernier, en todas las muestras analizadas.

3.7.3 Ensayo de la gota colapsada

Sobre una superficie de vidrio (portaobjeto) se depositaron 0.2 mL de petróleo formando una película fina, luego se añadió 40 μ L de CLC de los diferentes periodos de tiempos, este procedimiento se realizó por triplicado. Después de 1 min se observó si la gota colapsó de acuerdo con (Gaur y col., 2022). El tamaño del diámetro de la gota se midió con el software FIJI de ImageJ win-32.

3.7.4 Índice de emulsión (IE_{24})

En un tubo de ensayo se mezclaron 2 mL de biotensioactivo y 2 mL de petróleo a $28 \text{ °C} \pm 1$, 1 atm., la mezcla se agitó en un vórtex durante 2 min. La emulsión se dejó reposar por 24 h, siguiendo a Gaur, y col. (2022). El porcentaje del IE_{24} se calculó mediante la ecuación 5.

$$IE_{24} = \frac{\text{Altura de la emulsión}}{\text{Altura total de la emulsión}} * 100 \quad (5)$$

Para la muestra control se empleó caldo libre de células sin cultivar. Con base a (Ahmad y col., 2018). La prueba se consideró positiva si el valor del $IE_{24} \geq 50\%$ y, negativa si fuera $\leq 50\%$.

3.8 Extracción del Biotensioactivo

El biotensioactivo se obtuvo por el método de precipitación ácida, a partir del caldo libre de células (CLC) extraído de las muestras a diferentes tiempos. Este caldo se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se acidificó con HCl a 2 N y se ajustó a un pH de 2.0. El CLC se mantuvo en agitación (2000 rpm) a 4 °C por un periodo de 12 h; transcurrido el tiempo se observaron precipitados en el fondo del matraz, luego el caldo acidificado fue colocado en tubos de ensayo y se centrifugó a 6000 rpm por 30 min. El sobrenadante fue retirado del tubo de centrifuga conservando el precipitado, este se almacenó a 4 °C para su posterior caracterización. El tiempo de obtención de la máxima producción de biotensioactivo se estimó mediante el cálculo del peso aproximado, y se graficó utilizando el software Origin 2019.

3.9 Caracterización Fisicoquímica del Biotensioactivo

3.9.1 Identificación de Lípidos Polares Mediante una Cromatografía en Capa Fina

Siguiendo a (Farias y col., 2021), el análisis se realizó sobre una placa de sílica gel 60 F254 de 0.25 mm de grosor, en la cual se depositó un 1 µL de la muestra y se colocó dentro de un sistema de solventes de cloroformo:acetona:metano:ácido acético:agua destilada a 6:8:2:2:1 v/v; la solución disolvente ascendió por capilaridad. Para la revelación de los lípidos polares, se emplearon soluciones de difenilamina 2 g en 200 mL (glicolípidos); ninhidrina al 2 % (lipopéptidos) y azul de bromotimol 1 g en 100 mL de NaOH (fosfolípidos). Las placas fueron aspergidas por separado con las sustancias y calentadas a 100 °C de 5 a 10 min, para revelar las bandas asociadas a los compuestos presentes en la muestra. Con base en (Kashtiaray y col., 2021), las bandas observadas fueron analizadas para determinar el área y los factores de retardo (rf). Esta prueba se confirmó con el análisis de los grupos funcionales por FTIR.

3.9.2 Identificación de Compuestos Orgánicos Mediante Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

A través de la técnica de espectroscopía de infrarrojo se identificaron los compuestos orgánicos que forman parte de la estructura del biotensioactivo. Para el análisis se empleó una muestra de 0.1 mL y se colocó en el portamuestra del espectrofotómetro de marca Thermo Nicolet® iS 50, en modo transmitancia a un intervalo de 4500 a 400 cm⁻¹ de número de ondas.

3.9.3 Determinación de la Tensión Superficial del Biotensioactivo

Guiado por (Ambaye y col., 2021), la muestra de biotensioactivo se secó a 50 °C (vacío por 12 h). La muestra sólida fue dispersada en agua destilada en una proporción de 100 mg/10mL. La dispersión original fue sucesivamente diluida. La tensión superficial de los sobrenadantes se determinó utilizando un goniómetro Ramé-Hart, Instrument Co modelo 250, a temperatura ambiente, las mediciones reportadas fueron el promedio de 10 mediciones por duplicado.

3.10 Bioensayo para Evaluar la Capacidad Extremófila de la *Acinetobacter*.

El bioensayo se desarrolló con base en un diseño unifactorial completamente aleatorizado para diferentes tratamientos: temperatura (20 °C, 45 °C, 80 °C), pH (5.0, 7.0, 9.0) y salinidad (10%, 15%, 25%). Esta prueba se realizó en biorreactores a nivel *in vitro* con 250 mL de caldo nutritivo, con 10 mL de inóculo de la cepa AC362-1. Los biorreactores fueron conectaron a un sistema de aireación con una tasa de flujo volumétrico de $1.21 \times 10^{-4} \text{ m}^3/\text{s}$. Procediendo según (Joseph, 2023), la biomasa bacteriana se cuantificó con la medición de la absorbancia cada 24 h durante un periodo de 120 h. El muestreo se realizó por triplicado y los datos generados fueron graficados mediante el programa de Statgraphics Centurion™.

3.11 Bioensayo para Evaluar la Capacidad de Bacteria para Degradar Petróleo

El bioensayo se realizó con base a un diseño unifactorial completamente aleatorizado. Los tratamientos se establecieron con una masa de trabajo de 3 kg del suelo contaminado con petróleo de concentración inicial de 9000 ppm de HTP. Cada unidad experimental se realizó por triplicado y fueron inoculadas con 500 mL de un cultivo bacteriano de *Acinetobacter b.* y 1.5 mL agua destilada estéril para mantener la humedad del 40 %. El bioensayo se monitoreó cada 24 h para la cuantificación de los hidrocarburos de fracción pesada (HFP) mediante extracción y gravimetría establecido en la NMX-AA-134-SCFI-2006. Así mismo, el conteo de las UFC.g⁻¹ se realizó mediante el método de cuenta en placa

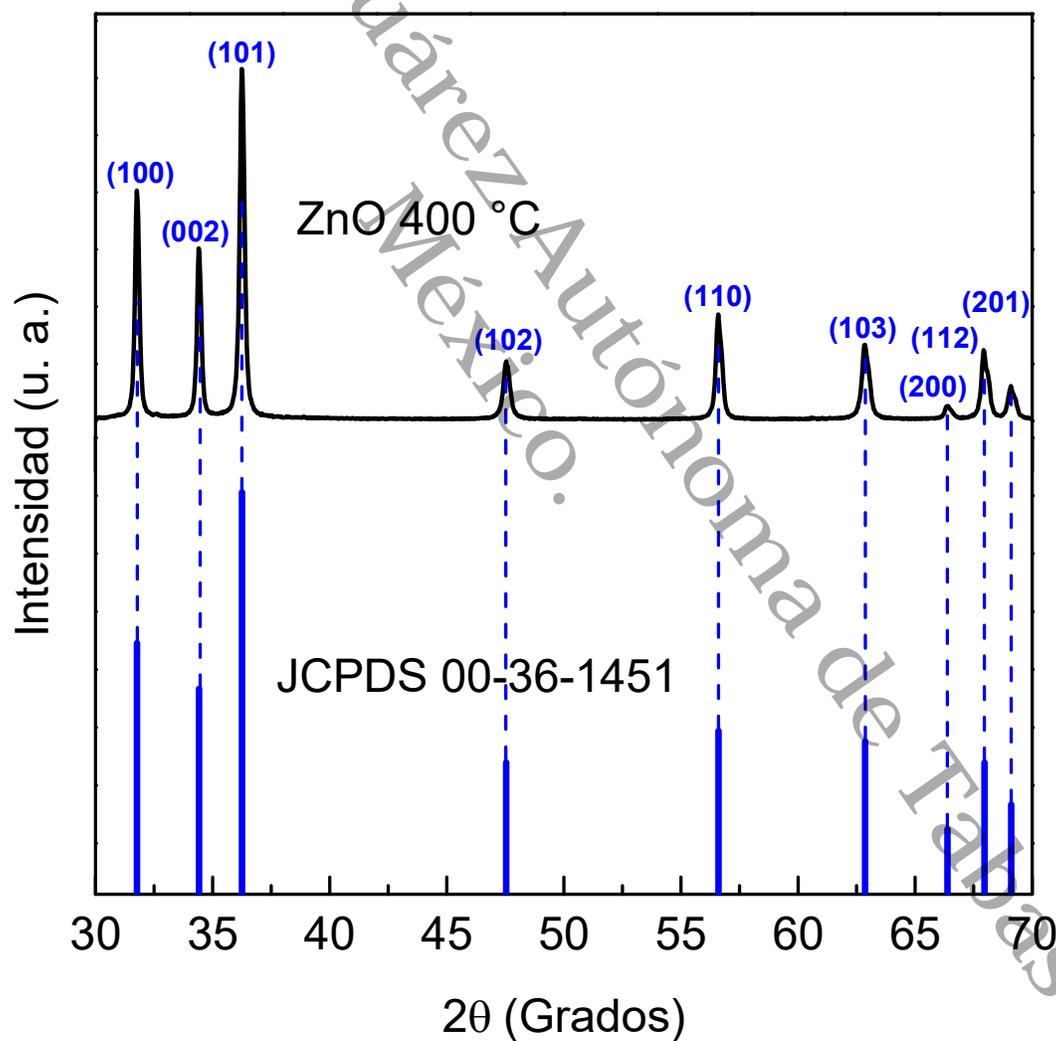
IV. Resultados

4.1 Análisis Estructural por Difracción de Rayos X (DRX)

La Figura 4 muestra el difractograma de los polvos de ZnO obtenidos por precipitación a 400 °C, el cual, coincide con el aspecto característico de ZnO en la estructura hexagonal según la carta JCPDS estándar (No.361451). De esta manera se confirmó la obtención del ZnO cristalino con difracciones de los planos típicos de ZnO en la estructura cristalina tipo Wurtzita (Figura 4).

Figura 4

Difractograma de Rayos X de nanopartículas de ZnO



El tamaño del cristal (D), fue estimado a partir de la fórmula de Debye-Scherrer (ecuación 6) considerando los picos más intensos de los planos, según se enlistan en la Tabla 6.

$$D = \frac{0.94\lambda}{\beta} \cos\theta \quad (6)$$

Donde, 0.94 es la constante de Scherrer, λ la longitud de onda (1.5406 Å), β el FWHM (ancho de línea a media altura del pico) y θ el ángulo de difracción de Bragg, calculando un promedio de 10 nm del tamaño de cristalito (ver Tabla 6).

Tabla 6

Valores del tamaño de los cristales de ZnO

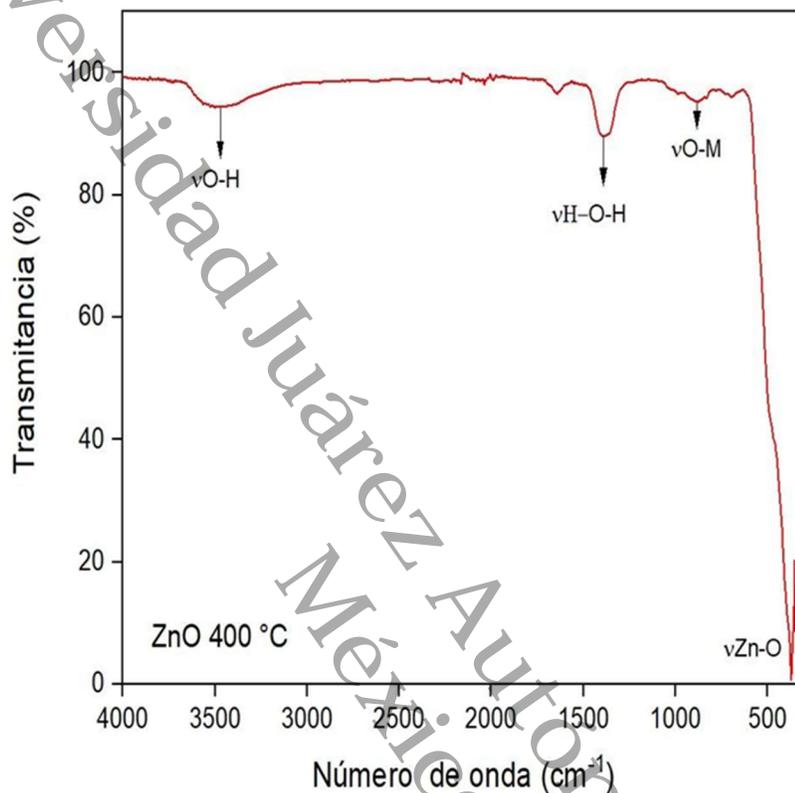
Posición de los picos 2 θ	FWHM	Tamaño del cristal D(nm)
34.41	0.78874	10.5451859
31.60	0.78866	10.4688963
36.39	0.78868	10.6032154
47.59	0.78873	10.0082819
56.66	0.7889	10.4406588

4.2 Análisis Estructural de Polvos de ZnO por Espectroscopía de Infrarrojo

En la Figura 5, se presenta el espectro de transmitancia en el rango de 400-4000 cm^{-1} , se aprecia la banda pronunciada en 372 cm^{-1} asociada al modo de estiramiento del enlace Zn-O. Las bandas que aparecen en 1385 cm^{-1} por debajo de 1000 cm^{-1} , son atribuidas a los enlaces metal-oxígeno. En general, se aprecia un espectro libre de otras bandas que reflejen los movimientos moleculares de algún reactivo remanente o contaminación, pero, se evidenció la pequeña banda de absorción en 3471 cm^{-1} que correspondió al modo O-H además, se sustentó con la banda absorbida a 1600 cm^{-1} asociada a la vibración del agua ligada H-O-H.

Figura 5

Espectro FT-IR del ZnO, sintetizado por el método de precipitación

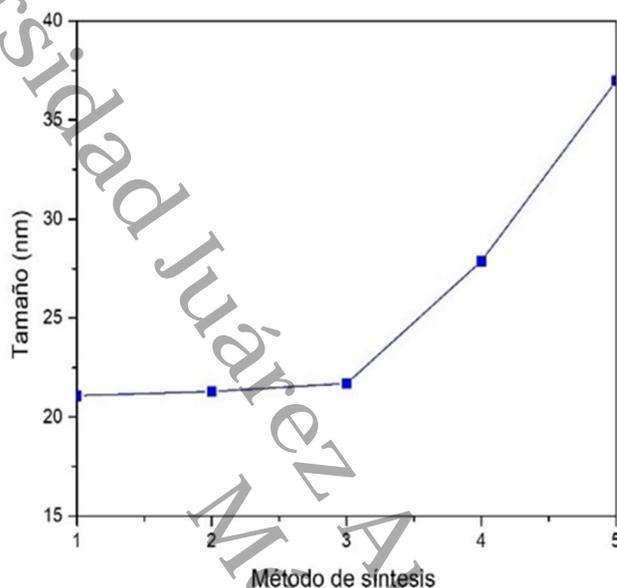


4.3 Tamaños de Cristales Según los Métodos de Síntesis

A partir de valores calculados mediante la ecuación de Sherrer, adoptado por con Arab y col. (2023). En la Figura 6, se presenta la comparación del tamaño de los cristales de las muestras (1, 2 y 3) obtenidas por mecanoquímica, (4) sol gel y (5) precipitación, siendo que los tamaños se encuentran en el intervalo de 20 a 40 nm. Para esta investigación, con base en (Hernández-Reyes y col., 2020).

Figura 6

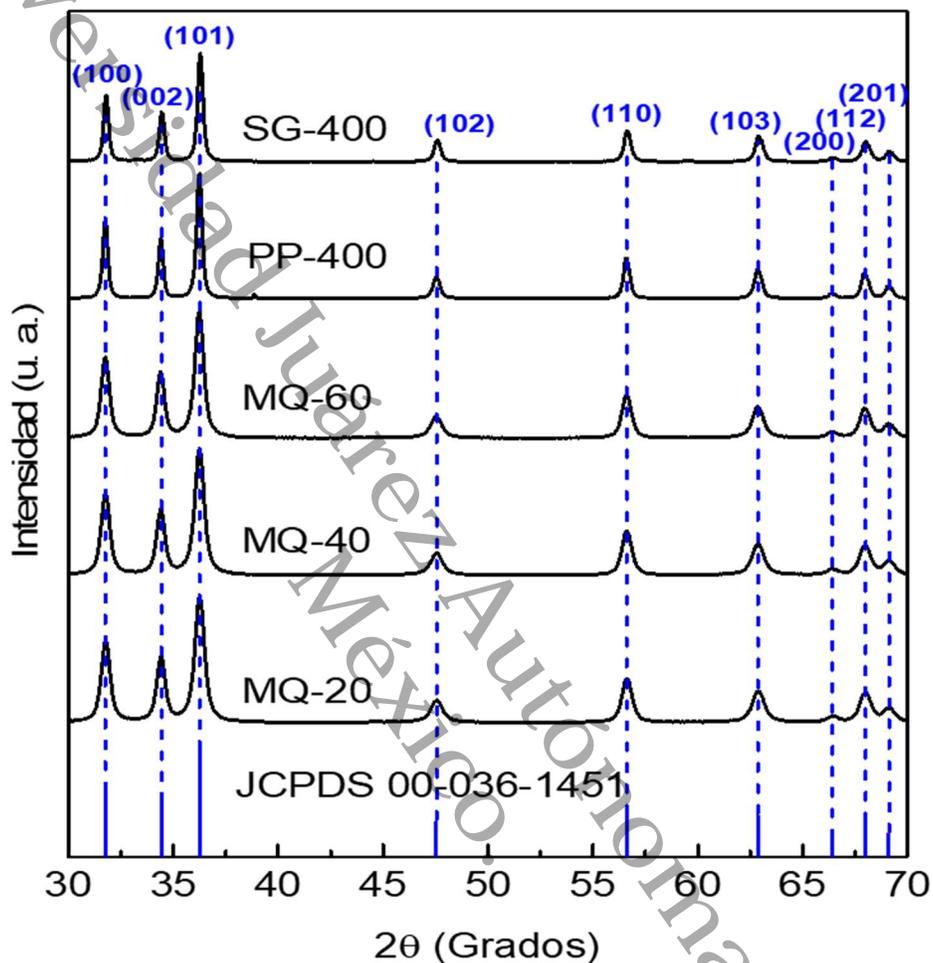
Tamaño del cristal de los polvos de ZnO obtenidos de diferentes técnicas: 1,2,3 (mecanoquímica de 20, 40, 60 min de molienda), 4 (sol gel) y 5 (precipitación)



En la Figura 7, se presentan difractogramas de cinco muestras sintetizadas con tres métodos diferentes (mecanoquímica, sol gel y precipitación). En los patrones estándar del ZnO, se observa que los picos de difracción más intensos están localizados en la posición $2\theta = 31.8^\circ$, 34.38° , 36.2° , y que corresponden a los planos (100), (002), (101). Otros picos menos intensos, se ubican en $2\theta = 47.52^\circ$, 56.6° , 62.78° , 66.28° , 67.88° y 68.98° se atribuyen a los planos (102), (110), (103), (200), (112) y (201), respectivamente.

Figura 7

Comparación de difractogramas de polvos de ZnO obtenidos por diferentes métodos de síntesis: SG-400, PP-400 y MQ20, 40, 60 min.



Todos los difractogramas fueron indexados en el software Difracc. EVA.VA 2.1.VA.2.1 y comparados con las tarjetas cristalográficas JPCDS 04-020-0364. Las muestras SG-400 y PP-400, son de una fase cristalina hexagonal tipo zincita y, las muestras de MQ-60, MQ-40, y MQ-20 presentaron una estructura cristalina tipo wurtzita, los valores coincidieron con la carta cristalográfica JCPDS 00036-1451. De acuerdo con (Uribe-López y col., 2021), este resultado es importante ya que en la literatura se reporta que NPs ZnO sintetizadas por precipitación y calcinadas a 500 °C con estructura cristalina tipo wurtzita y tamaños de cristal de 30 nm, degradaron el 100 % la molécula del fenol y el 90 % de la mineralización del contaminante.

