



**PRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE UN
BIOSURFACTANTE PARA LA
BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS
CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS**

**TESIS DOCTORAL
PRESENTADA POR**

EMILIO CASTILLO CAMPOS
Maestro en Ciencias e Ingeniería – UAM
Azcapotzalco

DIRECTORAS DE TESIS

Dra. VIOLETA MUGICA ÁLVAREZ
UAM – Azcapotzalco

**Dra. GLADYS TERESA CASTORENA
CORTÉS**
Instituto Mexicano del Petróleo

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO DE 2022

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Autónoma Metropolitana y en los laboratorios de Microbiología y Bioanalítico del Instituto Mexicano del Petróleo.

El que suscribe realizó las actividades reportadas en este trabajo, con el auspicio del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Parte de las actividades aquí reportadas, fueron parte del proyecto D.61042 de la Gerencia de Ingeniería de Recuperación Adicional del Instituto Mexicano del Petróleo, IMP.

Extiendo mi más profundo agradecimiento

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

A la UAM-A y el IMP por las facilidades otorgadas en cuanto al uso de laboratorios, reactivos y equipos.

Contenido

ÍNDICE DE TABLAS.....	viii			
ÍNDICE DE FIGURAS	x			
ABREVIACIONES Y ACRÓNIMOS	xiii			
RESUMEN.....	1			
ABSTRACT	3			
JUSTIFICACIÓN.....	4			
HIPÓTESIS	6			
1.	INTRODUCCIÓN			
.....	8			
1.1CONTAMINACIÓN DEL SUELO CON PETRÓLEO E HIDROCARBUROS				
.....	9			
1.2IMPORTANCIA DE LOS BIOSURFACTANTES EN LA REMEDIACIÓN DE				
SUELOS.....	10			
1.3REFERENCIAS	DEL	CAPÍTULO		
.....		13		
2.	OBJETIVOS			
.....		15		
2.1OBJETIVO	GENERAL			
.....		16		
2.2OBJETIVOS	PARTICULARES			
.....		16		
3.ANTECEDENTES	Y	ESTADO	DEL	ARTE
.....				17
3.1SUELOS CONTAMINADOS CON PETRÓLEO E HIDROCARBUROS				
.....				18

3.2	REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS	21
3.2	BIORREMEDIACIÓN	23
3.3	BIODISPONIBILIDAD	26
3.4	USO DE SURFACTANTES EN LA BIORREMEDIACIÓN	26
3.5	BIOSURFACTANTES	28
3.5.1	CLASIFICACIÓN	28
3.5.2	PROPIEDADES TENSOACTIVAS Y ESTABILIDAD	29
3.5.1	PRODUCCIÓN Y RECUPERACIÓN	31
3.6	SURFACTINA	34
3.7	TENSIÓN INTERFACIAL, MOJABILIDAD Y ÁNGULO DE CONTACTO	36
3.8	REFERENCIAS DEL CAPÍTULO	39
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	45
4.1	ACEITE, ROCAS Y ARENA	47
4.2	MICROORGANISMOS DE TRABAJO	47

4.3PROPAGACIÓN	DE	CEPAS	48
4.4DESARROLLO DE INÓCULO PARA LA PRODUCCIÓN DEL BIOSURFACTANTE			49
4.5PRODUCCIÓN	DEL	BIOSURFACTANTE	EN
			MATRAZ
			49
4.6PRODUCCIÓN POR LOTE EN BIORREACTOR TIPO TANQUE AGITADO			51
4.7RECUPERACIÓN DEL BIOSURFACTANTE A PARTIR DEL MEDIO DE CULTIVO			52
4.8CONCENTRACIÓN	MICELAR	CRÍTICA	53
4.9CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROGRAFÍA DE LUZ INFRA ROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER FTIR			53
4.10ACTIVIDAD DEL BIOSURFACTANTE BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS AMBIENTAL			53
4.10.1Estabilidad		térmica	54
4.10.2Estabilidad	AL	PH	54
4.10.3Estabilidad	a	diferentes	salinidades
			54
4.11ESTUDIO DE LOS FACTORES AMBIENTALES QUE TIENEN EFECTO EN EL COMPORTAMIENTO DEL BIOSURFACTANTE DURANTE LA LIBERACIÓN DEL CRUDO IMPREGNADO EN ARENA DE CALIZA			54
4.12BIODEGRADACIÓN DEL CRUDO PESADO IMPREGNADO EN ARENA DE CALIZA			57