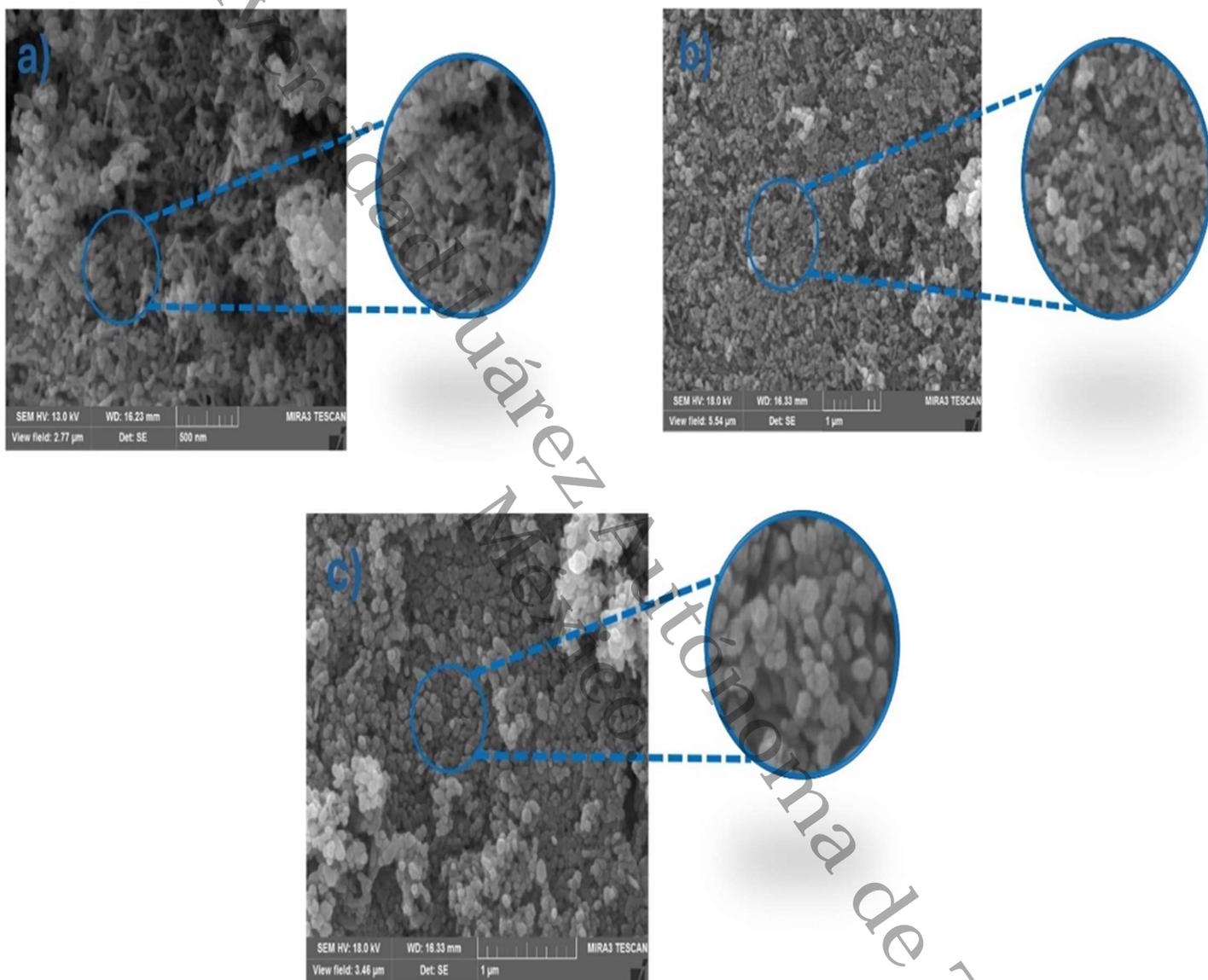
Con base a Sharma y col. (2022), los difractogramas obtenidos de las muestras, presentan intensidades relativas típicas de polvo de ZnO y exhibieron una mayor intensidad relativa en el plano (101), referido al crecimiento anisotrópico y orientación preferida de los cristales, en dirección del eje c. Las muestras SG-400 y PP-400 son consistentes entre ellas, sin embargo, esta última, alcanzó una máxima intensidad en la señal del plano (101).

Las micrografías de las muestras obtenidas por mecanoquímica se presentan en la Figura 8 a) MQ-20, b) MQ-40, c) MQ-60, en las que se observan superficies con nanopartículas de ZnO cuasi esféricas de apariencia uniforme y la presencia de aglomerados de óxido de zinc producto de la reacción, una distribución del tamaño reducido, con diámetros promedio de 111, 105 y 154 nm respectivamente.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Figura 8

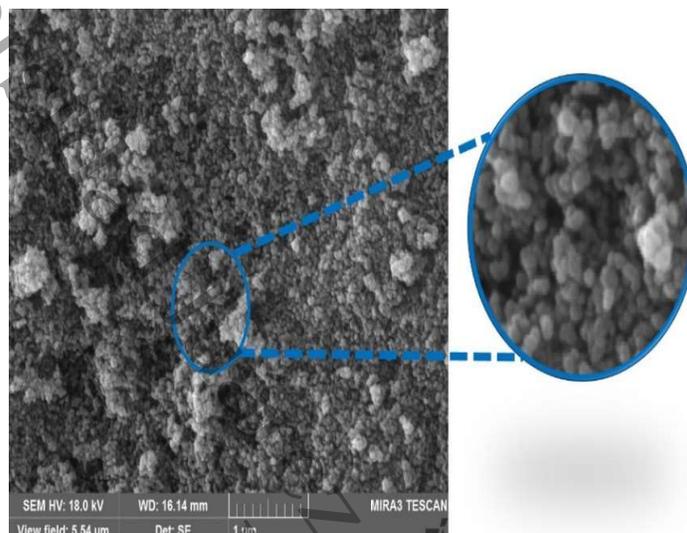
Micrografías de SEM de las muestras de ZnO sintetizadas por mecanoquímica; a) MQ-20, b) MQ-40, c) MQ-60



Las muestras de los polvos obtenidos mediante precipitación se presentan en la Figura 9 PP-400, donde se observa una distribución uniforme y regular de las nanopartículas cuasiesféricas de ZnO con tamaños medios de 128 nm, obtenidas por SEM.

Figura 9

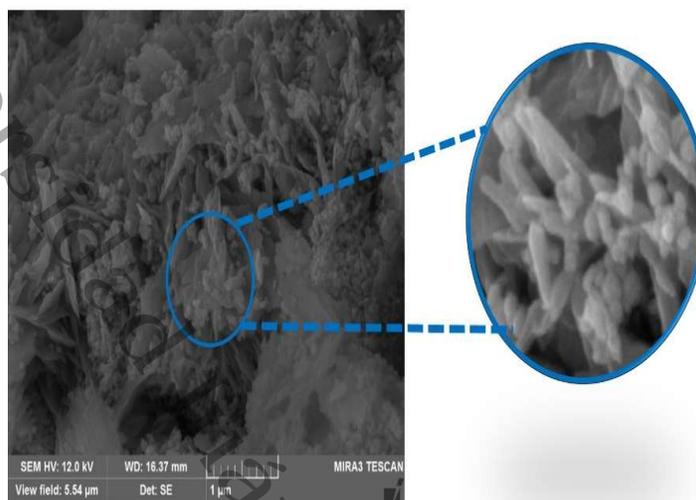
Micrografías de SEM de las muestras de ZnO sintetizadas por precipitación (PP-400)



Así mismo, se presenta la micrografía de polvos de ZnO obtenidos por sol gel, en la Figura 10 SG-400, donde se aprecia la formación de cristales poliédricos, atribuidos a formas de nanovarillas alargadas con un crecimiento preferencial con orientación a lo largo del plano 101, que concuerda con el resultado de difracción. Tienen valores promedio de ancho y largo de 37.56 y 53.32 nm respectivamente y diámetro promedio de 93 nm.

Figura 10

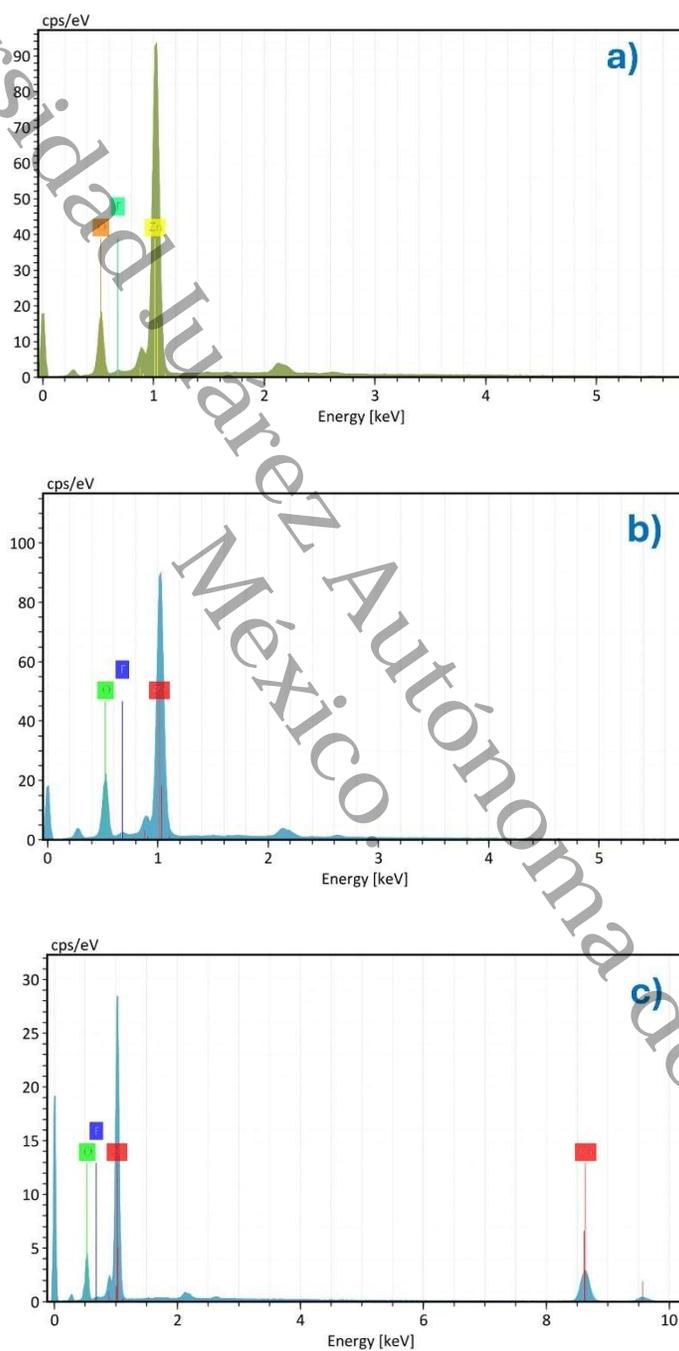
Micrografías de SEM de las muestras de ZnO sintetizadas por Sol gel (SG-400)



Los espectrogramas de energía dispersiva obtenidos por EDS de las muestras de los polvos de ZnO obtenidos por mecanoquímica se presentan en la Figura 11 a) MQ-20, b) MQ-40 y c) MQ60. Y corresponden a los elementos presentes en los polvos de ZnO analizados. Los espectros son atribuidos a las energías características del Zn (1.0118 keV transición $L\alpha$, 8.6313 keV transición $K\alpha$) y O (0.5249 keV transición $K\alpha$) los cuales muestran alta intensidad. Además, se obtuvo una composición predominante de zinc ($\approx 75-79$ % masa) y oxígeno ($\approx 18-22$ % masa) en menor concentración, el análisis se realizó por triplicado en diferentes zonas de la muestra.

Figura 11

Espectrograma de energía dispersiva de muestras de ZnO obtenidas por mecanoquímica a) MQ-20, b) MQ-40, c) MQ-60



Así mismo, en los polvos de ZnO obtenidos por precipitación (Figura 12) y Sol gel (Figura 13) se confirma la presencia de Zn y O, siendo la muestra PP-400 la que obtuvo mayor porcentaje en masa de Zn (86.18 %) respecto a la muestra SG-400 (78.16 %) y las de MQ-20, 40 y 60 (79.90, 75.71 y 79.94 %). Los espectrogramas de energía dispersiva ambas muestras presentan las energías dispersivas asociadas al Zn (1.0118 keV transición $L\alpha$) y al O (0.5249 keV transición $K\alpha$).

Figura 12

Espectrograma de energía de muestras de ZnO obtenidas por precipitación (PP400)

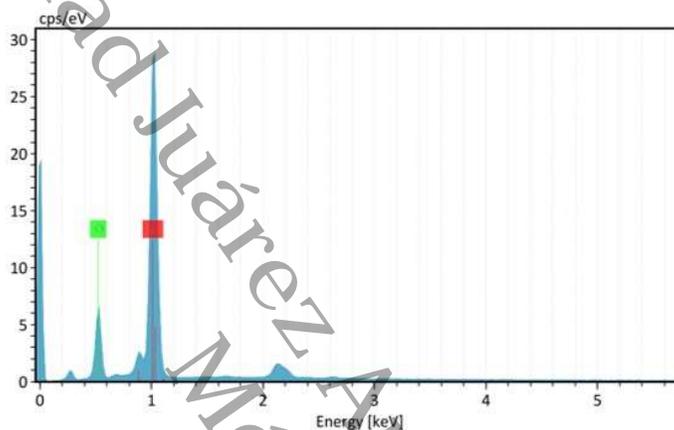
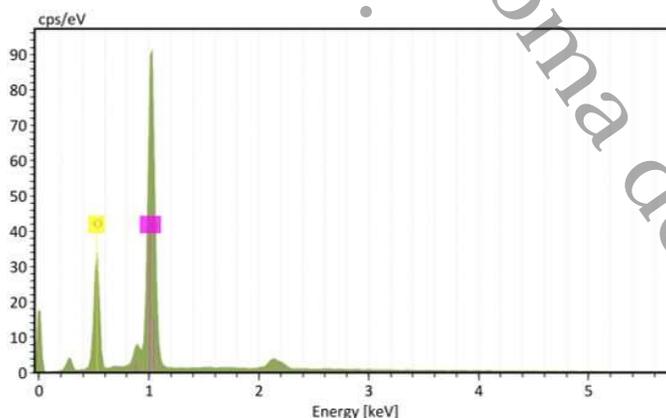


Figura 13

Espectrograma de energía dispersiva de muestras de ZnO obtenidas por Sol gel (SG-400)

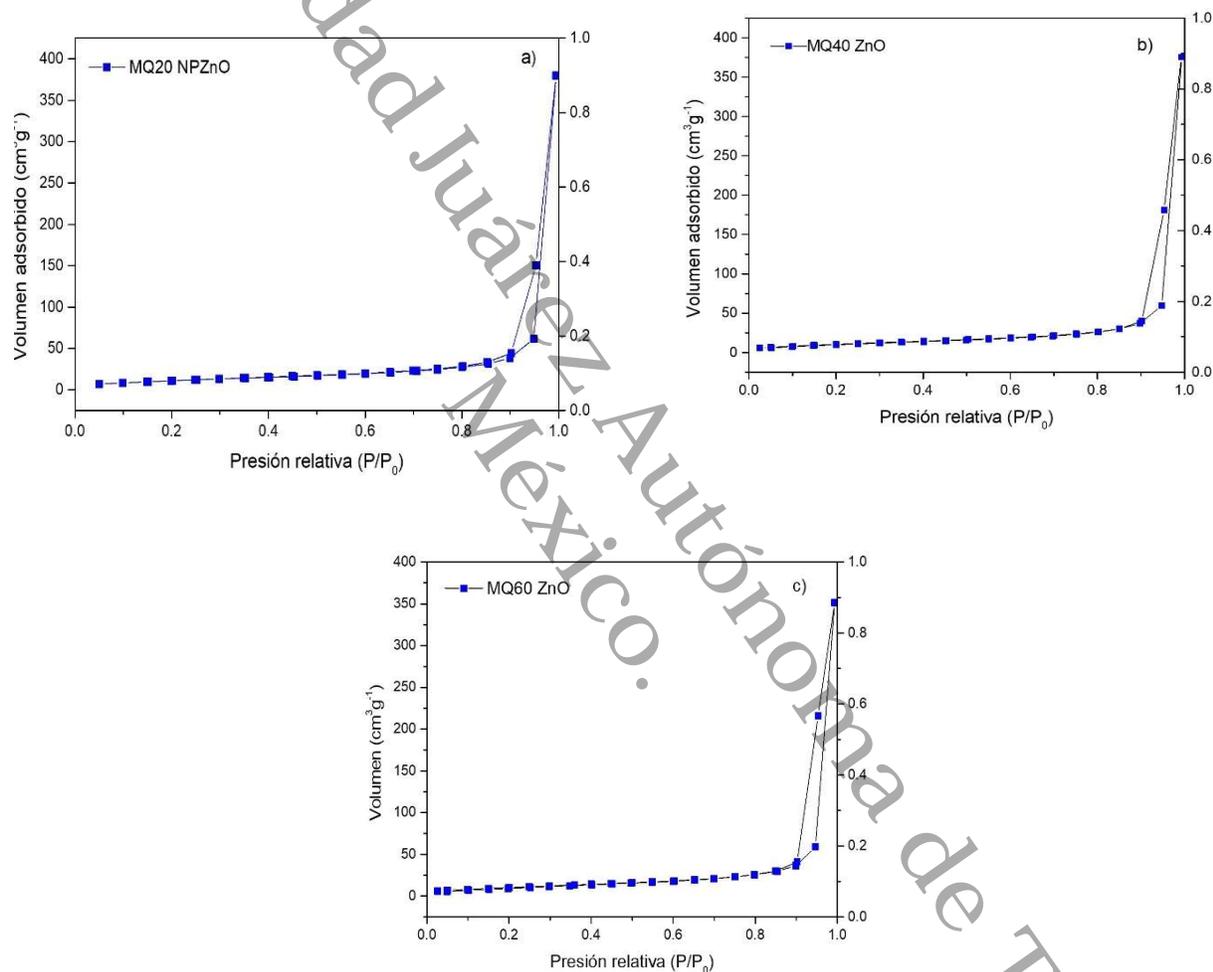


El análisis del área superficial de los polvos de ZnO, se presentan mediante las isotermas BET. Las muestras sintetizadas por mecanoquímica graficados en la Figura 14 a) MQ-20, b) MQ-40 y c) MQ-60, todas las isotermas corresponden al tipo IV con bucle de histéresis estrecho, lo que indica, que el proceso es casi irreversible. Los

tamaños de poros obtenidos están entre 31 a 33 nm, esto explica la pequeña cantidad de gas N_2 adsorbido, atribuida a una superficie BET que va desde los 38 hasta $41 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$.

Figura 14

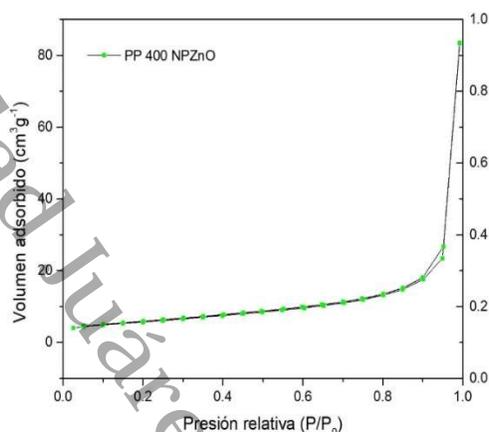
Isotermas de adsorción-desorción de N_2 , de muestras de ZnO obtenidas por sol gel.



De igual forma, se analizó la muestra obtenida por precipitación como se observa en la Figura 15, la muestra PP-400, presentó una isoterma de tipo IV con un volumen de N_2 adsorbido de $83.50 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, área de superficie BET de $14.181 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ y diámetro de poro de 30 nm.

Figura 15

Isotermas de adsorción-desorción de N_2 , de muestras de ZnO sintetizadas por precipitación



Los resultados de fisisorción mostraron diferencias significativas entre las síntesis siendo la muestra MQ 20 con mayor área superficial ($41.36 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$), lo que se asume que el factor tiempo molienda (20 min) favoreció al fenómeno de adsorción; siendo este, 3 veces superior al valor de la muestra PP-400.

4.4 Evaluación de las Propiedades Biotensioactivas de la Cepa Bacteriana Extremófila *Acinetobacter Baumannii* Aislada de Agua Congénita

Las características fisicoquímicas del agua congénita, obtenida con base en los resultados del muestreo, se resumen en la Tabla 7. Se observaron altas concentraciones de salinidad y alcalinidad, debido a, los cloruros y al sodio y la alcalinidad a los bicarbonatos presentes en el agua. Estudios realizados por (Barragán R. y col., 2001) y justificados por (Montiel Garza, 2019) sobre la caracterización del agua de formación en pozos. El pozo activo Luna-3B Tabasco, reportó concentraciones de salinidad, alcalinidad y dureza de 203000, 102.4 y 26890 ppm. Estos valores están por arriba de los encontrados en esta investigación, que se atribuye a los altos índices de saturación de minerales correspondientes a las características de los sistemas hidrotermales. Por tal razón, el agua congénita se le atribuye como un hábitat con características idóneas para el desarrollo de bacterias extremófilas.

Tabla 7

Parámetros fisicoquímicos del agua congénita identificada (AC362) perteneciente al pozo de Petróleos Mexicanos (PEMEX)

Parámetros	Valor	Límites permisibles
Alcalinidad	300 mg/L	500 mgL ⁻¹
Cloruros totales	93.701 mg/L	1000 mgL ⁻¹
Conductividad eléctrica	8.51 mS/cm	N/A
pH	5.5 (a 24 °C)	6-9
Turbiedad	161 NTU	N/A

Según Ayilara & Babalola, (2023), el petróleo crudo, puede ser degradado por varios microorganismos autóctonos, cada uno es capaz de romper un grupo específico de moléculas. Se ha reportado que la *Acinetobacter b.*, es capaz de degradar compuestos alifáticos y monoaromáticos. Los datos de la caracterización se presentan en la Tabla 8, cuyos resultados evidencian un petróleo maya de tipo pesado, según los grados API que se sitúan entre 21.0 – 22.0. Con base a (Bedoya Vélez y col., 2019), expusieron el petróleo como la fuente principal de carbono para distintos bioensayos que, favoreciendo el crecimiento de bacterias, propiciando la degradación y asimilación de los hidrocarburos presentes transportándolo al interior de la célula para la conversión de ácidos grasos.

Tabla 8

Caracterización de la muestra de petróleo del pozo-362, propiedad de PEMEX, Tabasco

Prueba	Resultado	Referencia
Densidad real	0.866 gcm ⁻³	ASTM D70
Densidad ° API	22.483 ± 0.2566	ASTM D287
Flash point	81 ± 1 °C a 27 °C	ASTM D 88
viscosidad saybolt	14 s a 59 °C	ASTM D 88

Los componentes del petróleo fueron separados mediante un cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas Marca Shimadzu Modelo GCMS-QP2010 ultra con columna capilar (5 %-fenil-95 % dimetilpolisiloxano) de 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 m de espesor de película. El flujo del gas helio fue de 1.5 mLmin⁻¹ y el volumen de inyección fue de 1 µL, un split ratio de 10:1, y un rango de masas: m/z 25 - 600. En la Figura 16,

se presenta el perfil cromatográfico de la muestra de petróleo, en el que se observa la fracción alifática de los alcanos de acuerdo con sus pesos moleculares (PM). En la Tabla 9, se presentan los hidrocarburos presentes en la muestra del petróleo clasificados por su peso molecular (PM), los de menor PM (C8-C16), peso molecular medio (C17-C28), y alto peso molecular (> C28).

Figura 16

Perfil cromatográfico de un petróleo pesado tipo Maya, del pozo-362 (PEMEX)

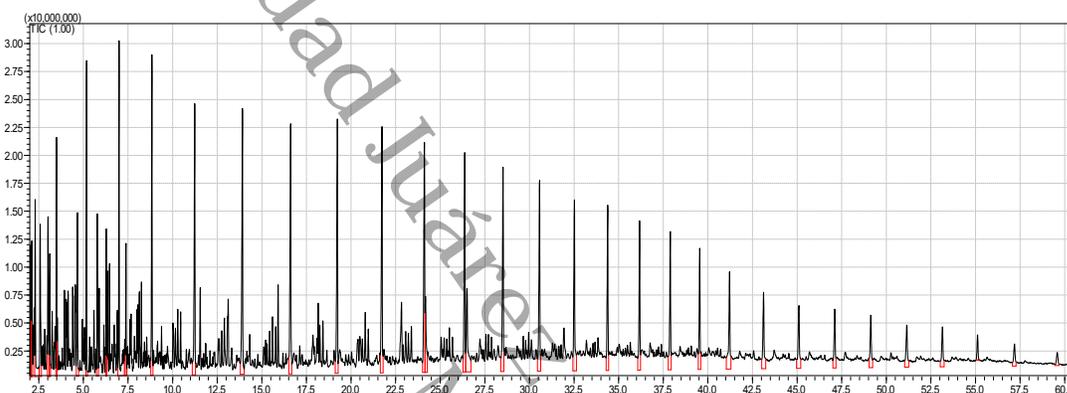


Tabla 9

Principales hidrocarburos presentes en la muestra de petróleo crudo

	Tiempo de retención (min)	Área	Área (%)	Nombre
1	2.041	32746873	1.81	3-metil-Heptano
2	2.102	27082911	1.50	3-metil-Hexano
3	2.295	39828621	2.20	Heptano
4	2.577	38969535	2.16	metil-Ciclohexano
5	3.014	40591309	2.24	2-metil-Heptano
6	3.113	24316111	1.34	3-metil-Heptano
7	3.494	42238820	2.34	Octano
8	4.664	34956763	1.93	3-metil-Octano
9	5.174	52687865	2.91	Nonano
10	5.778	37629982	2.08	3- metil -Nonano
11	6.282	25639264	1.42	3,5,5-trimetil-1-Hexeno
12	6.999	79609136	4.40	Undecano
13	7.384	23876788	1.32	5-etil-2- metil-Heptano
14	8.839	71049445	3.93	Dodecano
15	11.239	77616937	4.29	6-etil-2- metil-Decano
16	13.914	82218936	4.55	Tridecano
17	16.613	82140011	4.54	Tetradecano
18	19.233	81120530	4.49	Pentadecano
19	21.734	80007369	4.42	Hexadecano

	Tiempo de retención (min)	Área	Área (%)	Nombre
20	24.112	78833527	4.36	Heptadecano
21	24.175	29822294	1.65	2,6,10,14-tetrametil-Pentadecano
22	26.369	70239248	3.88	Octadecano
23	26.492	48686562	2.69	2,6,10,14-tetramethyl-Hexadecano
24	28.519	68587794	3.79	Nonadecano
25	30.564	66437286	3.67	Eicosano
26	32.518	61862262	3.42	Heneicosano
27	34.385	51384626	2.84	Docosano
28	36.173	47183359	2.61	Tricosano
29	37.893	45581528	2.52	Tetracosano
30	39.541	37967305	2.10	Pentacosano

Se aislaron 3 cepas bacterianas del medio sólido BH, se identificaron como AC362-1, AC362-2 y AC362-3. La cepa AC362-1, presentó el 80 % de mineralización de los hidrocarburos presentes en el medio líquido (triple 17). Los aislados bacterianos presentaron una coloración fucsia, correspondiente a una Gram negativa, debido a la composición de péptidoglucano en la pared celular por la cual, repelió el colorante de la tinción, mostrando una morfología bacilar, según (Zhou y y col., 2020) es característico de la *Acinetobacter*. La taxonomía obtenida mediante la base de datos del Apiweb™ de Biomerieux, identificó a la cepa AC362-1, perteneciente al género de *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*, con un ID de 98 %. Así también se ha reportado, como con (Wang y col., 2021), que en aguas costeras han aislado cepas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Marinomonas*, *Kurthia* y *Azothobacter* identificadas como hidrocarbonoclastas. Los resultados de los análisis morfológicos y bioquímicos se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10

Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a la cepa AC362-1, respuesta positiva (+)

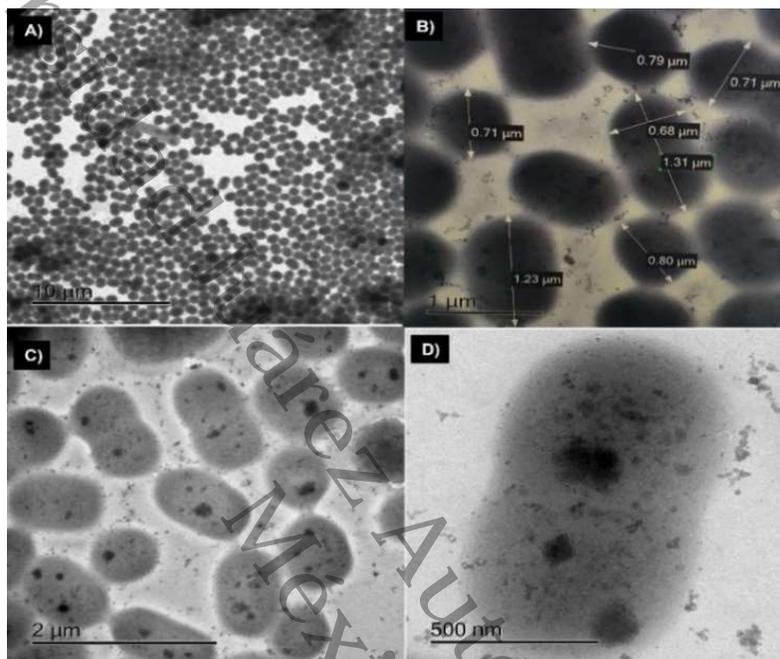
Prueba bioquímica	Resultado
Morfología colonial	Puntiforme, elevas, entera, pequeñas, lisa, mate
Tinción de Gram	Gram negativa
Fermentación de la glucosa	+
Fermentación de arabinosa	+
Fermentación de la acetoina	+
Oxidación de melobiosa	+
Reducción del citrato	+

La reducción de citrato, la oxidación de la glucosa, arabinosa, melobiosa, además de la fermentación de tipo butanodiólica por la presencia de la acetoína, se atribuyen, en base con Madigan y col. (2019), a que la bacteria desarrolló capacidad de asimilar otras fuentes de carbono, lo que favoreció su crecimiento. La Figura 17, presenta la imagen de las bacterias en una micrografía de TEM. Se observa la estructura celular de la *Acinetobacter* en diferentes secciones: A) La forma de agrupamiento de los cocobacilos Gram negativos. B) El análisis preliminar del tamaño, a lo largo (1.270 μm) y ancho (0.738 μm) de la célula, realizado en Digital Micrograph de GATAN®. C) La división celular en la fase exponencial. D) El alargamiento del diplococo y la duplicación de su material genético. , Madigan y col. (2021) y Paraguay–Delgado (2020), mencionaron que las características estructurales y morfológicas de la bacteria, influyen sobre los mecanismos de degradación y mineralización de los hidrocarburos, además, mejoran las condiciones del cultivo *in vitro*, en consecuencia, la producción de biotensioactivos.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Figura 17

Micrografía de la *Acinetobacter baumannii*, analizada por TEM a diferentes escalas: a) concentración de bacterias en un campo de 10 μm ; b) Longitud de las bacterias en μm ; c) visualización de la división celular en μm ; d) formación del diplococo en nm



El estudio cinético de la *Acinetobacter*, a partir de las mediciones de la densidad óptica a diferentes tiempos (t_0 - t_{96}), partió de una población con 0.6 DO y $115 \cdot 10^6$ UFCmL⁻¹. Los valores se ajustaron al modelo de Gompertz, dado por la ecuación 7:

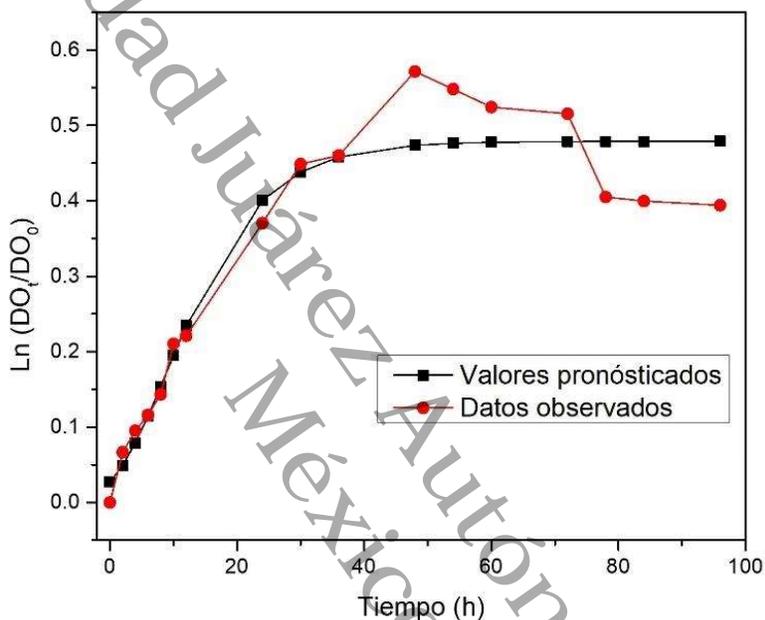
$$y = D * \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_{max} * e}{D} * (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (7)$$

Donde $y = \ln(DO_t / DO_0)$, DO_t es la densidad óptica en el tiempo t , entre la DO_0 es la densidad óptica inicial ($t=0$). Los parámetros fueron: D es el valor máximo asintótico equivalente a $\ln(DO_{max} / DO_0)$, μ_{max} es la tasa específica de crecimiento máximo (h^{-1}) y λ es el periodo de la fase lag (h). El análisis se realizó mediante el paquete SPSS versión 22, donde los parámetros estimados obtenidos fueron: $D = 0.479 \pm 0.20$; $\mu_{max} = 0.020 \pm 0.005$; $\lambda = 0.454 \pm 2.141$. El modelo se validó con un coeficiente de determinación ($R^2=0.929$) esto, considera una bondad aceptable. En la Figura 18, la

comparación de los datos observados (serie color rojo) de $y = \ln(DO_t/DO_0)$ y los valores pronosticados por Gompertz (serie color negro).

Figura 18

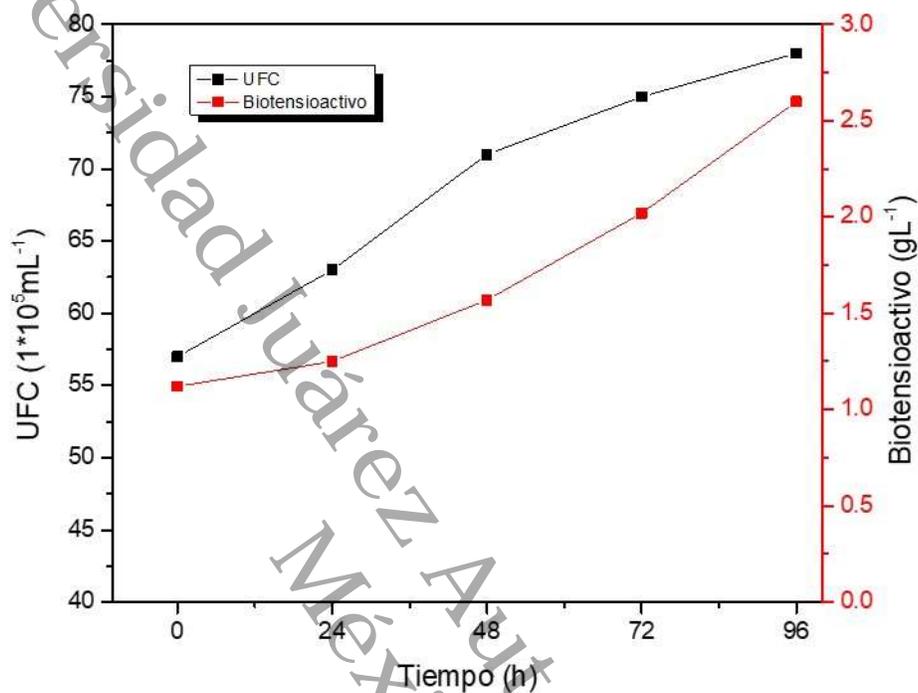
Cinética de crecimiento de la Acinetobacter baumannii



Con base en (Torres-Custodio y col., 2023), y con el análisis de los datos, se evidencia que, la *Acinetobacter* puede alcanzar una mayor tasa metabólica antes de las 96 h, bajo las mismas condiciones experimentales lo cual podría favorecer el rendimiento en la producción de biotensioactivo. Por otro lado, partiendo de una población de $57 \cdot 10^5$ UFCmL⁻¹ se construyó la cinética de producción de biotensioactivo (g mL⁻¹) y la cuantificación de la UFCmL⁻¹. Se obtuvo un máximo de 2.6 g⁻¹L a las 96 h de experimentación (Figura 19). Estudios, han reportado la producción de 0.52 gL⁻¹ de biosurfactante aislado de aguas de formación de yacimientos petroleros.

Figura 19

Cinética del crecimiento en la producción de biotensioactivo. UFC vs Biotensioactivo (grL^{-1})



Los resultados de la actividad biotensioactiva de la cepa *Acinetobacter baumannii* en la prueba hemolítica, la dispersión de aceite, el índice de emulsificación y la gota colapsada se presentan en las imágenes de la Figura 20.

Figura 20

Pruebas de la capacidad biotensoactiva en CLC. a) Prueba hemolítica, b) Dispersión de aceite, c) Índice de emulsificación, d) Prueba de la gota colapsada



En la Tabla 11, se resumen los resultados promedio de las pruebas, tomando en consideración que a las 96 h en que se obtuvo la máxima producción de biotensoactivo; las pruebas hemolíticas y la gota colapsada resultaron positivas (+). La dispersión de la gota y el IE_{24} , fueron de 6.54 mm, 64.49 %, respectivamente. De acuerdo con (Varma y col., 2017), se han reportado valores de 11-25 mm, 38.46 %, en la dispersión de la gota y el IE_{24} , en la caracterización de un lipopéptido producido por *Bacillus subtilis*. Según (Becerra & Horna, 2016), estas diferencias radican en la composición estructural del biotensoactivo. Las pruebas representaron un método útil para la selección preliminar de la bacteria como productora de biotensoactivo, más no se consideraron un método definitivo debido a las limitaciones. Por lo tanto, se validaron mediante los análisis de FTIR y tensión superficial.

Tabla 11

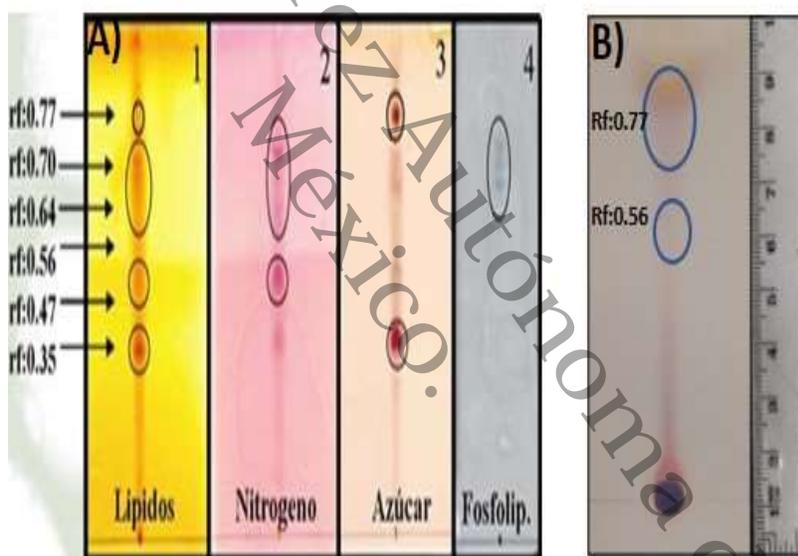
Pruebas de la capacidad tensioactiva en CLC

Tiempo	Prueba hemolítica	Gota colapsada	Dispersión de la gota (mm)	IE_{24} %
0	-	-	0.72	48.09
24	-	+	1.14	52.17
48	+	+	3.17	55.93
72	+	+	5.62	51.62
96	+	+	6.54	64.49

En la Figura 21 se presentan: A) El patrón de referencia y B) Muestra del biotensioactivo BTAC362 en la que se observa que la placa aspergida con ninhidrina presentó un marcador de color lila a lo largo de la migración que se atribuye a los aminoácidos presentes en la muestra como componente principal de los péptidos, según el valor de R_f : 0.56-0.77 del patrón de referencia. Basándose en (Ahmad y col., 2018) y de acuerdo con los resultados, se obtuvo un biotensioactivo de tipo lipopéptidos producido por la bacteria *Acinetobacter*. Farias y col. (2021), también indican que la misma bacteria produce biotensioactivos tipo lipopolisacáridos como el emulsán.