4.12.1DESARROLLO	DE	INÓCULO	
.....			57
4.12.2IMPREGNADO	DE	LA ARENA	CON EL CRUDO PESADO
.....			57
4.12.3.....		BIODEGRADACIÓN	
.....			58
4.13TÉCNICAS		ANALÍTICAS	
.....			59
4.13.1DETERMINACIÓN	DE	BIOMASA	CELULAR
.....			59
4.13.2DETERMINACIÓN	DE	AZÚCARES	TOTALES
.....			60
4.13.3DISPERSIÓN	DE		ACEITE
.....			60
4.13.4DETERMINACIÓN	DE	LA TENSIÓN	SUPERFICIAL
.....			61
4.13.5DETERMINACIÓN	DE	LA TENSIÓN	INTERFACIAL
.....			61
4.13.6DETERMINACIÓN	DEL	ÁNGULO	DE CONTACTO
.....			62
4.13.7CONCENTRACIÓN		MICELAR	CRÍTICA
.....			62
4.13.8DETERMINACIÓN		DE	CO ₂
.....			63
4.13.9ANÁLISIS	DE	LA PRODUCCIÓN	DE CO ₂
.....			63
4.13.10ANÁLISIS			ESTADÍSTICO
.....			63

4.14	REFERENCIAS	DEL	CAPÍTULO	
			65
5.	RESULTADOS	Y	DISCUSIÓN	
			66
5.1	PRODUCCIÓN	DE	BIOSURFACTANTE	EN
			MATRAZ
				67
5.2	PRODUCCIÓN	DEL	BIOSURFACTANTE	EN
			BIORREACTOR
				70
5.3	CARACTERIZACIÓN	DEL	BIOSURFACTANTE	
			80
5.4	ACTIVIDAD DEL BIOSURFACTANTE	BAJO	DIFERENTES	CONDICIONES
	AMBIENTALES		83
5.5	LIBERACIÓN DE ACEITE	A	DIFERENTES	COMBINACIONES
	AMBIENTALES		87
5.5.1	Dispersión	de	aceite	
			96
5.5.2	Evaluación	de	la	mojabilidad
			97
5.5.3	EFECTO SINÉRGICO ENTRE LA	TEMPERATURA	Y	LA
	mecanismo de transporte de masa		100
5.6	BIODEGRADACIÓN DEL CRUDO	PESADO	CONTAMINANDO	ARENA
	CALIZA		103
5.6.1	PRODUCCIÓN DE CO ₂	COMO	INDICADOR	DE
	MEJORADA DEL CRUDO		103
5.6.2	BIODEGRADACIÓN DE LAS	DIFERENTES	FRACCIONES	DEL
	MEDIACIÓN DEL BIOSURFACTANTE		106
5.6.3	DIFERENCIAS EN LA FORMA	DE	CRECIMIENTO	DEL
			MICROORGANISMO
				112

5.6.4	CAMBIOS DE MOJABILIDAD EN LOS TRATAMIENTOS DE BIODEGRADACIÓN.....	114
5.6.5	MECANISMOS DE ACCIÓN DEL BIOSURFACTANTE	116
5.7	REFERENCIAS DEL CAPÍTULO	118
6. CONCLUSIONES	122
7.	RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	125
	ANEXOS	127
I.	CURVA TIPO DE BIOMASA	128
II.	ALGORITMO PARA EL AJUSTE DE DATOS	129
III.	CLASIFICACIÓN DE CRUDOS DE PETRÓLEO DE ACUERDO CON EL AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE	131
IV.	ARTÍCULO PUBLICADO	132