Figura 21

Cromatografía en capa fina en placas de sílice. a) Patrón de referencia, b) Muestra del biotensioactivo BTAC362

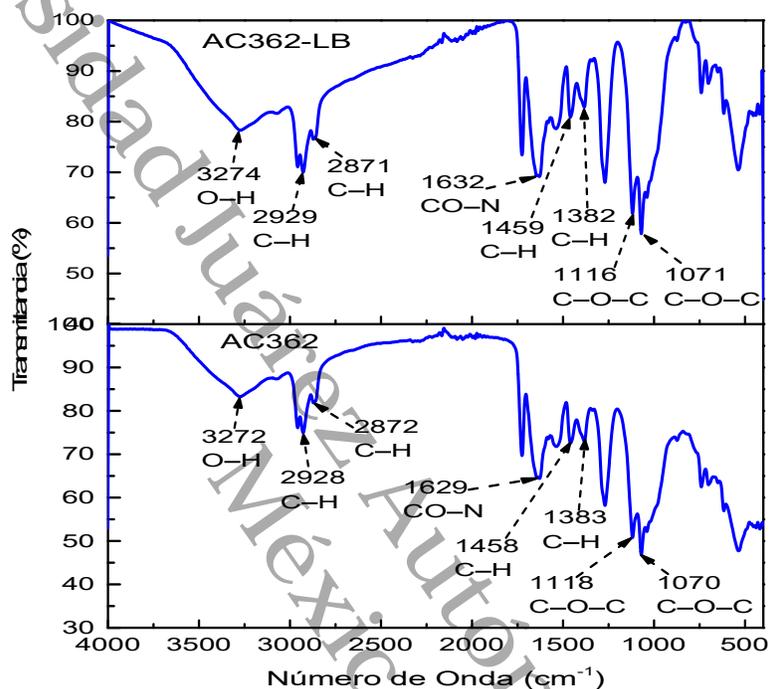


La Figura 22 muestra el espectro de absorción del biotensioactivo mediante el análisis de FT-IR en la región de 4000 a 500 cm^{-1} . Se observa que el pico de mayor intensidad situado en 2958 cm^{-1} , se refiere al estiramiento de los enlaces C-H ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$) debido a las cadenas alifáticas de los hidrocarburos, además, de la presencia de polisacáridos. Con base en (Ambaye y col., 2021), en la banda de absorción en 2647 cm^{-1} , se asume al estiramiento de los enlaces O=C-N, debido a las vibraciones de las amidas de los péptidos y los grupos carboxilos; el pico marcado en 1384 cm^{-1} , se debe

a los enlaces C-N de los grupos aminos, así como, los radicales alquilo R-C situados en la región de 1267 cm^{-1} .

Figura 22

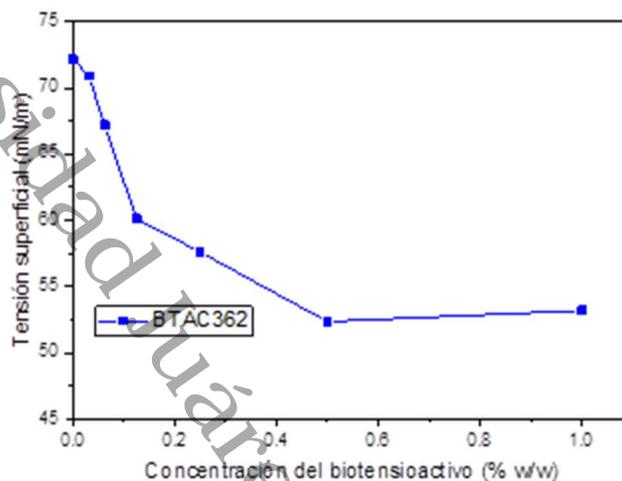
Espectro de absorción del biotensioactivo (AC362) y corrección de la línea base (AC362-LB)



En la Figura 23 se presenta el análisis de la tensión superficial, donde el biotensioactivo redujo la tensión de 72.18 mNm^{-1} (agua) a 53.21 mNm^{-1} . Según (Varma y col., 2017) y (Ambaye y col., 2021), estos atributos mejoran la permeabilidad de la membrana celular, lo cual favorece la biosorción del petróleo en la superficie celular bacteriana, en efecto aumenta la tasa de degradación de los hidrocarburos del petróleo.

Figura 23

Tensión superficial del biotensioactivo BTAC362

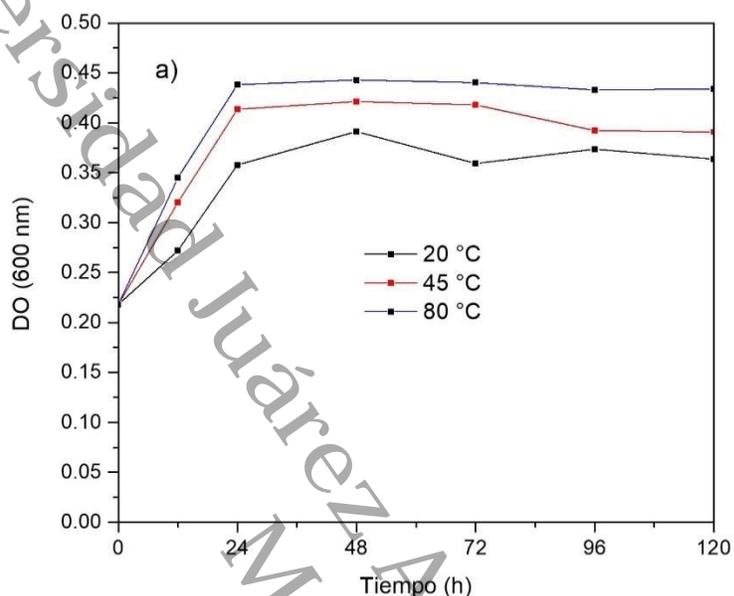


El análisis de la capacidad extremófila se realizó con base en un diseño unifactorial completamente aleatorizado para distintos factores. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa Statgraphics Centurion™, a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Para las gráficas se usó el paquete estadístico Sigma Plot, v.14.0 y la prueba de Tukey.

En la Figura 24 se observan las tres curvas de absorbancia a temperaturas de 20, 45 y 80 °C; resaltando que a partir de las 24 h se mantuvieron constantes, sin embargo, la T= 80 °C se obtuvieron los niveles más altos de absorbancia y un valor máximo de 0.44 resaltando que, el valor promedio máximo de absorbancia fue de 0.393 correspondiente a la temperatura de 80 °C. Las pruebas pares resultaron significativas (valor $p < 0.05$), entre los tratamientos.

Figura 24

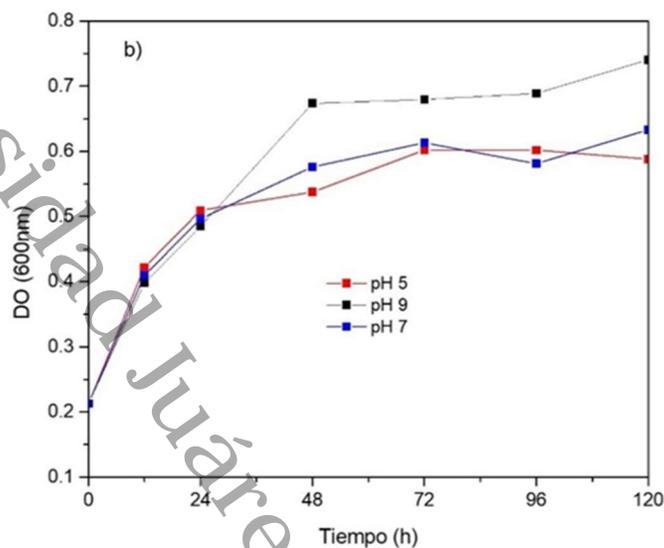
Medición de absorbancia vs tiempo a temperatura 20, 45 y 80 °C en un bioensayo en condiciones extremas



En la Figura 25, se observa que, el valor de la absorbancia se mantuvo por igual durante las 24 h para los tres tratamientos (pH 5, 7 y 9); a partir de las 48 h, la curva a pH=9 tuvo un valor máximo de 0.74. Mediante el método de diferencia mínima significativa (HSD) de Tukey se encontró que no existe diferencias significativas entre las medias de los tratamientos de pH, lo que indica que los 3 grupos son homogéneos; entonces, se asumen que el factor pH no influyó significativamente en la medición de la absorbancia.

Figura 25

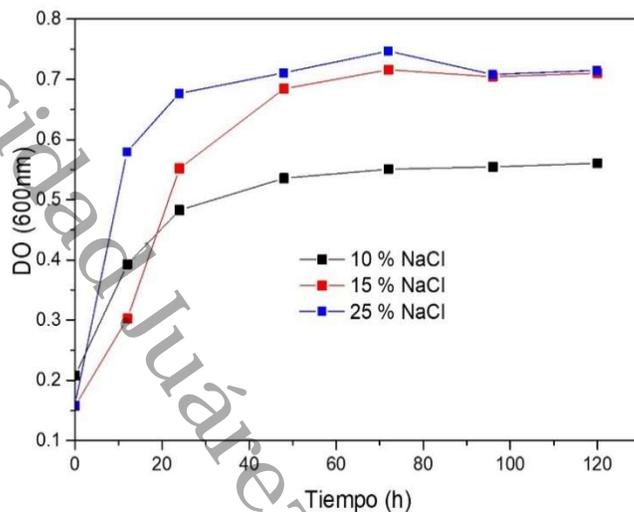
Medición de absorbancia vs tiempo a pH 5, 7 y 9 en un bioensayo en condiciones extremas



En la Figura 26 se observa que las tres curvas de salinidad se mantuvieron una absorbancia constante a partir de las 48 h, sin embargo, las curvas de salinidad a 15 y 25 % de NaCl presentaron valores similares y por encima de la curva del 10 %. La concentración salina del 15 % obtuvo un valor de 0.766 de absorbancia a las 72 h, favoreciendo al crecimiento de la población bacteriana. Todas las pruebas pares resultaron con diferencias estadísticamente significativas (valor $p < 0.05$), con un valor promedio de absorbancia de 0.631238 para 25 % de salinidad. Se asume que el factor salinidad favoreció al crecimiento de la población bacteriana.

Figura 26

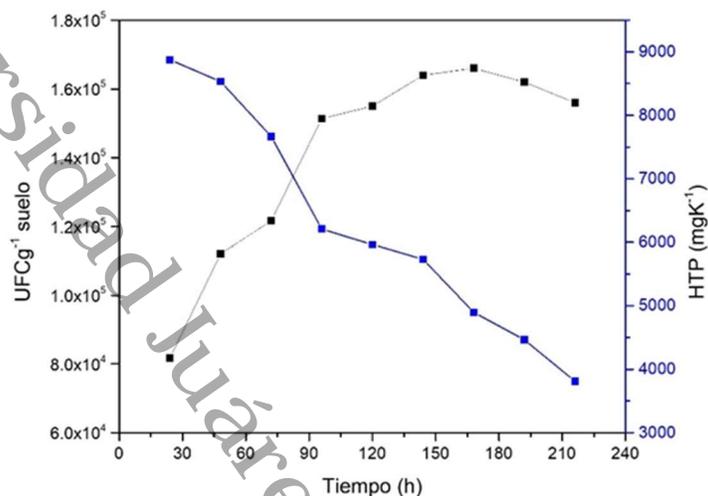
Medición de la absorbancia vs tiempo a concentraciones de 10, 15 y 25 % de NaCl en un bioensayo en condiciones extremas



Los resultados de la biorremediación del suelo contaminado se presentan en la Figura 27, el cual se observó un comportamiento favorable para el proceso, ya que alcanzó una degradación de 3812 mgkg^{-1} con una población de 34600 UFCmL^{-1} al tiempo 9 (216 h) del tratamiento.

Figura 27

Cuantificación bacteriana $UFC_{mL^{-1}}$ y HTP en el bioensayo de biorremediación



Zhou y col. (2020), reportó el aislamiento de *Acinetobacter sp* como productora de biosurfactante, la cual redujo la tensión superficial del agua de $72,2 \text{ mNm}^{-1}$ a $30,2 \text{ mNm}^{-1}$. Asimismo, promovió significativamente ($P < 0,05$) la eliminación de la demanda química de oxígeno (reducción de $6646,7 \text{ mgL}^{-1}$ a $1546,7 \text{ mgL}^{-1}$) y la degradación de n-alcenos (reducción de $2635,4 \text{ mgL}^{-1}$ a $159,7 \text{ mgL}^{-1}$) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (reducción de $918,6 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$ a $209,6 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$) en 7 días.

Los resultados de la caracterización del agua congénita en relación con el grado de alcalinidad y dureza (300 mgL^{-1} y 93.701 mgL^{-1}) brindaron un ambiente idóneo para el crecimiento de la *Acinetobacter*, estas desarrollaron características extremófilas al soportar condiciones de temperatura, pH y salinidad de $80 \text{ }^\circ\text{C}$, 9 y 25 %, respectivamente. Por otro lado, se evidenció su morfología bacilar Gram negativa, caracterizada por la formación de cápsulas de polisacáridos o proteína, que envuelve a la célula y sirve de protección y estrés ambiental, lo que la hace más resistente a condiciones extremas. En condiciones *in vitro*, la cinética de crecimiento presentó una tasa de crecimiento máximo ($0.020 \pm 0.005 \text{ h}^{-1}$), ajustándose los datos observados al modelo de Gompertz, así mismo se obtuvo un coeficiente de determinación $R^2=0.929$, lo cual es aceptable. Además, este análisis marcó los precedentes para la producción de biotensioactivo por la bacteria *Acinetobacter*.

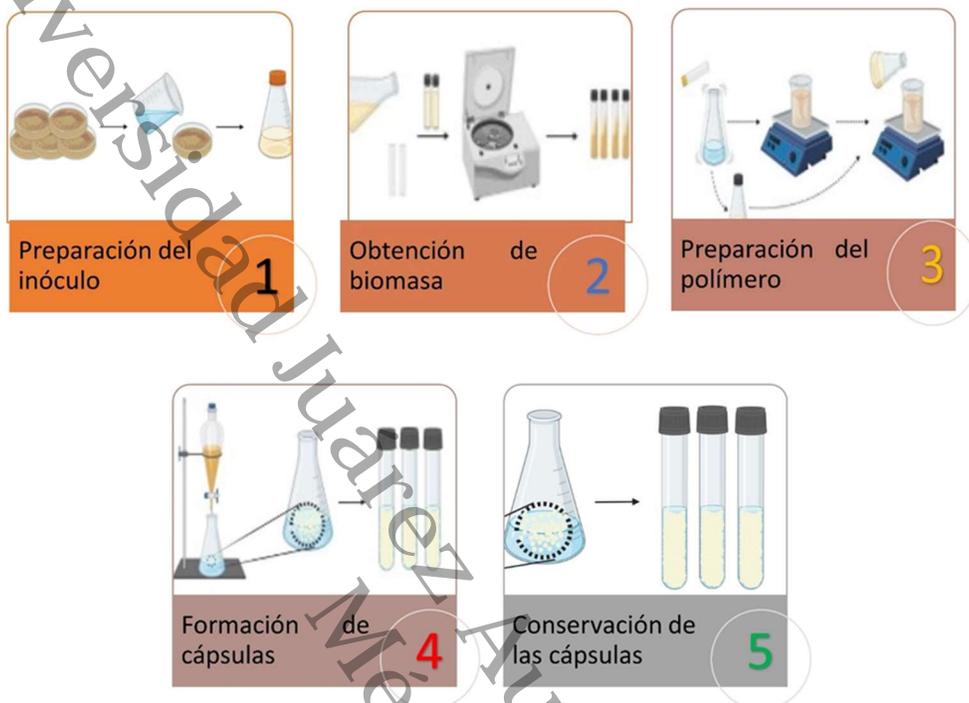
En este estudio se obtuvo un rendimiento de 2.6 g/L^{-1} a las 96 h de producción para un biotensioactivo tipo lipopéptido, que redujo la tensión superficial de 72.18 mNm^{-1} (agua) a 53.21 mNm^{-1} . Las cepas de *Acinetobacter*, presentaron un alto potencial biotecnológico al degradar de 9000 a 3812 mgKg^{-1} de hidrocarburos en la biorremediación del suelo contaminado con un petróleo tipo Maya.

4.5 Inmovilización de Cepas de *Acinetobacter baumannii* en el Alginato de Sodio Funcionalizado con ZnO

En condiciones axénicas, se lavaron con agua estéril 10 cajas de petri con cultivo bacteriano de 24 h de incubación y se centrifugaron a 5500 rpm, para obtener la biomasa, se suspendieron en 30 mL en agua estéril alcanzando una DO de 0.9. La biomasa se suspendió en una solución estéril de alginato de sodio a 1.2 % con 0.1 mg mL^{-1} de NPZnO, la mezcla así obtenida se denomina sistema nanobiocatalítico y se homogenizó mediante agitación constante. Para la formación de las cápsulas se realizó el siguiente procedimiento, basado en (Bebić y col., 2020) y (Nematian y col., 2020). La mezcla del sistema nanobiocatalítico, se colocó en un embudo de separación y se depositó gota a gota en una solución de CaCl_2 al 0.2 M en agitación. Al término del proceso las capsulas se lavaron con agua estéril y se conservaron en solución de cloruro de sodio al 0.9 % (Figura 28).

Figura 28

Inmovilización de cepas bacteriana en alginato de sodio con NPZnO mediante el encapsulamiento

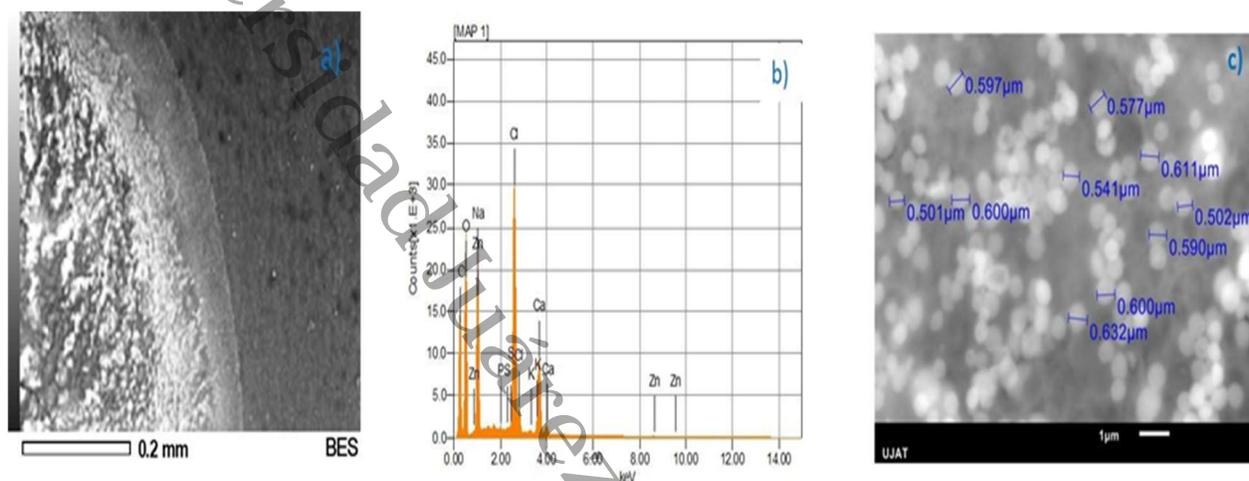


4.6 Análisis de las Microcápsulas Mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

En la Figura 29. a) se observa la textura rugosa de las capsulas (AZnO) y ciertas ramificaciones, que se atribuyen a las cadenas de alginato con iones zinc, b) Composición elemental de las cápsulas, en la cual se identificaron en mayor proporción elementos como: carbono con 49.89 % de peso seco, oxígeno 37.55 %, sodio 5.29 %, cloro 4.61 %, calcio 2.60 % y otros elementos traza (potasio, silicio, azufre), c) Tamaño de las células adheridas a la matriz, las cuales correspondieron a ~ 0.542 y ~ 0.60 μm de ancho y largo, respectivamente.

Figura 29

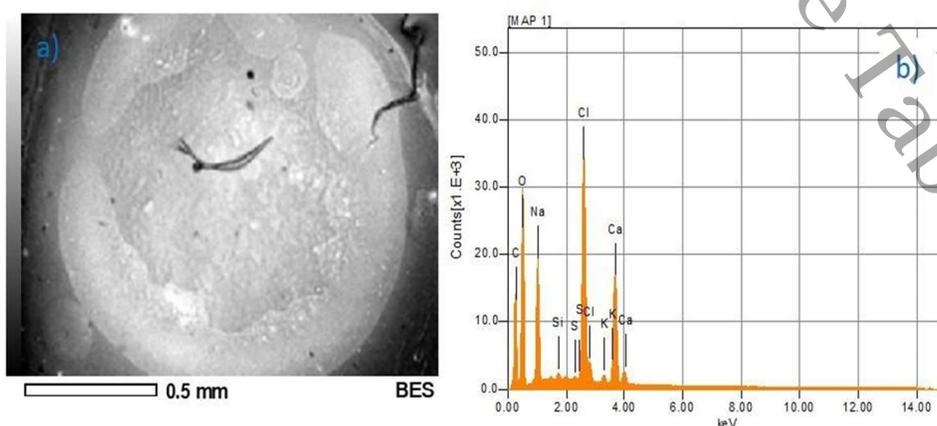
Micrografía SEM, de la bacteria *Acinetobacter baumannii*, inmovilizada en alginato de sodio con NPZnO. a) Morfología de la cápsula AZnO, b) Análisis elemental (EDS), c) Tamaño promedio de las células en la matriz polimérica



En la Figura 30, a) se observa la estructura elipsoidal e irregular de la capsula (ANA) con una cavidad, que se atribuye al centro activo, b) Composición elemental de la cápsula, identificando en mayor proporción elementos como: carbono con 49.89 % de peso seco, oxígeno 37.24 %, sodio 5.29 %, cloro 4.61 %, calcio 2.60 % otros elementos trazas en menor proporción.