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Límites máximos permisibles para hidrocarburos en suelos de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2012.....	20
Tabla 2. Clasificación de las tecnologías de remediación en base a su efecto en el contaminante.....	22
Tabla 3. Clasificación de las tecnologías de remediación según su principio de funcionamiento.....	23
Tabla 4. Ventajas y Desventajas de las principales técnicas de remediación de suelos contaminados.....	24
Tabla 5. Tipos de biosurfactantes y los microorganismos que los producen.....	30
Tabla 6. Métodos de separación y purificación de biosurfactantes.....	33
Tabla 7. Composición del medio sólido empleado.....	48
Tabla 8. Composición del medio mineral para la producción del biosurfactante.....	49
Tabla 9. Diseño experimental ortogonal de Taguchi L9.....	55
Tabla 10. Composición del medio empleado en los experimentos de biodegradación.....	58
Tabla 11. Diseño de los tratamientos para el ensayo de biodegradación del crudo impregnado en arena.....	59
Tabla 12. Parámetros cinéticos de la producción del biosurfactante en matraz.....	68
Tabla 13. Concentración micelar crítica, tensión superficial y diámetro del halo de dispersión a las diferentes velocidades de aireación ensayadas.....	75
Tabla 14. Velocidades de crecimiento y consumo de sustrato a diferentes velocidades de aireación, 180 rpm y 30°C.....	76
Tabla 15. Resumen de resultados obtenidos para las velocidades de aireación empleadas.....	77
Tabla 16. Rendimientos obtenidos para los cultivos en biorreactor a diferentes velocidades de aireación.....	79
Tabla 17. Principales bandas de absorción FTIR del biosurfactante obtenido y comparación con las de la surfactina e iturina.....	82
Tabla 18. Resultados de estabilidad del biosurfactante de acuerdo con la prueba de Dunnett*.....	84

Tabla 19. Análisis de varianza de relaciones señal a ruido y medias de liberación de aceite	93
Tabla 20. Tensión superficial de los tratamientos y sus controles	94
Tabla 21. Tensión interfacial de los tratamientos y sus controles.....	95
Tabla 22. Ángulos de contacto de los tratamientos antes y después del proceso de imbibición con el biosurfactante bajo las diferentes combinaciones de condiciones ambientales.....	98
Tabla 23. Resumen de resultados de factores que afectan la actividad del biosurfactante durante la liberación del crudo pesado	102
Tabla 24. Biodegradación de las diferentes fracciones del crudo de acuerdo con el análisis SARA	107
Tabla 25. Ángulos de contacto en rocas impregnadas con el aceite y después sometidas al proceso de biodegradación. La determinación se realizó a los siete días de cultivo.....	114
Tabla 26. Clasificación del crudo de petróleo según el American Petroleum Institute.....	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la principal isoforma de la surfactina, en la que el séptimo aminoácido es una valina. La porción lipídica se compone de una cadena de 12 carbonos (Montagnoli et al, 2015).....	35
Figura 2. Diagrama de flujos de la metodología	46
Figura 3. Cepas de trabajo A) Aspecto microscópico de <i>B. subtilis</i> B) Morfología colonial de <i>B. subtilis</i> C) Aspecto microscópico de <i>Rhodococcus sp.</i> y D) Morfología colonial de <i>Rhodococcus sp.</i>	48
Figura 4. Configuración del biorreactor para la recuperación y recolección de la espuma formada.....	52
Figura 5. Determinación del volumen de aceite liberado por medición del espesor de la capa formada en la superficie	56
Figura 6. Aspecto de la arena impregnada con el aceite pesado	57
Figura 7. Matraces de biodegradación siendo aireados en condiciones estériles en campana de flujo laminar, las válvulas Mininert se retiraban para permitir el intercambio gaseoso..	59
Figura 8. Determinación de la dispersión de aceite por el diámetro del halo formado. A) Gota de aceite formando una película en la superficie del agua antes de adicionar el biosurfactante B) Halo formado al adicionar el biosurfactante.....	61
Figura 9. Determinación del ángulo de contacto por el método de la gota cautiva.....	62
Figura 10. Cinéticas de A) crecimiento de <i>B. subtilis</i> y de consumo de sustrato y B) de producción del biosurfactante expresada como disminución de la tensión superficial del medio de cultivo.	67
Figura 11. Determinación de la concentración micelar crítica del biosurfactante obtenido	70
Figura 12. Evolución de la biomasa en biorreactor a diferentes velocidades de aireación ..	71
Figura 13. Formación y recolección de espuma durante la producción del biosurfactante en biorreactor. A) Puerto de muestreo. B) Reservorio recolector de espuma	71
Figura 14. Tensión superficial como indicativo de la producción del biosurfactante a diferentes velocidades de aireación	72
Figura 15. Cinéticas de crecimiento y de disminución de la tensión superficial del cultivo en biorreactor a 0.7 vvm.....	73