Figura 30

Micrografías de las células de *Acinetobacter baumannii* inmovilizadas en alginato de sodio (ANA), a) Centro activo de la cápsula b) Análisis elemental

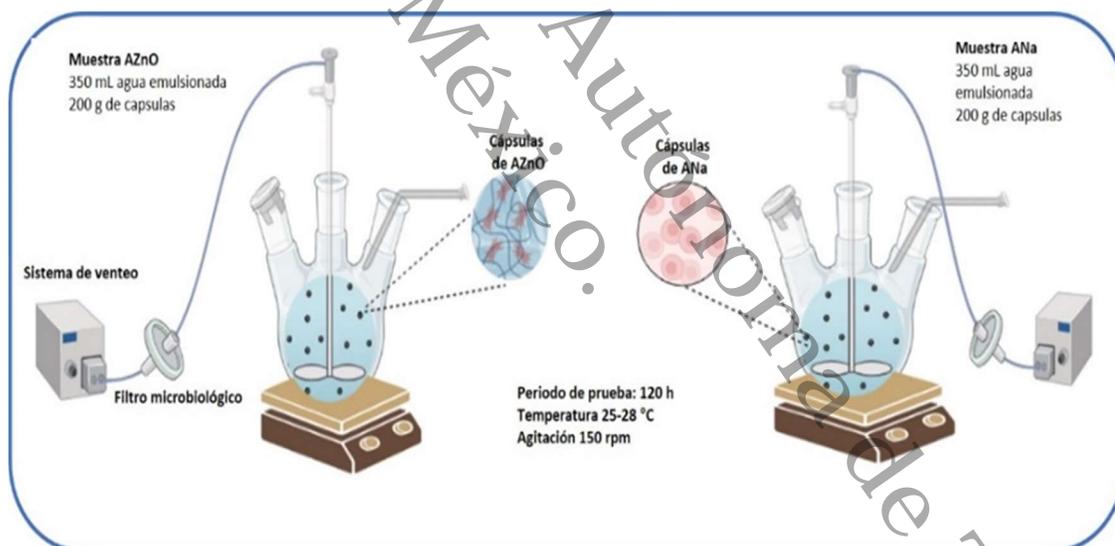


El proceso de degradación de hidrocarburos (HCs) presentes en el agua emulsionada se esquematiza en la Figura 31, el cual, se llevó a cabo en biorreactores a nivel matraces de fondo redondo de tres bocas, marca Pyrex® con 350 mL de agua emulsionada con HCs y 10 % de sustrato (fertilizante inorgánico T17). Apoyado por (Rostro-Alanis y col., 2016) y (Pérez Vidal & Leyton Franco, 2020) se establecieron dos tratamientos; en el primero se le agregaron 200 g de células bacterianas inmovilizadas en alginato de sodio con nanopartículas de óxido de zinc (muestra AZn) y el segundo se agregó 200 g de cápsulas sin nanopartículas (muestra ANa).

Los biorreactores se conectaron con entrada de aire a un sistema de venteo, y se mantuvieron en agitación durante el periodo de experimentación.

Figura 31

Ensayo de biorremediación de aguas emulsionadas con HCs, mediante sistemas nanobiocatalítico



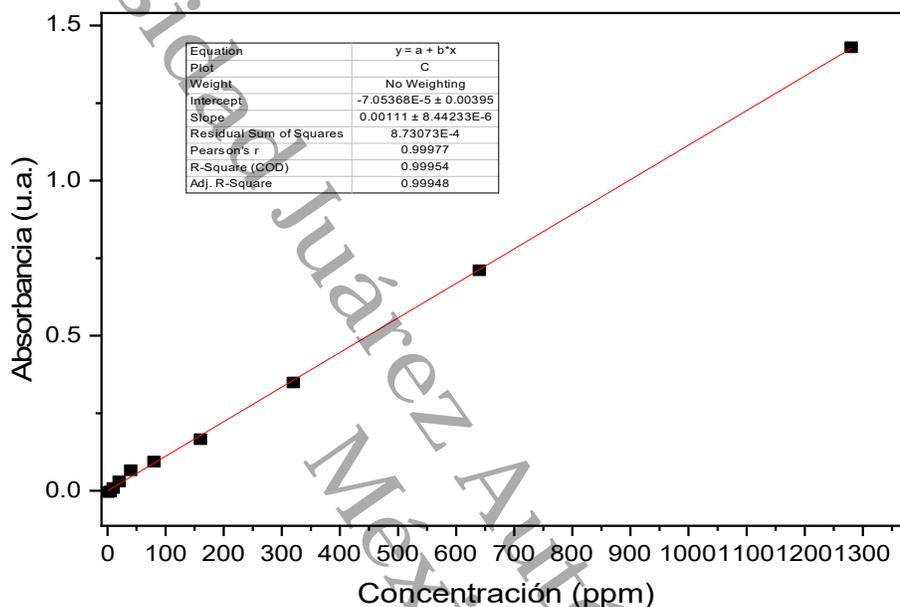
4.7 Análisis de Espectroscopía Ultravioleta-Visible

En la Figura 32, se construye la curva de calibración a partir de una muestra de petróleo de fracción pesada. Se preparó una solución stock de 1280 ppm, y nueve diluciones seriadas de (640, 320, 60, 80, 40, 20, 10, 5 y 1 ppm). Tomando en cuenta a (Arguijo Portillo y col., 2019), la medición de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro de luz UV-vis con un rango de 200 a 500 nm. Los resultados de

absorbancia con respecto a la concentración de HCs fueron graficados utilizando el software Origin versión 2019.

Figura 32

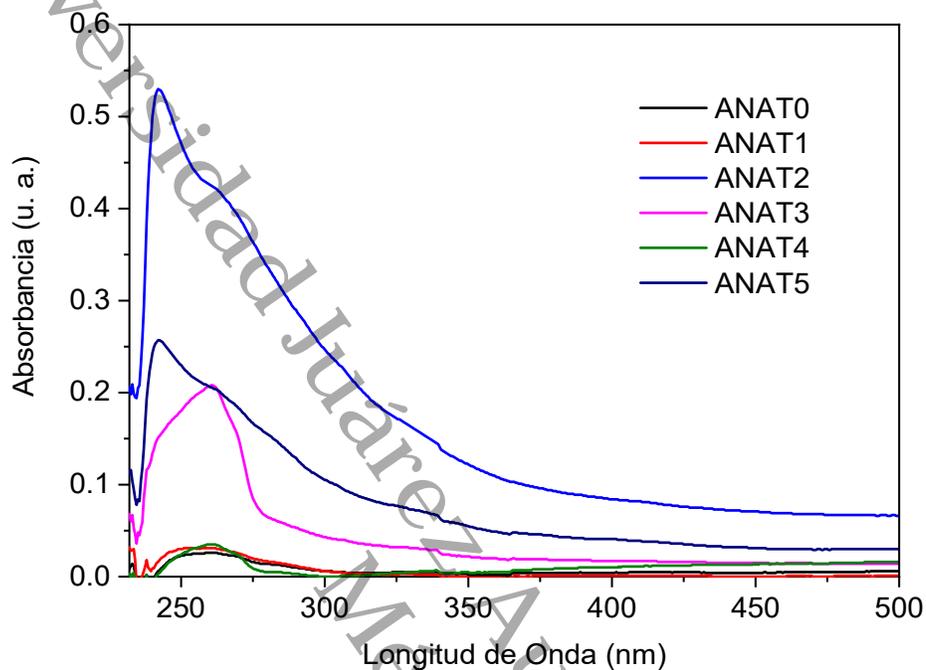
Curva de calibración de un petróleo pesado (HFP) por espectroscopía UV-vis



El muestreo se realizó cada 24 h, con muestra de 10 mL extraídas de los biorreactores e identificadas como ANa y AZn. Se cuantificaron las UFC aplicando la técnica de conteo en placa. En la muestra ANa se cuantificó una población bacteriana de inicial de 32×10^4 y final de 62×10^4 lo que indica que el sistema favoreció a las condiciones de crecimiento de la bacteria. La Figura 33, presenta la absorbancia óptica de la muestra, en la cual, se observa diferencias significativas entre los periodos de prueba, tales que no corresponden al comportamiento esperado. Los valores obtenidos se resumen en la Tabla 12.

Figura 33

Degradación de HCs por el sistema biocatalítico evaluada por espectroscopía de UV-vis

**Tabla 12**

Datos experimentales de la biorremediación con el sistema biocatalítico

Tiempo	Absorbancia	Concentración HCs (ppm)
0	0.026	23.39
1	0.031	27.88
2	0.53	475.61
3	0.208	186.69
4	0.035	31.47
5	0.209	187.59

Para la muestra AZn, ésta presentó una población bacteriana inicial de 30×10^5 y 30×10^3 . La Figura 34, presenta la absorbancia óptica de la muestra AZn, donde se observa la disminución de la absorbancia en relación con los periodos de experimentación, lo que se asume que el sistema nanobiocatalítico favoreció al proceso

de biorremediación, alcanzando una concentración final de HCs de 12.62 ppm, valor aceptable dentro de la normatividad; los valores se resumen en la Tabla 13.

Figura 34

Degradación de HCs por el sistema nanobiocatalítico evaluada por espectroscopía UV-vis

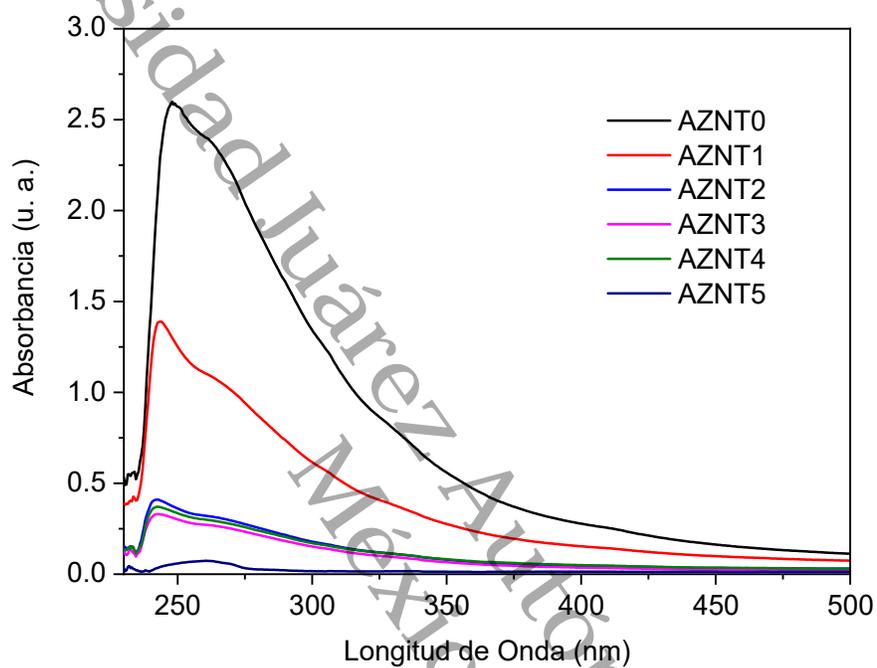


Tabla 13

Datos experimentales de la biorremediación con el sistema nanobiocatalítico (AZn)

Tiempo	Absorbancia	Concentración HCs (ppm)
0	2.599	2332.02
1	1.389	1246.34
2	0.41	367.94
3	0.33	296.16
4	0.371	332.94
5	0.014	12.62

V. Discusión

En esta investigación se aisló e identificó la bacteria *Acinetobacter baumannii complex* mediante espectrometría (MALDI-TOF), presentó capacidad para producir biotensioactivo de tipo lipopéptido. Este metabolito se caracterizó mostrando que reduce la tensión superficial entre agua y aceite. Se probaron tres metodologías de síntesis de polvos de ZnO, mediante la técnica de mecanoquímica se generaron nanopartículas con tamaños de cristal de 21.08 nm, superficies cuasi esféricas aglomeradas, con distribución de tamaño reducido y diámetros de ~111 nm. Además, de una energía dispersiva, asociada al Zn (1.0118 keV transición 1α) y al O (0.5249 keV transición $k\alpha$), una composición predominante de zinc ($\approx 75-79$ % masa) y menor concentración de oxígeno ($\approx 18-22$ % masa), tamaños de poros de 32 nm y superficie de $41.36 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Sus características fueron óptimas para el encapsulamiento de cepas de *Acinetobacter baumannii complex* en alginato de sodio con NP ZnO las cuales demostraron alta biocompatibilidad, estabilidad y mejor interacción para el sistema nanobiocatalítico, favoreciendo la biorremediación de agua emulsionada con hidrocarburos.

Tabla 14

Resumen de los hallazgos más relevantes en relación con la literatura actual

No.	Alcances	Técnica	Hallazgos	Discusión
1	Síntesis de ZnO	Mecanoquímica	Es una técnica simple, económica y además ecológica, al reducir la cantidad de disolvente utilizado y una mínima cantidad de residuos. Los parámetros fueron fáciles de controlar, como el tiempo de molienda, el cual este no influyó en obtener partículas a escala nanométrica. Es un método de Química verde.	Sintetizaron bionanohíbridos de Zn con lipasa B de <i>Candida a.</i> (CALB), logrando una reducción significativa en la conformación de la nanoestructura en un tiempo muy corto (15 min), En particular, los nanohíbridos exhibieron hasta 2000 veces más actividad catalítica. (García-Sanz y col., 2024)

No.	Alcances	Técnica	Hallazgos	Discusión
2	Caracterización	DRX FTIR Adsorción de N ₂ SEM EDS	<p>El patrón de DRX presentó los picos correspondientes a ZnO, la presencia se confirmó por FT-IR, que mostró una banda característica de vibración de estiramiento de Zn-O a 372 cm⁻¹ y cm⁻¹, debido a vibraciones débiles de M-O. El análisis de SEM, se exhibió una estructura cuasi esférica aglomeradas, con distribución del tamaño reducido, con diámetros de ≈120 nm, mientras que los espectros EDX presentaron las energías dispersivas asociadas al zinc y oxígeno. Así mismo, las Isotermas obtenidas fueron de tipo IV, que indica un proceso casi irreversible, con tamaños de poro de ≈30 nm lo que explica la pequeña cantidad de gas N₂ adsorbido, atribuida a una superficie BET que va desde los 38 hasta los 41 m² g⁻¹.</p>	<p>La energía mecánica que se aporta a los reactivos en estado sólido puede acumularse en la deformación de los cristales, produciendo defectos que, en consecuencia, producen regiones de especial reactividad química que facilitan el desarrollo de los procesos en fase sólida. Además, facilita la interacción con el sistema, este dependerá del diámetro de las NPs, la modificación de su superficie, y la posible liberación de iones (Vázquez-Olmos y col., 2018) y (Malebadi y col., 2024)</p>
3	Aislamiento de <i>Acinetobacter baumannii</i> complex	Medio: Agua congénita, Cultivo: Agar Bushnell Hass	<p>Resaltando que, la alta concentración de alcalinidad y cloruros 300 mgL⁻¹ y 93, 701 mgL⁻¹ respectivamente, presentó un ambiente propicio para la <i>Acinetobacter baumannii</i>.</p> <p>Mediante su crecimiento en B.H. un agar selectivo, presentó capacidad de metabolizar el hidrocarburo presente como única fuente de carbono y</p>	<p>El agua congénita está compuesta por sales inorgánicas en altas concentración e hidrocarburos, si bien, es hábitat idóneo para algunos microorganismos. Desechar de este compuesto representa la salificación de los cuerpos receptores (suelo, y agua) (Mijaylova Nacheva y col., 2011) y (Joseph, 2023). Implementar sistemas de</p>

No.	Alcances	Técnica	Hallazgos	Discusión
			energía para su crecimiento.	tratamiento como la nanobiotecnología favorecería la desmineralización de este compuesto.
4	Identificación bacteriana	API 20E MALDI-TOF TEM	Mediante la Galería API20E se detectó con un 98 % de ID la especie <i>Acinetobacter baumannii/calcoaceuticus</i> . Se comprobó por MALDITOF, a través de un perfil proteico como <i>Acinetobacter baumannii</i> único para cada especie. Así mismo, en TEM se observaron agrupados en forma de cocobacilos y diplococos y tamaños de células de 1.270 y 0.738 μm , de largo y ancho.	Se han reportado aislamientos en aguas costeras de cepas bacterianas de los géneros <i>Bacillus</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Marinomonas</i> , <i>Kurthia</i> y <i>Azothobacter</i> , identificadas como hidrocarbonoclastas (Rodríguez-Uribe y col., 2021) y (Wang y col., 2021)
5	Producción y caracterización de biotensioactivo	Fermentación ácida CCF FT-IR Tensión superficial	En la CCF, según el valor rf: 0,56-0,77 del estándar de referencia, se atribuyó a La migración de los aminoácidos, presentes en el biotensioactivo. Esto se comprobó mediante FT IR, donde la banda a 1629 cm^{-1} fue asociada con el estiramiento de los enlaces CO-N, revelando los grupos carboxilo y amida de los compuestos lipopéptidos. El estudio de la tensión superficial mostró una reducción de la tensión de $72,18\text{ mNm}^{-1}$ (agua) a $53,21\text{ mNm}^{-1}$.	Estudios anteriores de la <i>Acinetobacter</i> , han reportado como productora de biotensioactivos tipo lipopolisacárido (emulsan), además de sintetizar fosfolípidos (Ahmad y col., 2018).
6	Sistema nanobiocatalítico	Micro-encapsulados	Se inmovilizaron cepas puras de <i>Acinetobacter baumannii</i> en un polímero natural de alginato de sodio funcionalizado con NP de ZnO, favoreciendo el 93 % de la degradación	NP ZnO dopadas con Ni y Gadolinio protegidas con hexametáfosfato de sodio mostraron un 94% de la degradación

No.	Alcances	Técnica	Hallazgos	Discusión
			de HCs en el agua emulsionada.	fotocatalítica del azul de metileno. (Mageswari y col., 2025)
7	Caracterización de cápsulas	SEM	<p>Las cápsulas (AZnO) presentaron una morfología de textura rugosa con ramificaciones atribuidas a las cadenas de alginato con iones zinc. Su composición elemental presentó en mayor proporción elementos como: carbono con 49.89 % de peso seco, oxígeno 37.55 %, sodio 5.29 %. Además de tamaños de células adheridas a la matriz de ~0.542 y ~0.60 μm de ancho y largo, respectivamente.</p>	<p>Azeez, y col. (2022), reportaron a la <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inmovilizada en NPs de Fe_3O_4, demostró una alta eficiencia en la adsorción de estos metales como plomo (Pb), cadmio (Cd) y níquel (Ni). Además, inmovilizaron <i>Bacillus subtilis</i> en NPs superparamagnéticas Fe_3O_4 logrando una decoloración de hasta un 95% colorantes azoicos y otros contaminantes orgánicos en 24 h.</p>
8	Biorremediación del agua emulsionada con hidrocarburos	UV-vis Cuantificación (UFC/mL)	<p>Mediante el análisis UV vis, se observó una disminución de la absorbancia al (tiempo 5), lo que se asume que el sistema nanobiocatalítico favoreció al proceso de degradación del hidrocarburo en un 89.4 %, con una población de $30 \times 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$</p>	<p>Las NPs debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas son utilizadas como nanobiocatalizadores en el biosorción de contaminantes de aguas residuales. Un aumento en la concentración de ZnO puede llevar a una disminución en la descomposición de compuestos orgánicos. (Azees y col., 2022)</p>

VI. Conclusiones

En esta investigación se evaluaron tres métodos de síntesis: sol gel, precipitación y mecanoquímica para la obtención de polvos de óxido de zinc (ZnO). Estas fueron caracterizadas mediante DRX, FTIR, SEM, Fisisorción de N₂, obteniendo nanopartículas de ZnO con tamaño de cristalito menor a ≈ 37 nm y un alto porcentaje de pureza. Así también, el ZnO presentó una intensa banda centrada en 372.1941 cm^{-1} asociada al modo de estiramiento del enlace Zn-O, en los materiales que fueron sometidos a tratamiento térmico. Por otro lado, se aisló una bacteria de la especie *Acinetobacter baumannii*, identificada mediante pruebas fenotípicas (Tinción de Gram, API20E), Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y Espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight), así también evaluada mediante bioensayos de capacidad degradadora de HC, y condiciones de pH, temperatura y salinidad óptimas para su crecimiento. Como resultados de los análisis, se identificó como una cepa bacteriana *Acinetobacter baumannii*, con capacidad de degradar hidrocarburos, capacidad para adaptarse a condiciones de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, en un medio con pH 9 y a concentración salina del 15 % de NaCl, condiciones que favorecieron el comportamiento de la cinética de crecimiento de la *Acinetobacter baumannii*, lo cual obtuvo un valor máximo de DO = 1.082. Sus características morfológicas, el sustrato, las condiciones de pH, temperatura concentración salina, favorecieron la producción de biotensioactivo en la bacteria, metabolito considerado importante en la disminución de la tensión superficial del agua emulsionada con hidrocarburos. Por último, se realizaron pruebas de toxicidad mediante microdiscos impregnados con NPZnO (0.01 mgmL^{-1}) en cajas de cultivo de agar nutritivo y colonias de *Acinetobacter baumannii*, en el cual se pudo observar la proliferación de las colonias a las 24 h, considerándose como una prueba de biocompatibilidad positiva.

El sistema nanobiocatálítico se desarrolló a partir de una cepa pura de *Acinetobacter baumannii*, inmovilizada en alginato de sodio funcionalizado con nanopartículas de ZnO, donde se obtuvieron cápsulas de $\approx 1\text{-}2$ micra, estas fueron caracterizadas mediante SEM, las cuales presentaron una textura rugosa y ramificaciones poliméricas, atribuidas a las cadenas de alginato con iones zinc. Las cápsulas en su composición presentaron proporción de elementos como: carbono 49.89 %, oxígeno 37.55 %, sodio 5.29 %, cloro 4.61 % y otros elementos trazas. También, se

observaron los tamaños de las células de *Acinetobacter b.* adheridas a la matriz, con tamaños de ~ 0.542 y ~ 0.60 μm de ancho y largo, respectivamente.

En el proceso de biorremediación con el sistema nanobiocatalítico, las cápsulas de alginato con nanopartículas de Zn (AZn), presentaron una población bacteriana inicial de 30×10^3 UFC. Se observó una disminución significativa de la absorbancia con relación con la degradación de los HCs. Se asume que, el sistema nanobiocatalítico favoreció la degradación de hidrocarburos en el agua, hasta un 90 % (1.62 ppm), valor aceptable según la normatividad.

Esta investigación concluye que el método de síntesis de las nanopartículas de ZnO por mecanoquímica influyó en la distribución elemental, apariencia uniforme y área superficial, características que favorecieron la biocompatibilidad con la *Acinetobacter baumannii* y, la interacción con la superficie del polímero de alginato de sodio, mejorando la rigidez de las cápsulas e influyendo de manera significativa en la dinámica del proceso de biorremediación.

Recomendaciones y Perspectivas

- Evaluar otros modelos cinéticos microbianos que permita predecir y mejorar la eficiencia de la nanobiocatálisis del agua emulsionada.
- Evaluar otras técnicas de inmovilización como el crosslinking entre el biotensioactivo y el polímero funcionalizado con nanopartículas de ZnO.
- Evaluar sustratos a partir de desechos agroindustriales (bagazos) como fuentes de C, N₂ y P, para la producción de biotensioactivos a partir de *Acinetobacter baumannii* complex.
- Sintetizar y caracterizar ZnO nanoestructurado mediante síntesis verde, para aplicaciones biotecnológicas (nanopolvos a partir de pigmentos vegetales).
- Realizar un posdoctorado en nano y micro encapsulamiento de compuestos bioactivos en materiales nanoestructurados.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Referencias

- Acosta Murillo, R., & Castañón Baltazar, J. C. (2022). Las tendencias, perspectivas, áreas y colores de la biotecnología. *Revista Digital Universitaria*, 23(4).
<https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2022.23.4.10>
- Ahmad, A., & Reddy, S. S. (2019). Performance evaluation of upflow anaerobic sludge blanket reactor using immobilized ZnO nanoparticle enhanced continuous biogas production. *Energy & Environment*, 31(2), 330-347. <https://doi.org/10.1177/0958305X19865967>
- Ahmad, Z., Imran, M., Qadeer, S., Hussain, S., Dwason, L., & Azeem, K. (2018). Biosurfactants for Sustainable Soil Management. *Advances in Agronomy*, 150, 81-130.
<https://doi.org/10.1016/bs.agron.2018.02.002>
- Alexandri Rionda, R., Guerrero Gutiérrez, L. G., & Rodríguez Bolaños, F. (2016). *PROSPECTIVA DE PETROLEO CRUDO Y PETROLIFEROS 2016 - 2030*. Secretaria de Energía (SENER).
- Ali, N., Bilal, M., Khan, A., Ali, F., & Iqbal, H. M. (2020). Design, engineering and analytical perspectives of membrane materials with smart surfaces for efficient oil/water separation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 127, 115902.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.135391>
- Ambaye, T. G., Vaccari, M., Prasad, S., & Rtimi, S. (2021). Preparation, characterization and application of biosurfactant in various industries: A critical review on progress, challenges and perspectives. *Environmental Technology & Innovation*, 24, 102090.
<https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102090>
- API. (s.f.). *Estándares*. Obtenido de API: <https://www.api.org/products-and-services/es/standards>
- Arab, L., Amri, A., Meftah, A., Latif, A., Tibermacine, T., & Sengouga, N. (2023). Effect of the annealing process on the properties of ZnO thin films prepared by the sol-gel method. *Chemical Physics Impact*, 7, 100266. <https://doi.org/10.1016/j.chphi.2023.100266>
- Araújo, R. G., González González, R. B., Martínez Ruiz, M., Coronado Apodaca, K. G., Reyes Pardo, H., Morreeuw, Z. P., . . . Iqbal, H. M. (2022). Expanding the Scope of Nanobiocatalysis and Nanosensing: Applications of Nanomaterial Constructs. *ACS Omega*, 7(37), 32863-32876. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c03155>
- Arca-Ramos, A., Ammann, E. M., Gasser, C. A., Nastold, P., Eibes, G., Feijoo, G., . . . Corvini, P. F. (2016). Assessing the use of nanoimmobilized laccases to remove micropollutants from wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(4), 3217-3228.
<https://doi.org/10.1007/s11356-015-5564-6>
- Arguijo Portillo, N. V., Guerrero Peña, A., Domínguez Rodríguez, V. I., Carrillo Ávila, E., & Zavala Cruz, J. (2019). Calibration models for the spectrophotometric quantification of

- total oil hydrocarbons in soil. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 65(2), 469-479.
- ASTM International. (2007). ASTM D 88-94. Método Estándar de Prueba para la viscosidad Saybolt. *Encyclopedic Dictionary of Polymers*, 5, 860.
- ASTM International. (2024). Obtenido de Standards Products: <https://store.astm.org/products-services/standards-and-publications/standards.html>
- Ayilara, M. S., & Babalola, O. O. (2023). Bioremediation of environmental wastes: the role of microorganisms. *Frontiers in Agronomy*, 5, 1-15.
<https://doi.org/doi.org/10.3389/fagro.2023.1183691>
- Azees, R. A., Hasan, M. M., Alawi, N. M., & Nyugen, H. M. (2022). A review study of immobilized microbial-nanoparticles: Techniques and biotechnology applications. *Iraqi Journal of Oil and Gas Research*, 2(2), 87-101. <https://doi.org/10.55699/ijogr.2022.0202.1030>
- Aziz, A., Ali, N., Khan, A., Bilal, M., Malik, S., Ali, N., & Khan, H. (2020). Chitosan-zinc sulfide nanoparticles, characterization and their photocatalytic degradation efficiency for azo dyes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 502-512.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.310>
- Barragán R., R. M., Portugal M., E., Arellano G., V. M., Martínez A., A. E., & Ascencio C., F. (2001). Modelación química de aguas de formación del Activo Luna, Tabasco. *Boletín IIE*, 24(4), 180-184.
- Barrios-San Martín, Y., Acosta, S., Sánchez, A., Toledo, A., González, F., & García, R. M. (2012). Estudio y selección de bacterias aerobias degradadoras. *Biotecnología Aplicada*, 29(2), 73-79.
- Barry Carter, C., & Grant Norton, M. (2007). *Ceramic Materials: Science and Engineering*. Springer.
- Barry Carter, C., & Grant Norton, M. (2013). *Ceramic materials: Science and Engineering Second Edition*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3523-5>
- Bebić, J., Banjanac, K., Ćorović, M., Milivojević, A., Simović, M., Marinković, A., & Bezbradica, D. (2020). Immobilization of laccase from *Myceliophthora thermophila* on functionalized silica nanoparticles: Optimization and application in lindane degradation. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 28(4), 1136-1144.
<https://doi.org/10.1016/j.cjche.2019.12.025>
- Becerra, L., & Horna, M. (2016). Isolation of biosurfactant producing microorganisms and lipases from wastewaters from slaughterhouses and soils contaminated with hydrocarbons. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 23-31.
<https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.01.03>
- Bedoya Vélez, J. M., Castaño, G., & Ochoa, S. (2019). Tolerancia al plomo de aislamientos nativos de *Pseudomonas* spp. de aguas residuales del Valle de Aburrá. *Revista*

- Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 135-143.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.65146>
- Bielicka, M., Lubecka, M., Wasilewska, A., Klekotka, U., & Kalska-Szostko, B. (2025). Optimization of measurement conditions in SEM microscopy – a case study. *Measurement*, 253(B), 117513. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2025.117513>
- Biswas, J. K., & Rai, M. (2024). *Nanotechnology for environmental management*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003350941>
- Bolívar Zapata, F. (2002). *Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI: Retos y Oportunidades*. CONACYT, Fondo de Cultura Económica.
- Cadena Castro, D. F., García, M. C., & Uberman, P. M. (2018). Nanomateriales híbridos para aplicaciones biomédicas (Hybrid nanomaterials for biomedical applications). *Bitacora digital*, 1(9).
- Chavez-Hernández, J. A., Velarde-Salcedo, A. J., Navarro-Tovar, G., & Gonzalez, C. (2024). Safe nanomaterials: From their use, application, and disposal to regulations. *Nanoscale Adv.*, 6, 1583-1610. <https://doi.org/10.1039/D3NA01097J>
- Cortés, M. E. (2023). The long history of the DNA molecule: Seventy years later. *Andres Pediatr.*, 94(4), 421-424. <https://doi.org/10.32641/andespediatr.v94i4.4814>
- Dangi, A. K., Sharma, B., Hill, R. T., & Shukla, P. (2019). Bioremediation through microbes: systems biology and metabolic engineering approach. *Critical reviews in biotechnology*, 39(1), 79-98. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1500997>
- Dey, S., Mohanty, D. I., Divya, N., Bakshi, V., Mohanty, A., Rath, D., . . . Sabui, R. (2025). A critical review on zinc oxide nanoparticles: Synthesis, properties and biomedical applications. *Intelligent Pharmacy*, 3(1), 53-70. <https://doi.org/10.1016/j.ipha.2024.08.004>
- Di Lorenzo, F., Billod, J.-M., Martin-Santamaría, S., Silipo, A., & Molinaro, A. (2017). Gram-Negative Extremophile Lipopolysaccharides: Promising Source of Inspiration for a New Generation of Endotoxin Antagonists. *European Journal of Organic Chemistry*, 2017(28), 4055-4073. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700919>
- Diario Oficial de la Federación. (3 de Marzo de 2005). Obtenido de Diario Oficial de la Federación:
https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=789183&fecha=03/03/2005#gsc.tab=0
- Díaz Ortíz, D. (2019). *Efectos ambientales de los hidrocarburos. Una revisión*. Universidad Santiago de Cali.
- Drews, A. W. (1998). *Manual on Hydrocarbon Analysis: 6th Edition*. ASTM. [https://doi.org/10-8031-2080-X](https://doi.org/10.8031-2080-X)

- Farias, B., C. B., Almeida, F. C., Silva, I. A., Souza, T. C., Meira, H. M., . . . Sarubbo, L. A. (2021). Production of green surfactants: Market prospects. *Electronic Journal of Biotechnology*, 51, 28-39. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.02.002>
- Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N. G., Poggi-Varaldo, H. M., Alarcón, A., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 179-187.
- Galimzyanov, B. N., Doronina, M. A., & Mokshin, A. V. (2025). Unified scaling model for viscosity of crude oil over extended temperature range. *Fuel*, 379, 133018. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2024.133018>
- García-Sanz, C., Guijarro, L., Pawlyta, M., & Palomo, J. M. (2024). Mechanochemical synthesis of Zn-bionanohybrids: size effect at the nanoscale to improve their enzyme-like activity. *RSC Mechanochemistry*, 1(3), 219-227. <https://doi.org/10.1039/d4mr00019f>
- Gaur, V. K., Sharma, P., Gupta, S., Varjani, S., Srivastava, J. K., Wong, J. W., & Ngo, H. H. (2022). Opportunities and challenges in omics approaches for biosurfactant production and feasibility of site remediation: Strategies and advancements. *Environmental Technology & Innovation*, 25, 102132. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102132>
- Gökırmak Söğüt, E., & Gülcan, M. (2023). Chapter 1 - Adsorption: basics, properties, and classification. *Adsorption through Advanced Nanoscale Materials*, 3-21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18456-7.00001-8>
- Hernández Rivera, M. A., Ojeda Morales, U. M., & Martínez Morales, A. (2020). Recuperación Mejorada de Petróleo Asistida por Microorganismos con Capacidad de Sintetizar Biosurfactantes. *Journal of Basic Sciences*, 5(15). <https://doi.org/10.19136/jobs.a5n15.3569>
- Hernández-Reyes, A., Araceli, M., Garrido-Hernández, A., Reyes-Miranda, J., & Carrillo-Rangel, A. (2020). Caracterización de polvos de Cu y ZnO embebidos en una matriz de SiO₂. *Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 8(Especial). <https://doi.org/10.29057/icbi.v8iEspecial.6359>
- Jain, P., Minhas, A. K., Kaur, P., Manna, P. K., Puri, M., Barrow, C. J., & Mandal, S. (2024). Silica nanobiocatalyst: Advancements toward sustainable and innovative applications. *Next Nanotechnology*, 6, 100068. <https://doi.org/10.1016/j.nxnano.2024.100068>
- Joseph, A. (2023). Extremophiles—Organisms that survive and thrive in extreme environmental conditions. En A. Joseph, *Water Worlds in the Solar System* (págs. 201-254). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95717-5.00009-8>
- Kashtiaray, A., Khadir, A., Ardestani, A. N., & Salehpour, N. (2021). Biosurfactants for the Bioremediation of Polluted Environments. *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*, 395-417. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822696-4.00015-2>

- Khan, A. H., Tanveer, S., Alia, S., Anees, M., Sultan, A., Iqbal, M., & Yousaf, S. (2017). Role of nutrients in bacterial biosurfactant production and effect of biosurfactant production on petroleum hydrocarbon biodegradation. *Ecological Engineering*, 104(A), 158-164. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.04.023>
- Kulkarni, S. K. (2015). *Nanotechnology: Principles and Practices*. Springer.
- Kulkarni, S. K. (2015). Synthesis of Nanomaterials—I (Physical Methods). *Nanotechnology: Principles and Practices*, 55-76. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09171-6_3
- Kumar, P. S., Pavithra, K. G., & Naushad, M. (2019). Characterization techniques for nanomaterials. *Nanomaterials for Solar Cell Applications*, 97-124. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813337-8.00004-7>
- Lara-Severino, R. d., Gómez Olivan, L. M., Sandoval Trujillo, Á. H., Isaac-Olive, K., & Ramírez-Durán, N. (2017). BÚSQUEDA DE CAPACIDAD PRODUCTORA DE BIOSURFACTANTES EN ACTINOBACTERIAS HALOALCALÓFILAS Y HALOALCALOTOLERANTES. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(3), 529-539. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.03.15>
- Lin, P.-C., Lin, S., Wang, P. C., & Sridhar, R. (2014). Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances*, 32(4), 711-726. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.006>
- Lutomia, D., Poria, R., Kala, D., Garg, P., Nagraik, R., Kaushal, A., . . . Kumar, D. (2025). 2D nanomaterials in biosensing: Synthesis, characterization, integration in biosensors and their applications. *Biosensors and Bioelectronics: X*, 24, 100615. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2025.100615>
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2019). *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Biología de los microorganismos*. PEARSON. <https://doi.org/9788490352909>
- Mageswari, K., Bavani, T., Madhavan, J., & Prabukanthan, P. (2025). Enhancement of photocatalytic and antimicrobial properties of SHMP-capped with Ni and Gd-doped zinc oxide nanoparticles. *Hybrid Advances*, 8, 100377. <https://doi.org/10.1016/j.hybadv.2025.100377>
- Malebadi, K. A., Seheri, N. H., Ojelere, O., & Onwudiwe, D. C. (2024). ZnO nanoparticles modified with g-C3N4: Optical and structural properties. *Materials Science and Engineering: B*, 310, 117676. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2024.117676>
- Martínez Vázquez, J. G., Hernández Rivera, M. á., Ojeda Morales, M. E., & García Marín, M. J. (2011). Condiciones ambientales y de nutrientes óptimos para el desarrollo del microorganismo hidrocarbonoclasta *Penicillium sp.* in vitro. *Akadèmeia*, 9(1), 97-112. <https://doi.org/20.500.12743/1326>

- Martinez, D. S., Faria, A. F., Berni, E., Souza Filho, A. G., Almeida, G., Caloto-Oliveira, A., . . . Alves, O. L. (2014). Exploring the use of biosurfactants from *Bacillus subtilis* in bionanotechnology: A potential dispersing agent for carbon nanotube ecotoxicological studies. *Process Biochemistry*, 49(7), 1162-1168. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.04.006>
- Mijaylova Nacheva, P., Birkle, P., Ramírez Camperos, E., & Sandoval Yoal, L. (2011). *Tratamiento de aguas de la desalación del petróleo para su aprovechamiento en inyección al subsuelo*. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- Modena, M. M., Rühle, B., Burg, T., & Wuttke, S. (2019). Nanoparticle Characterization: What to Measure? *Advanced Materials*, 31(32). <https://doi.org/10.1002/adma.201901556>
- Montiel Garza, M. (2019). Metodología para la caracterización del agua de formación en pozos de gas en aguas profundas. *Ingeniería Petrolera*, 59(3), 183-199.
- Moscoso-Baeza, D., & de Escobar-Fernández, A. M. (2022). Impacto económico de la Refinería Olmeca en el municipio de Paraíso , Tabasco. *Revista de Investigaciones Universidad del Quindío*, 34(S5), 98-108. <https://doi.org/10.33975/riuq.vol34nS5.1086>
- Murguía, B., Medina, A., Borjas, S., Barriga Castro, E. D., & Aguilar, C. (2022). Organic Template-Free Synthesis of Mesoporous ZnO Microparticles by Sol-Gel Method and Low-Temperature Hydrothermal Treatment. *Journal of Nanomaterials*, 2022(19), 1-8. <https://doi.org/10.1155/2022/7155557>
- Nematian, T., Salehi, Z., & Shakeri, A. (2020). Conversion of bio-oil extracted from *Chlorella vulgaris* micro algae to biodiesel via modified superparamagnetic nano-biocatalyst. *Renewable Energy*, 146, 1796-1804. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.048>
- Nunes, D., Pimentel, A., Santos, L., Barquinha, P., Pereira, L., Fortunato, E., & Martins, R. (2019). Structural, optical, and electronic properties of metal oxide nanostructures. En D. Nunes, A. Pimentel, L. Santos, P. Barquinha, L. Pereira, E. Fortunato, & R. Martins, *Metal Oxide Nanostructures* (Primera ed., págs. 59-102). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811512-1.00003-5>
- OECD. (2011). *Future prospects for industrial biotechnology*. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264126633-en>
- OECD. (2016). Foreword. *OECD Science, Technology and Innovation Outlook*. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1787/sti_in_outlook-2016-1-en
- Oliart-Ros, R. M., Manresa-Presas, Á., & Sanchez-Otero, M. G. (2016). Utilization of microorganisms from extreme environments and their products in biotechnological development. *CienciaUAT*, 11(1), 79-90.
- Oliva Arias, A. I. (2005). Nuevas propiedades físicas de materiales nanoestructurados. *Revista Ingeniería*, 9(3), 39-46.