Figura 16. Concentración micelar crítica (CMC) del biosurfactante obtenido a diferentes velocidades de aireación.....	73
Figura 17. Aspecto de la espuma y el biorreactor a 0.80 vvm a las 66 horas de cultivo.....	74
Figura 18. Productos secos obtenidos. A) a 0.7 vvm, B) a 0.8 vvm, C) a 0.9 vvm y D) a 1.02 vvm. En el caso de 0.70 y 1.02 vvm, los productos se obtuvieron a partir de 50 mL de espuma, en los demás a partir de 100 mL de espuma.....	80
Figura 19. Espectrograma FTIR del biosurfactante obtenido.....	82
Figura 20. Actividad del biosurfactante bajo diferentes condiciones ambientales: A) Salinidad B) pH y C) Temperatura.....	83
Figura 21. Aspecto de las columnas para los ensayos de liberación de aceite. A) Arena impregnada con el aceite pesado B) Columnas control con agua destilada y C) Columnas con el biosurfactante.....	88
Figura 22. Liberación de aceite en porciento (%) de las corridas del diseño experimental. Las barras de error representan la desviación estándar.	89
Figura 23. Tratamientos (T1 – T9) a los siete días de incubación. En todos los casos, el frasco a la izquierda representa el control.....	90
Figura 24. Resultados de liberación de aceite. La línea punteada representa la media global. Entre mayor es el tamaño del efecto, mayor es su influencia en la liberación de aceite.....	91
Figura 25. Superficie de respuesta de la liberación de aceite en función de la temperatura y la salinidad.....	93
Figura 26. Gráfica comparativa de los diámetros del halo de dispersión. Se presenta la desviación estándar.....	97
Figura 27. Cambio de mojabilidad en los tratamientos. A) Antes del proceso de imbibición en el biosurfactante y B) Después del periodo de incubación.....	98
Figura 28. Determinación del ángulo de contacto del tratamiento 1 en A) Sistema con BS y B) Sistema con agua destilada. En ambos medios, se obtuvo cambio de mojabilidad respecto al estado inicial.....	98
Figura 29. Aspecto de la roca del tratamiento 2 A) después de la impregnación y B) después del periodo de imbibición. C) liberación de gotas de aceite en rocas tratadas con el biosurfactante.....	99

Figura 30. Producción de CO ₂ por los tratamientos de biodegradación del crudo pesado impregnado en arena de roca caliza.....	103
Figura 31. Producción neta de CO ₂ debida a la biodegradación del crudo. Tratamientos sin biosurfactante SL y con biosurfactante CL	105
Figura 32. Velocidades de producción de CO ₂ en los tratamientos de biodegradación de crudo pesado impregnado en arena de caliza. CL, con biosurfactante y SL, sin biosurfactante.	106
Figura 33. Cromatografía de gases que muestra la distribución de carbonos A) crudo B) aceite residual del tratamiento CL y C) aceite residual del tratamiento SL.....	109
Figura 34. Distribución de compuesto carbonados de los aceites residuales del control y los tratamientos [A] C ₆ -C ₁₅ , [B] C ₁₆ -C ₃₀ , [C] C ₃₁ -C ₄₅ y [D] C ₄₆ -C ₆₀	110
Figura 35. Crecimiento celular en los tratamientos de biorremediación. SL tratamiento sin biosurfactante. CL tratamiento con biosurfactante.....	114
Figura 36. Aspecto de las rocas sometidas al proceso de biodegradación después de siete días de incubación. [A] Roca del tratamiento sin biosurfactante SL y [B] roca del tratamiento con biosurfactante CL	115

ABREVIACIONES Y ACRÓNIMOS

AB	Control abiótico, en los experimentos de biodegradación del crudo
AC	Ángulo de contacto, indicativo de la mojabilidad
API	American Petroleum Institute
BS	Biosurfactante
CL	Tratamiento con biosurfactante, en los experimentos de biodegradación del crudo
CM	Media de la suma de los cuadrados
CMC	Concentración micelar crítica
C _x	Átomos de carbono, el sufijo indicará en número de estos en los compuestos hidrocarbonados
DHS	Diferencia honesta significativa, prueba de comparación de medias
DOE	Diseño experimental
DSA	Analizador de forma de gota
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier
GL	Grados de libertad
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HTP	Hidrocarburos totales de petróleo
OA	Arreglo ortogonal, en el diseño de experimentos
ppm	Concentración en partes por millón
SARA	Análisis de compuestos saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos
SC	Control sin crudo y sin biosurfactante, en los experimentos de biodegradación del crudo
SC	Sumatoria de los cuadrados
SL	Tratamiento sin biosurfactante, en los experimentos de biodegradación
TIF	Tensión interfacial
TS	Tensión superficial
vvm	Volúmenes de aire por volumen de líquido por minuto, velocidad de aireación.

RESUMEN

RESUMEN

Los crudos pesados están constituidos por diferentes fracciones de asfaltenos, resinas, compuestos aromáticos y saturados, que contribuyen a sus altas viscosidades, por lo que son intrínsecamente difíciles de biodegradar. Por otro lado, los suelos contaminados que contienen rocas calizas son preferiblemente mojables a los aceites, lo que dificulta su remoción. Los biosurfactantes son capaces de modificar la mojabilidad en el sistema roca/aceite/agua y reducir la tensión interfacial, lo que promueve la liberación del aceite, haciéndolo biodisponible. Este trabajo tuvo como objetivo producir y evaluar un biosurfactante biosintetizado por una cepa de *Bacillus subtilis* para mejorar la biodegradación del crudo pesado impregnado en arena de caliza. Se realizó la producción del biosurfactante en un reactor agitado de 3L. La actividad biosurfactante se determinó a diferentes temperaturas, pH y salinidades para establecer su estabilidad. Se evaluaron la tensión interfacial y el ángulo de contacto para determinar los mecanismos involucrados en la liberación de aceite pesado. Finalmente, se dilucidó el efecto del biosurfactante sobre la liberación del aceite pesado impregnado en arena de caliza, para su posterior biodegradación utilizando una cepa de *Rhodococcus sp.* Se encontró que la tasa máxima de producción de CO₂, utilizada como indicador de actividad biológica, mejoró en un 32.84% en los sistemas donde se utilizó biosurfactante, en comparación con aquellos donde no se usó. Al menos el 67% de la fracción > C₂₀ se degradó en los sistemas con biosurfactante, reduciendo las fracciones aromática y de resinas (12.5% y 2%, respectivamente), mientras que en los sistemas sin biosurfactante solo se eliminó el 37% de la fracción > C₂₀ y la reducción de aromáticos y resinas fue nula. El biosurfactante demostró ser efectivo en la liberación del crudo y mejoró notablemente el proceso de biodegradación.

Palabras clave: biosurfactante, liberación de aceite, modificación de la mojabilidad, biodisponibilidad, biodegradación

ABSTRACT

Heavy crude oils are comprised of different fractions of asphaltenes, resins, aromatic and saturated compounds, which contribute to their high viscosities, making them intrinsically difficult to biodegrade. Besides, contaminated soils that contain limestone rocks are preferably oil wet, which makes their removal difficult. Biosurfactants are capable of modifying the wettability of rock/oil/water system and reduce interfacial tension, which promotes the release of oil, making it bioavailable. The objective of this work was to produce and evaluate a biosurfactant biosynthesized by a strain of *Bacillus subtilis* to improve the biodegradation of a heavy crude oil impregnated in limestone sand. The biosurfactant production was carried out in a 3L stirred reactor. The biosurfactant activity was determined at different temperatures, pH and salinities to establish its stability. Interfacial tension and contact angle were evaluated to determine the mechanisms involved in heavy oil release. Finally, the effect of the biosurfactant on the release of heavy oil impregnated in limestone sand was elucidated, for its subsequent biodegradation using a strain of *Rhodococcus sp.* It was found that the maximum CO₂ production rate, used as an indicator of biological activity, improved by 32.84% in systems where biosurfactant was used, compared to those where it was not used. At least 67% of the fraction > C₂₀ was degraded in the systems with biosurfactant, reducing the aromatic and resin fractions (12.5% and 2%, respectively), while in systems without biosurfactant only 37% was removed of the fraction > C₂₀ and the reduction of aromatics and resins was null. The biosurfactant proved to be effective in the release of crude oil and significantly improved the biodegradation process.