- Orellana, R., Cumsille, A., Piña-Gangas, P., Rojas, C., Arancibia, A., Donghi, S., . . . Seeger, M. (2022). Economic Evaluation of Bioremediation of Hydrocarbon-Contaminated Urban Soils in Chile. *Sustainability*, 14(19). <https://doi.org/10.3390/su141911854>
- Panatula, N., Guntuku, G., Palla, M. S., Kumar Muthyala, M. K., Meka, M., & Reddy, D. J. (2024). Isolation, Screening and Identification of Biosurfactant Producing Strain *Nocardopsis dassonvillei* var B2 From Oil Contaminated Soil. *Journal of Basic Microbiology*, 64(12), e2400504. <https://doi.org/10.1002/jobm.202400504>
- Paraguay-Delgado, F. (2020). Técnicas de microscopía electrónica usadas en el estudio de nanopartículas. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias Y Nanotecnología*, 13(25), 101-131. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2020.25.69626>
- Patil, R. M., Deshpande, P. P., Aalhate, M., Gananadhamu, S., & Singh, P. K. (2022). An Update on Sophisticated and Advanced Analytical Tools for Surface Characterization of Nanoparticles. *Surfaces and Interfaces*, 33, 102165. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2022.102165>
- Pérez Muñoz, Y., López Martínez, S., Rodríguez Luna, A. R., & Ramos Arcos, S. A. (2020). Evaluación de impacto socioambiental, por derrame de petróleo de un ducto en Comalcalco, Tabasco. *Journal of Basic Sciences*, 5(15), 134-152. <https://doi.org/10.19136/jobs.a5n15.3574>
- Pérez Taborda, J. A., Gallego, J. L., Stiven Roman, W., & Riascos Landázuri, H. (2008). Películas nanoestructuradas de óxido de zinc (ZnO). *Scientia et Technica*, XIV(39), 416-421.
- Pérez Vidal, A., & Leyton Franco, M. d. (2020). *Tecnologías para biorremediación de suelos y aguas contaminados con hidrocarburos Technologies for bioremediation of soils and water contaminated with hydrocarbons*. Universidad Santiago de Cali.
- Prabhu, Y. T., Rao, K. V., Sai Kumar, V. S., & Kumari, B. S. (2014). X-Ray Analysis by Williamson-Hall and Size-Strain Plot Methods of ZnO Nanoparticles with Fuel Variation. *World Journal of Nano Science and Engineering*, 4(1), 21-28. <https://doi.org/10.4236/wjnse.2014.41004>
- Pulster, E. L., Gracia, A., Armenteros, M., Gerado Toro-Farmer, S. M., Brigid E, C., Schwaab, M. R., . . . Murawski, S. A. (2020). A First Comprehensive Baseline of Hydrocarbon Pollution in Gulf of Mexico Fishes. *Scientific Reports*, 10(6437). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62944-6>
- Rao, A. S., Nair, A., More, V. S., Anantharaju, K. S., & More, S. s. (2022). Extremophiles for sustainable agriculture. En S. H. Bahadur, & A. Vaishnav, *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Sustainable Agriculture: Advances in Microbe-based Biostimulants* (págs. 243-264). ELSEVIER. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85577-8.00021-4>

- Reshmy, R., Philip, E., Sirohi, R., Tarafdar, A., Arun, K., Madhavan, A., . . . Sindhu, R. (2021). Nanobiocatalysts: Advancements and applications in enzyme technology. *Bioresource Technology*, 337, 125491. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125491>
- Reyes Reyes, M. A. (2018). Immobilization of potentially crude oil degrading bacteria in synthetic and natural organic matrices. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 34(4), 597-609. <https://doi.org/10.20937/rica.2018.34.04.04>
- Rodríguez-Uribe, M. L., Peña-Cabriales, J. J., Rivera-Cruz, M. d., & Délano-Frier, j. P. (2021). Native bacteria isolated from weathered petroleum oil-contaminated soils in Tabasco, Mexico, accelerate the degradation of petroleum hydrocarbons in saline soil microcosms. *Environmental Technology & Innovation. Environmental Technology & Innovation*, 23, 101881. <https://doi.org/10.1019/j.eti.2021.101781>
- Rostro-Alanis, Jesús, M. d., Mañera-Andrade, E. I., Gómez Patiño, M. B., Arrieta-Baez, D., Cardenas, B., . . . Parra Saldívar, R. (2016). Nanobiocatalysis: Nanostructured materials – a minireview. *Biocatalysis*, 2(1), 1-24. <https://doi.org/10.1515/boca-2016-0001>
- Sadeghi, A., Ebrahimi, M., Shahryari, S., Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2024). Potential applications of encapsulated yeasts especially within alginate and chitosan as smart bioreactors and intelligent micro-machines. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 7, 100513. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2024.100513>
- Sakamoto, S., Nobu, M. K., Mayumi, D., Tamazawa, S., Kusada, H., Yonebayashi, H., . . . Tamaki, H. (2021). *Koleobacter methoxysyntrophicus* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic bacterium isolated from deep subsurface oil field and proposal of *Koleobacteraceae* fam. nov. and *Koleobacterales* ord. nov. within the class *Clostridia* of the phylum *Firmicutes*. *Systematic and Applied Microbiology*, 44(1), 126154. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126154>
- Salahuddin, N. A., El-Kemary, M., & Ibrahim, E. M. (2015). Synthesis and Characterization of ZnO Nanoparticles via Precipitation Method: Effect of Annealing Temperature on Particle Size. *Nanoscience and Nanotechnology*, 5(4), 82-88. <https://doi.org/10.5923/j.nn.20150504.02>
- Salem, S. S. (2023). A mini review on green nanotechnology and its developments in biological effects. *Archives of Microbiology*, 205, 128. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03467-2>
- Servicio Geológico Mexicano. (22 de Marzo de 2017). *Características del petróleo*. Obtenido de Gobierno de México: https://www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/Aplicaciones_geologicas/Caracteristicas-del-petroleo.html
- Sharma, D. K., Shukla, S., Sharma, K. K., & Kumar, V. (2022). A review on ZnO: Fundamental properties and applications. *Materials Today: Proceedings*, 49(8), 3028-3035. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.10.238>

- Silva-Torres, O., Bojorquez-Vazquez, L., Simakov, A., & Vazquez-Duhalt, R. (2019). Enhanced laccase activity of biocatalytic hybrid copper hydroxide nanocages. *Enzyme and Microbial Technology*, 128, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.05.008>
- Singh, J., Juneja, S., Palsaniya, S., Manna, A. K., Soni, R. K., & Bhattacharya, J. (2019). Evidence of oxygen defects mediated enhanced photocatalytic and antibacterial performance of ZnO nanorods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 184, 110541. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110541>
- Teklit Gebregiorgis, A., Vaccari, M., Franzetti, A., Prasad, S., Formicola, F., Rosatelli, A., . . . Rtimi, S. (2023). Microbial electrochemical bioremediation of petroleum hydrocarbons (PHCs) pollution: Recent advances and outlook. *Chemical Engineering Journal*, 452, part 3(139372). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.139372>
- Thermo Fisher Scientific. (s.f.). *Aplicaciones del espectrofotómetro UV-Vis*. Obtenido de Thermo Fisher: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/uv-vis-spectrophotometry/applications.html>
- Thommes, M., Kaneko, K., Neimark, A. V., Oliver, J. P., Rodiguez-Reinoso, F., Rouquerol, J., & Sing, K. S. (2014). Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 87(9-10), 1051-1069. <https://doi.org/10.1515/pac-2014-1117>
- Torres-Custodio, R., Hernández-Rivera, M. Á., López-Lázaro, J. d., Córdova-Bautista, Y., Álvarez-Ramírez, J. G., Sifuentes-Gallardo, P., & Ojeda-Morales, M. E. (2023). Extraction and characterization of a biosurfactant synthesized by *Acinetobacter baumannii*. *Mexican Journal of Biotechnology*, 8(1), 37-65. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2023.8.1.37>
- Torres-Gomez, N., Avila-Aviles, R. D., & Vilchis-Nestor, A. R. (2020). Biosynthesis and characterization of nanostructures by electron microscopy. *Mundo Nano*, 13(25), 29-43. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2020.25.69637>
- Uribe-López, M. C., Hidalgo-López, M. C., López-González, R., Frías-Márquez, D. M., Núñez-Nogueira, G., Hernández-Castillo, D., & Alvarez-Lemus, M. A. (2021). Photocatalytic activity of ZnO nanoparticles and the role of the synthesis method on their physical and chemical properties. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 404, 112866. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112866>
- Vaidya, S., Jain, K., & Madamwar, D. (2017). Metabolism of pyrene through phthalic acid pathway by enriched bacterial consortium composed of *Pseudomonas*, *Burkholderia*, and *Rhodococcus* (PBR). *3 Biotech*, 7(29). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0598-8>
- Varela, G. (2008). *Fisiología y metabolismo bacteriano*.
- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277-286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>

- Varma, S. S., Wasnik, D. D., & M., T. P. (2017). Production and characterization of biosurfactant by bacillus subtilis isolated from soil samples. *International Journal of Development Research*, 7(8), 14857-14864.
- Vazquez Olmos, A. R., Vega Jimenez, A. L., & Paz Díaz, B. (2018). Mecanosíntesis y efecto antimicrobiano de óxidos metálicos nanoestructurados. *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, 11(21), 29-44. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2018.21.62545>.
- Vazquez-Duhalt, R. (2015). Nanotecnología en procesos ambientales y remediación de la contaminación. *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, 8(14), 70-80. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2015.14.52514>
- Vignesh, K., Nair, A. S., Udhayakeerthana, C., & Kalaivani, T. (2022). Synthesis and characterization ZnO nanoparticles using sol-gel method and their antibacterial study. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1219(1), 012019. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/1219/1/012019>
- Wade, L. G. (2004). *Química Orgánica*. PEARSON EDUCACIÓN. <https://doi.org/84-205-4102-8>
- Walsole, N. E. (2013). Cerámicos Nanoestructurados. Síntesis, caracterización y aplicaciones. *Revista SAM*, 3, 16-35.
- Wang, P. (2006). Nanoscale biocatalyst systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(6), 574-579. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.10.009>
- Wang, Y., Guo, Y., Zhang, L., Yang, Y., Yang, S., Yang, L., . . . Xie, G. (2021). Integration of multiplex PCR and CRISPR-Cas allows highly specific detection of multidrug-resistant *Acinetobacter Baumannii*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 334, 129600. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129600>
- Xiao, M., Sun, H., Meng, Y., & Zhu, F. (2024). Advances of in situ transmission electron microscopy research on gas phase catalyst particles. *Catalysis Science & Technology*, 14(8), 2040-2063. <https://doi.org/10.1039/d3cy01600e>
- Yousuf, J., Thajudeen, J., P. A., A., Josehp, A., P. S., D., Varghese, A., & A.A., M. H. (2020). Diversity and activity of culturable nitrogen fixing heterotrophic bacteria from estuarine and coastal environments of Southeastern Arabian Sea (SEAS). *Regional Studies in Marine Science*, 33, 100973. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100973>
- Zhao, Z., & Wong, J. (2009). Biosurfactants from *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 enhance the solubility and biodegradation of phenanthrene. *Environmental Technology*, 30(3), 291-299.
- Zhou, H., Huang, X., Liang, Y., Li, Y., Xie, Q., Zhang, C., & You, S. (2020). Enhanced bioremediation of hydraulic fracturing flowback and produced water using an indigenous biosurfactant-producing bacteria *Acinetobacter* sp. Y2. *Chemical Engineering Journal*, 397, 125348. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125348>

Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional	
Título de la Tesis:	Inmovilización de Bacterias Petrofílicas Productoras de Biotensioactivos en ZnO Nanoestructurado para la Biorremediación de Aguas Emulsionadas
Autor de la Tesis:	Cecilia del Carmen Díaz Reyes
ORCID:	0009-0006-0059-5325
Resumen de la Tesis:	<p>En la actualidad, la nanobiotecnología, ha permitido avances significativos en la remediación de contaminantes. En esta Tesis, se presenta la síntesis de nanopartículas de ZnO obtenidas por mecanoquímica, las cuales mostraron intensidad en el plano (101) típicas al ZnO y tamaños de cristal de 21.08 nm, superficies cuasi esféricas aglomeradas, con distribución de tamaño reducido y diámetros de ~111 nm. Además, de una energía dispersiva, asociada al Zn (1.0118 keV transición 1α) y al O (0.5249 keV transición $k\alpha$), una composición predominante de zinc ($\approx 75-79$ % masa) y menor concentración de oxígeno ($\approx 18-22$ % masa). También, se obtuvieron isoterms con bucle de histéresis estrecho, tamaños de poros de 32 nm y superficie de 41.36 m² g⁻¹. Por otro lado, se aisló una <i>Acinetobacter baumannii</i> complex con características extremotolerantes, evaluadas en medio líquido a pH 5, temperatura de 70 °C y salinidad del 30 %, y una población de 0.44, 0.74 y 0.77 DO600nm, respectivamente. También, se obtuvo un biotensioactivo de la bacteria, de tipo lipopéptido asociado a sus grupos O=C-N, C-N. La bacteria presentó capacidad de metabolizar HCs, en un suelo contaminado con una eficiencia de 42.35 %.</p> <p>Finalmente, se desarrolló un sistema nanobiocatalítico, basado en la inmovilización de la <i>Acinetobacter b.</i> en alginato con NPs ZnO. Se obtuvieron capsulas de 1 a 2 μm, con bacterias de ~0.542 y ~0.60 μm de ancho y largo, una composición mayor basada en carbono de 49.89 %, oxígeno 37.55 %, sodio 5.29 %. Se cuantificó una población de 30000 UFCgr-1 de cápsulas. Con base en, lo anterior se realizó la biorremediación de un agua emulsionada a través del sistema nanobiocatalítico, con una eficiencia de 98.94 %. El sistema, promovió la interacción y aumentó la biodisponibilidad del contaminante para su biodegradación. Por lo tanto, esta investigación sugiere una estrategia sustentable para la recuperación de ecosistemas.</p>
Palabras clave de la Tesis:	Biorremediación, <i>Acinetobacter</i> , MALDI-TOF, biotensioactivo, microcápsulas.
Referencias citadas:	<p>Acosta Murillo, R., & Castañon Baltazar, J. C. (2022). Las tendencias, perspectivas, áreas y colores de la biotecnología. <i>Revista Digital Universitaria</i>, 23(4). https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2022.23.4.10</p> <p>Ahmad, A., & Reddy, S. S. (2019). Performance evaluation of upflow anaerobic sludge blanket reactor using immobilized ZnO nanoparticle enhanced continuous biogas production. <i>Energy & Environment</i>, 31(2), 330-347. https://doi.org/10.1177/0958305X19865967</p> <p>Ahmad, Z., Imran, M., Qadeer, S., Hussain, S., Dwason, L., & Azeem, K. (2018). Biosurfactants for Sustainable Soil Management. <i>Advances in Agronomy</i>, 150, 81-130. https://doi.org/10.1016/bs.agron.2018.02.002</p>

- Alexandri Rionda, R., Guerrero Gutiérrez, L. G., & Rodríguez Bolaños, F. (2016). *PROSPECTIVA DE PETROLEO CRUDO Y PETROLIFEROS 2016 - 2030*. Secretaria de Energía (SENER).
- Ali, N., Bilal, M., Khan, A., Ali, F., & Iqbal, H. M. (2020). Design, engineering and analytical perspectives of membrane materials with smart surfaces for efficient oil/water separation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 127, 115902. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.135391>
- Ambaye, T. G., Vaccari, M., Prasad, S., & Rtimi, S. (2021). Preparation, characterization and application of biosurfactant in various industries: A critical review on progress, challenges and perspectives. *Environmental Technology & Innovation*, 24, 102090. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102090>
- API. (s.f.). *Estándares*. Obtenido de API: <https://www.api.org/products-and-services/es/standards>
- Arab, L., Amri, A., Meftah, A., Latif, A., Tibermacine, T., & Sengouga, N. (2023). Effect of the annealing process on the properties of ZnO thin films prepared by the sol-gel method. *Chemical Physics Impact*, 7, 100266. <https://doi.org/10.1016/j.chphi.2023.100266>
- Araújo, R. G., González González, R. B., Martínez Ruiz, M., Coronado Apodaca, K. G., Reyes Pardo, H., Morreeuw, Z. P., . . . Iqbal, H. M. (2022). Expanding the Scope of Nanobiocatalysis and Nanosensing: Applications of Nanomaterial Constructs. *ACS Omega*, 7(37), 32863-32876. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c03155>
- Arca-Ramos, A., Ammann, E. M., Gasser, C. A., Nastold, P., Eibes, G., Feijoo, G., . . . Corvini, P. F. (2016). Assessing the use of nanoimmobilized laccases to remove micropollutants from wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(4), 3217-3228. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5564-6>
- Arguijo Portillo, N. V., Guerrero Peña, A., Domínguez Rodríguez, V. I., Carrillo Ávila, E., & Zavala Cruz, J. (2019). Calibration models for the spectrophotometric quantification of total oil hydrocarbons in soil. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 65(2), 469-479.
- ASTM International. (2007). ASTM D 88-94. Método Estándar de Prueba para la viscosidad Saybolt. *Encyclopedic Dictionary of Polymers*, 5, 860.
- ASTM International. (2024). Obtenido de Standards Products: <https://store.astm.org/products-services/standards-and-publications/standards.html>
- Ayilara, M. S., & Babalola, O. O. (2023). Bioremediation of environmental wastes: the role of microorganisms. *Frontiers in Agronomy*, 5, 1-15. <https://doi.org/doi.org/10.3389/fagro.2023.1183691>
- Azees, R. A., Hasan, M. M., Alawi, N. M., & Nyugen, H. M. (2022). A review study of immobilized microbial-nanoparticles: Techniques and biotechnology applications. *Iraqi Journal of Oil and Gas Research*, 2(2), 87-101. <https://doi.org/10.55699/ijogr.2022.0202.1030>
- Aziz, A., Ali, N., Khan, A., Bilal, M., Malik, S., Ali, N., & Khan, H. (2020). Chitosan-zinc sulfide nanoparticles, characterization and their photocatalytic degradation efficiency for azo dyes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 502-512. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.310>
- Barragán R., R. M., Portugal M., E., Arellano G., V. M., Martínez A., A. E., & Ascencio C., F. (2001). Modelación química de aguas de formación del Activo Luna, Tabasco. *Boletín IIE*, 24(4), 180-184.
- Barrios-San Martín, Y., Acosta, S., Sánchez, A., Toledo, A., González, F., & García, R. M. (2012). Estudio y selección de bacterias aerobias degradadoras. *Biotechnología Aplicada*, 29(2), 73-79.

- Barry Carter, C., & Grant Norton, M. (2007). *Ceramic Materials: Science and Engineering*. Springer.
- Barry Carter, C., & Grant Norton, M. (2013). *Ceramic materials: Science and Engineering Second Edition*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3523-5>
- Bebić, J., Banjanac, K., Ćorović, M., Milivojević, A., Simović, M., Marinković, A., & Bezbradica, D. (2020). Immobilization of laccase from *Myceliophthora thermophila* on functionalized silica nanoparticles: Optimization and application in lindane degradation. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 28(4), 1136-1144. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2019.12.025>
- Becerra, L., & Horna, M. (2016). Isolation of biosurfactant producing microorganisms and lipases from wastewaters from slaughterhouses and soils contaminated with hydrocarbons. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 23-31. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.01.03>
- Bedoya Vélez, J. M., Castaño, G., & Ochoa, S. (2019). Tolerancia al plomo de aislamientos nativos de *Pseudomonas* spp. de aguas residuales del Valle de Aburrá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 135-143. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.65146>
- Bielicka, M., Lubecka, M., Wasilewska, A., Klekotka, U., & Kalska-Szostko, B. (2025). Optimization of measurement conditions in SEM microscopy – a case study. *Measurement*, 253(B), 117513. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2025.117513>
- Biswas, J. K., & Rai, M. (2024). *Nanotechnology for environmental management*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003350941>
- Bolívar Zapata, F. (2002). *Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI: Retos y Oportunidades*. CONACYT, Fondo de Cultura Económica.
- Cadena Castro, D. F., García, M. C., & Uberman, P. M. (2018). Nanomateriales híbridos para aplicaciones biomédicas (Hybrid nanomaterials for biomedical applications). *Bitacora digital*, 1(9).
- Chavez-Hernández, J. A., Velarde-Salcedo, A. J., Navarro-Tovar, G., & Gonzalez, C. (2024). Safe nanomaterials: From their use, application, and disposal to regulations. *Nanoescale Adv.*, 6, 1583-1610. <https://doi.org/10.1039/D3NA01097J>
- Cortés, M. E. (2023). The long history of the DNA molecule: Seventy years later. *Andres Pediatr.*, 94(4), 421-424. <https://doi.org/10.32641/andespediatr.v94i4.4814>
- Dangi, A. K., Sharma, B., Hill, R. T., & Shukla, P. (2019). Bioremediation through microbes: systems biology and metabolic engineering approach. *Critical reviews in biotechnology*, 39(1), 79-98. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1500997>
- Dey, S., Mohanty, D. I., Divya, N., Bakshi, V., Mohanty, A., Rath, D., . . . Sabui, R. (2025). A critical review on zinc oxide nanoparticles: Synthesis, properties and biomedical applications. *Intelligent Pharmacy*, 3(1), 53-70. <https://doi.org/10.1016/j.ipha.2024.08.004>
- Di Lorenzo, F., Billod, J.-M., Martin-Santamaría, S., Silipo, A., & Molinaro, A. (2017). Gram-Negative Extremophile Lipopolysaccharides: Promising Source of Inspiration for a New Generation of Endotoxin Antagonists. *European Journal of Organic Chemistry*, 2017(28), 4055-4073. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700919>
- Diario Oficial de la Federación. (3 de Marzo de 2005). Obtenido de Diario Oficial de la Federación: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=789183&fecha=03/03/2005#gsc.tab=0

- Díaz Ortíz, D. (2019). *Efectos ambientales de los hidrocarburos. Una revisión*. Universidad Santiago de Cali.
- Drews, A. W. (1998). *Manual on Hydrocarbon Analysis: 6th Edition*. ASTM. <https://doi.org/0-8031-2080-X>
- Farias, B., C. B., Almeida, F. C., Silva, I. A., Souza, T. C., Meira, H. M., . . . Sarubbo, L. A. (2021). Production of green surfactants: Market prospects. *Electronic Journal of Biotechnology*, 51, 28-39. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.02.002>
- Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N. G., Poggi-Varaldo, H. M., Alarcón, A., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 179-187.
- Galimzyanov, B. N., Doronina, M. A., & Mokshin, A. V. (2025). Unified scaling model for viscosity of crude oil over extended temperature range. *Fuel*, 379, 133018. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2024.133018>
- García-Sanz, C., Guijarro, L., Pawlyta, M., & Palomo, J. M. (2024). Mechanochemical synthesis of Zn-bionanohybrids: size effect at the nanoscale to improve their enzyme-like activity. *RSC Mechanochemistry*, 1(3), 219-227. <https://doi.org/10.1039/d4mr00019f>
- Gaur, V. K., Sharma, P., Gupta, S., Varjani, S., Srivastava, J. K., Wong, J. W., & Ngo, H. H. (2022). Opportunities and challenges in omics approaches for biosurfactant production and feasibility of site remediation: Strategies and advancements. *Environmental Technology & Innovation*, 25, 102132. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102132>
- Gökırmak Söğüt, E., & Gülcan, M. (2023). Chapter 1 - Adsorption: basics, properties, and classification. *Adsorption through Advanced Nanoscale Materials*, 3-21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18456-7.00001-8>
- Hernández Rivera, M. A., Ojeda Morales, U. M., & Martínez Morales, A. (2020). Recuperación Mejorada de Petróleo Asistida por Microorganismos con Capacidad de Sintetizar Biosurfactantes. *Journal of Basic Sciences*, 5(15). <https://doi.org/10.19136/jobs.a5n15.3569>
- Hernández-Reyes, A., Araceli, M., Garrido-Hernández, A., Reyes-Miranda, J., & Carrillo-Rangel, A. (2020). Caracterización de polvos de Cu y ZnO embebidos en una matriz de SiO₂. *Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 8(Especial). <https://doi.org/10.29057/icbi.v8iEspecial.6359>
- Jain, P., Minhas, A. K., Kaur, P., Manna, P. K., Puri, M., Barrow, C. J., & Mandal, S. (2024). Silica nanobiocatalyst: Advancements toward sustainable and innovative applications. *Next Nanotechnology*, 6, 100068. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.nxnano.2024.100068>
- Joseph, A. (2023). Extremophiles—Organisms that survive and thrive in extreme environmental conditions. En A. Joseph, *Water Worlds in the Solar System* (págs. 201-254). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95717-5.00009-8>
- Kashtiaray, A., Khadir, A., Ardestani, A. N., & Salehpour, N. (2021). Biosurfactants for the Bioremediation of Polluted Environments. *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*, 395-417. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822696-4.00015-2>
- Khan, A. H., Tanveer, S., Alia, S., Anees, M., Sultan, A., Iqbal, M., & Yousaf, S. (2017). Role of nutrients in bacterial biosurfactant production and effect of biosurfactant production on petroleum hydrocarbon biodegradation. *Ecological Engineering*, 104(A), 158-164. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.04.023>
- Kulkarni, S. K. (2015). *Nanotechnology: Principles and Practices*. Springer.

- Kulkarni, S. K. (2015). Synthesis of Nanomaterials—I (Physical Methods). *Nanotechnology: Principles and Practices*, 55-76. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09171-6_3
- Kumar, P. S., Pavithra, K. G., & Naushad, M. (2019). Characterization techniques for nanomaterials. *Nanomaterials for Solar Cell Applications*, 97-124. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813337-8.00004-7>
- Lara-Severino, R. d., Gómez Oliván, L. M., Sandoval Trujillo, Á. H., Isaac-Olive, K., & Ramírez-Durán, N. (2017). BÚSQUEDA DE CAPACIDAD PRODUCTORA DE BIOSURFACTANTES EN ACTINOBACTERIAS HALOALCALÓFILAS Y HALOALCALOTOLERANTES. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(3), 529-539. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.03.15>
- Lin, P.-C., Lin, S., Wang, P. C., & Sridhar, R. (2014). Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances*, 32(4), 711-726. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.006>
- Lutomia, D., Poria, R., Kala, D., Garg, P., Nagraik, R., Kaushal, A., . . . Kumar, D. (2025). 2D nanomaterials in biosensing: Synthesis, characterization, integration in biosensors and their applications. *Biosensors and Bioelectronics: X*, 24, 100615. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2025.100615>
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2019). *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Biología de los microorganismos*. PEARSON. <https://doi.org/9788490352909>
- Mageswari, K., Bavani, T., Madhavan, J., & Prabukanthan, P. (2025). Enhancement of photocatalytic and antimicrobial properties of SHMP-capped with Ni and Gd-doped zinc oxide nanoparticles. *Hybrid Advances*, 8, 100377. <https://doi.org/10.1016/j.hybadv.2025.100377>
- Malebadi, K. A., Seheri, N. H., Ojelere, O., & Onwudiwe, D. C. (2024). ZnO nanoparticles modified with g-C₃N₄: Optical and structural properties. *Materials Science and Engineering: B*, 310, 117676. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2024.117676>
- Martínez Vázquez, J. G., Hernández Rivera, M. á., Ojeda Morales, M. E., & García Marín, M. J. (2011). Condiciones ambientales y de nutrientes óptimos para el desarrollo del microorganismo hidrocarbonoclasta *Penicillium* sp. in vitro. *Akadèmeia*, 9(1), 97-112. <https://doi.org/20.500.12743/1326>
- Martinez, D. S., Faria, A. F., Berni, E., Souza Filho, A. G., Almeida, G., Caloto-Oliveira, A., . . . Alves, O. L. (2014). Exploring the use of biosurfactants from *Bacillus subtilis* in bionanotechnology: A potential dispersing agent for carbon nanotube ecotoxicological studies. *Process Biochemistry*, 49(7), 1162-1168. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.04.006>
- Mijaylova Nacheva, P., Birkle, P., Ramírez Camperos, E., & Sandoval Yoval, L. (2011). *Tratamiento de aguas de la desalación del petróleo para su aprovechamiento en inyección al subsuelo*. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- Modena, M. M., Rühle, B., Burg, T., & Wuttke, S. (2019). Nanoparticle Characterization: What to Measure? *Advanced Materials*, 31(32). <https://doi.org/10.1002/adma.201901556>
- Montiel Garza, M. (2019). Metodología para la caracterización del agua de formación en pozos de gas en aguas profundas. *Ingeniería Petrolera*, 59(3), 183-199.
- Moscoso-Baeza, D., & de Escobar-Fernández, A. M. (2022). Impacto económico de la Refinería Olmeca en el municipio de Paraíso, Tabasco. *Revista de Investigaciones Universidad del Quindío*, 34(S5), 98-108. <https://doi.org/10.33975/riuq.vol34nS5.1086>

- Murguía, B., Medina, A., Borjas, S., Barriga Castro, E. D., & Aguilar, C. (2022). Organic Template-Free Synthesis of Mesoporous ZnO Microparticles by Sol-Gel Method and Low-Temperature Hydrothermal Treatment. *Journal of Nanomaterials*, 2022(19), 1-8. <https://doi.org/10.1155/2022/7155557>
- Nematian, T., Salehi, Z., & Shakeri, A. (2020). Conversion of bio-oil extracted from *Chlorella vulgaris* micro algae to biodiesel via modified superparamagnetic nanobiocatalyst. *Renewable Energy*, 146, 1796-1804. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.048>
- Nunes, D., Pimentel, A., Santos, L., Barquinha, P., Pereira, L., Fortunato, E., & Martins, R. (2019). Structural, optical, and electronic properties of metal oxide nanostructures. En D. Nunes, A. Pimentel, L. Santos, P. Barquinha, L. Pereira, E. Fortunato, & R. Martins, *Metal Oxide Nanostructures* (Primera ed., págs. 59-102). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811512-1.00003-5>
- OECD. (2011). *Future prospects for industrial biotechnology*. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264126633-en>
- OECD. (2016). Foreword. *OECD Science, Technology and Innovation Outlook*. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1787/sti_in_outlook-2016-1-en
- Oliart-Ros, R. M., Manresa-Presas, A., & Sanchez-Otero, M. G. (2016). Utilization of microorganisms from extreme environments and their products in biotechnological development. *CienciaUAT*, 11(1), 79-90.
- Oliva Arias, A. I. (2005). Nuevas propiedades físicas de materiales nanoestructurados. *Revista Ingeniería*, 9(3), 39-46.
- Orellana, R., Cumsille, A., Piña-Gangas, P., Rojas, C., Arancibia, A., Donghi, S., . . . Seeger, M. (2022). Economic Evaluation of Bioremediation of Hydrocarbon-Contaminated Urban Soils in Chile. *Sustainability*, 14(19). <https://doi.org/10.3390/su141911854>
- Panatula, N., Guntuku, G., Palla, M. S., Kumar Muthyala, M. K., Meka, M., & Reddy, D. J. (2024). Isolation, Screening and Identification of Biosurfactant Producing Strain *Nocardiosis dassonvillei* var B2 From Oil Contaminated Soil. *Journal of Basic Microbiology*, 64(12), e2400504. <https://doi.org/10.1002/jobm.202400504>
- Paraguay-Delgado, F. (2020). Técnicas de microscopía electrónica usadas en el estudio de nanopartículas. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias Y Nanotecnología*, 13(25), 101-131. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2020.25.69626>
- Patil, R. M., Deshpande, P. P., Aalhat, M., Ganadhamu, S., & Singh, P. K. (2022). An Update on Sophisticated and Advanced Analytical Tools for Surface Characterization of Nanoparticles. *Surfaces and Interfaces*, 33, 102165. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2022.102165>
- Pérez Muñoz, Y., López Martínez, S., Rodríguez Luna, A. R., & Ramos Arcos, S. A. (2020). Evaluación de impacto socioambiental, por derrame de petróleo de un ducto en Comalcalco, Tabasco. *Journal of Basic Sciences*, 5(15), 134-152. <https://doi.org/10.19136/jobs.a5n15.3574>
- Pérez Taborda, J. A., Gallego, J. L., Stiven Roman, W., & Riascos Landázuri, H. (2008). Películas nanoestructuradas de óxido de zinc (ZnO). *Scientia et Technica*, XIV(39), 416-421.
- Pérez Vidal, A., & Leyton Franco, M. d. (2020). *Tecnologías para biorremediación de suelos y aguas contaminados con hidrocarburos Technologies for bioremediation of soils and water contaminated with hydrocarbons*. Universidad Santiago de Cali.
- Prabhu, Y. T., Rao, K. V., Sai Kumar, V. S., & Kumari, B. S. (2014). X-Ray Analysis by Williamson-Hall and Size-Strain Plot Methods of ZnO Nanoparticles with Fuel

- Variation. *World Journal of Nano Science and Engineering*, 4(1), 21-28.
<https://doi.org/10.4236/wjnse.2014.41004>
- Pulster, E. L., Gracia, A., Armenteros, M., Gerado Toro-Farmer, S. M., Brigid E, C., Schwaab, M. R., . . . Murawski, S. A. (2020). A First Comprehensive Baseline of Hydrocarbon Pollution in Gulf of Mexico Fishes. *Scientific Reports*, 10(6437).
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-62944-6>
- Rao, A. S., Nair, A., More, V. S., Anantharaju, K. S., & More, S. s. (2022). Extremophiles for sustainable agriculture. En S. H. Bahadur, & A. Vaishnav, *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Sustainable Agriculture: Advances in Microbe-based Biostimulants* (págs. 243-264). ELSEVIER: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85577-8.00021-4>
- Reshmy, R., Philip, E., Sirohi, R., Tarafdar, A., Arun, K., Madhavan, A., . . . Sindhu, R. (2021). Nanobiocatalysts: Advancements and applications in enzyme technology. *Bioresource Technology*, 337, 125491.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125491>
- Reyes Reyes, M. A. (2018). Immobilization of potentially crude oil degrading bacteria in synthetic and natural organic matrices. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 34(4), 597-609. <https://doi.org/10.20937/rica.2018.34.04.04>
- Rodríguez-Uribe, M. L., Peña-Cabriales, J. J., Rivera-Cruz, M. d., & Délano-Frier, j. P. (2021). Native bacteria isolated from weathered petroleum oil-contaminated soils in Tabasco, Mexico, accelerate the degradation of petroleum hydrocarbons in saline soil microcosms. *Environmental Technology & Innovation. Environmental Technology & Innovation*, 23, 101881. <https://doi.org/10.1019/j.eti.2021.101781>
- Rostro-Alanis, Jesús, M. d., Mancera-Andrade, E. I., Gómez Patiño, M. B., Arrieta-Baez, D., Cardenas, B., . . . Parra Saldívar, R. (2016). Nanobiocatalysis: Nanostructured materials – a minireview. *Biocatalysis*, 2(1), 1-24.
<https://doi.org/10.1515/boca-2016-0001>
- Sadeghi, A., Ebrahimi, M., Shahryari, S., Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2024). Potential applications of encapsulated yeasts especially within alginate and chitosan as smart bioreactors and intelligent micro-machines. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 7, 100513.
<https://doi.org/10.1016/j.carpta.2024.100513>
- Sakamoto, S., Nobu, M. K., Mayumi, D., Tamazawa, S., Kusada, H., Yonebayashi, H., . . . Tamaki, H. (2021). *Koleobacter methoxysyntrophicus* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic bacterium isolated from deep subsurface oil field and proposal of *Koleobacteraceae* fam. nov. and *Koleobacterales* ord. nov. within the class *Clostridia* of the phylum *Firmicutes*. *Systematic and Applied Microbiology*, 44(1), 126154. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126154>
- Salahuddin, N. A., El-Kemary, M., & Ibrahim, E. M. (2015). Synthesis and Characterization of ZnO Nanoparticles via Precipitation Method: Effect of Annealing Temperature on Particle Size. *Nanoscience and Nanotechnology*, 5(4), 82-88. <https://doi.org/10.5923/j.nn.20150504.02>
- Salem, S. S. (2023). A mini review on green nanotechnology and its developmente in biological effects. *Archives of Microbiology*, 205, 128.
<https://doi.org/10.1007/s00203-023-03467-2>
- Servicio Geológico Mexicano. (22 de Marzo de 2017). *Características del petróleo*. Obtenido de Gobierno de México:
https://www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/Aplicaciones_geologicas/Caracteristicas-del-petroleo.html

- Sharma, D. K., Shukla, S., Sharma, K. K., & Kumar, V. (2022). A review on ZnO: Fundamental properties and applications. *Materials Today: Proceedings*, 49(8), 3028-3035. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.10.238>
- Silva-Torres, O., Bojorquez-Vazquez, L., Simakov, A., & Vazquez-Duhalt, R. (2019). Enhanced laccase activity of biocatalytic hybrid copper hydroxide nanocages. *Enzyme and Microbial Technology*, 128, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.05.008>
- Singh, J., Juneja, S., Palsaniya, S., Manna, A. K., Soni, R. K., & Bhattacharya, J. (2019). Evidence of oxygen defects mediated enhanced photocatalytic and antibacterial performance of ZnO nanorods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 184, 110541. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110541>
- Teklit Gebregiorgis, A., Vaccari, M., Franzetti, A., Prasad, S., Formicola, F., Rosatelli, A., . . . Rtimi, S. (2023). Microbial electrochemical bioremediation of petroleum hydrocarbons (PHCs) pollution: Recent advances and outlook. *Chemical Engineering Journal*, 452, part 3(139372). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.139372>
- Thermo Fisher Scientific. (s.f.). *Aplicaciones del espectrofotómetro UV-Vis*. Obtenido de Thermo Fisher: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/uv-vis-spectrophotometry/applications.html>
- Thommes, M., Kaneko, K., Neimark, A. V., Oliver, J. P., Rodiguez-Reinoso, F., Rouquerol, J., & Sing, K. S. (2014). Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 87(9-10), 1051-1069. <https://doi.org/10.1515/pac-2014-1117>
- Torres-Custodio, R., Hernández-Rivera, M. Á., López-Lázaro, J. d., Córdova-Bautista, Y., Álvarez-Ramírez, J. G., Sifuentes-Gallardo, P., & Ojeda-Morales, M. E. (2023). Extraction and characterization of a biosurfactant synthesized by *Acinetobacter baumannii*. *Mexican Journal of Biotechnology*, 8(1), 37-65. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2023.8.1.37>
- Torres-Gomez, N., Avila-Aviles, R. D., & Vilchis-Nestor, A. R. (2020). Biosynthesis and characterization of nanostructures by electron microscopy. *Mundo Nano*, 13(25), 29-43. <https://doi.org/10.22201/ceich.24485691e.2020.25.69637>
- Uribe-López, M. C., Hidalgo-López, M. C., López-González, R., Frías-Márquez, D. M., Núñez-Nogueira, G., Hernández-Castillo, D., & Alvarez-Lemus, M. A. (2021). Photocatalytic activity of ZnO nanoparticles and the role of the synthesis method on their physical and chemical properties. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 404, 112866. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112866>
- Vaidya, S., Jain, K., & Madamwar, D. (2017). Metabolism of pyrene through phthalic acid pathway by enriched bacterial consortium composed of *Pseudomonas*, *Burkholderia*, and *Rhodococcus* (PBR). *3 Biotech*, 7(29). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0598-8>
- Varela, G. (2008). *Fisiología y metabolismo bacteriano*.
- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277-286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>
- Varma, S. S., Wasnik, D. D., & M., T. P. (2017). Production and characterization of biosurfactant by *Bacillus subtilis* isolated from soil samples. *International Journal of Development Research*, 7(8), 14857-14864.

- Vazquez Olmos, A. R., Vega Jimenez, A. L., & Paz Díaz, B. (2018). Mecanosíntesis y efecto antimicrobiano de óxidos metálicos nanoestructurados. *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, 11(21), 29-44. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2018.21.62545>.
- Vazquez-Duhalt, R. (2015). Nanotecnología en procesos ambientales y remediación de la contaminación. *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, 8(14), 70-80. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2015.14.52514>
- Vignesh, K., Nair, A. S., Udhayakeerthana, C., & Kalaivani, T. (2022). Synthesis and characterization ZnO nanoparticles using sol-gel method and their antibacterial study. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1219(1), 012019. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/1219/1/012019>
- Wade, L. G. (2004). *Química Orgánica*. PEARSON EDUCACIÓN. <https://doi.org/84-205-4102-8>
- Walsoe, N. E. (2013). Cerámicos Nanoestructurados. Síntesis, caracterización y aplicaciones. *Revista SAM*, 3, 16-35.
- Wang, P. (2006). Nanoscale biocatalyst systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(6), 574-579. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.10.009>
- Wang, Y., Guo, Y., Zhang, L., Yang, Y., Yang, S., Yang, L., . . . Xie, G. (2021). Integration of multiplex PCR and CRISPR-Cas allows highly specific detection of multidrug-resistant *Acinetobacter Baumannii*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 334, 129600. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129600>
- Xiao, M., Sun, H., Meng, Y., & Zhu, F. (2024). Advances of in situ transmission electron microscopy research on gas phase catalyst particles. *Catalysis Science & Technology*, 14(8), 2040-2063. <https://doi.org/10.1039/d3cy01600e>
- Yousuf, J., Thajudeen, J., P. A., A., Josehp, A., P. S., D., Varghese, A., & A.A., M. H. (2020). Diversity and activity of culturable nitrogen fixing heterotrophic bacteria from estuarine and coastal environments of Southeastern Arabian Sea (SEAS). *Regional Studies in Marine Science*, 33, 100973. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100973>
- Zhao, Z., & Wong, J. (2009). Biosurfactants from *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 enhance the solubility and biodegradation of phenanthrene. *Environmental Technology*, 30(3), 291-299.
- Zhou, H., Huang, X., Liang, Y., Li, Y., Xie, Q., Zhang, C., & You, S. (2020). Enhanced bioremediation of hydraulic fracturing flowback and produced water using an indigenous biosurfactant-producing bacteria *Acinetobacter* sp. Y2. *Chemical Engineering Journal*, 397, 125348. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125348>