Keywords: biosurfactant, oil release, wettability modification, bioavailability, biodegradation

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

El suelo es un recurso natural que desempeña funciones muy importantes para el desarrollo de la vida sobre el planeta. Una de las mayores problemáticas a las que se enfrenta el hombre es la contaminación del suelo como resultado de sus actividades económicas, lo que conlleva a la pérdida del potencial que éste posee como sustento de ellas. México es un país petrolero, cuya actividad en este ramo industrial ha generado importantes problemas de contaminación de suelos como consecuencia de derrames, exploración y explotación, procesamiento y almacenamiento, así como el transporte de este recurso y sus derivados. Actualmente existen tecnologías para el tratamiento y recuperación de suelos contaminados con petróleo y sus derivados, sin embargo, los métodos físicos y químicos tienen algunas desventajas respecto a los biológicos, como son la generación y el empleo de sustancias tóxicas y la pérdida de las propiedades y capacidades del suelo. Por lo que la biorremediación sigue siendo el más empleado en acciones de recuperación *in situ*. No obstante, en la gran mayoría de los episodios de contaminación, los métodos de biorremediación se ven limitados por la baja biodisponibilidad que presentan los hidrocarburos en los sistemas complejos hidrocarburo-agua-suelo, debido a la baja solubilidad de éstos y su adherencia y absorción en las rocas constitutivas del suelo. El uso de surfactantes permite aumentar la biodisponibilidad al modificar la solubilidad del petróleo, sin embargo, muchos de ellos son de naturaleza sintética y resultan en ocasiones tóxicos y costosos. Los biosurfactantes representan una opción eco-amigable y económica al producirlos a partir de sustratos baratos y al tener la posibilidad de emplearlos en forma cruda. Los biosurfactantes se han evaluado en función de la tensión superficial y de la tensión interfacial a diferentes concentraciones y condiciones ambientales (temperatura, pH y salinidad) de manera individual y muy pocas veces determinando el efecto conjunto de ellas. En este trabajo se evaluaron empleando un diseño experimental de Taguchi, que permitió conocer la influencia de las condiciones ambientales y asimismo detectar efectos sinérgicos entre ellas. Adicionalmente se evaluó la efectividad del biosurfactante como coadyuvante en procesos de biorremediación de suelos contaminados con crudo pesado, al facilitar la liberación de este de la roca.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Los biosurfactantes pueden ser usados en procesos de biodegradación de crudos pesados en suelos contaminados, para incrementar la biodisponibilidad de estos y por tanto mejorar los resultados en cuanto a velocidades de degradación y fracciones degradadas. El conocimiento de la interacción aceite-agua-biosurfactante-roca evaluada mediante la tensión interfacial y la mojabilidad, permitirá dilucidar los mecanismos involucrados en la liberación del crudo pesado impregnado en arena de caliza, con la que presenta una fuerte sorción y adherencia. Adicionalmente las evaluaciones de estabilidad del biosurfactante a diferentes intervalos de temperatura, pH y salinidad, permitirá establecer las condiciones ambientales en que los biosurfactantes pueden ser usados de forma efectiva en la biorremediación y recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CONTAMINACIÓN DEL SUELO CON PETRÓLEO E HIDROCARBUROS

La industria petrolera ha jugado un papel importante en la economía de muchos países; en el año 2019 se estimaba que la demanda de este recurso alcanzaría los 100.6 millones de barriles por día (Fenibo *et al.*, 2019). La exploración, explotación, refinación, transporte y distribución de este recurso, así como la deposición de los desechos de estas operaciones han contaminado grandes extensiones de suelo que requieren ser remediadas y recuperadas. Las concentraciones de crudo e hidrocarburos encontradas en suelos mexicanos, han sido reportados en el intervalo de 100000 a 300000 ppm de hidrocarburos totales de petróleo (Maldonado-Chávez *et al.*, 2010).

La biorremediación es una de las técnicas de recuperación de suelos más empleadas actualmente y representa una alternativa atractiva en relación costo-beneficio (Abioye *et al.*, 2012), esta aprovecha las capacidades metabólicas de los microorganismos para disminuir la concentración de los compuestos hidrocarbonados, transformarlos en otros menos tóxicos o llevarlos a su completa mineralización (Silva *et al.*, 2014). Aunque la biorremediación presenta muchas ventajas sobre las técnicas físicas y químicas, en ocasiones se ve limitada por la baja solubilidad del petróleo en agua, la alta hidrofobicidad de este y sus componentes, y su fuerte sorción en el suelo y la matriz rocosa que lo conforma (Li *et al.*, 2015; Motevasel, 2014). En el caso de aceites pesados se presenta además la baja o nula dispersión de estos en agua como resultado de su elevada viscosidad (Abioye *et al.*, 2012). Todo lo anterior provoca una pobre biodisponibilidad del petróleo para los microorganismos degradadores, retardando los procesos de biodegradación y biorremediación (Li *et al.*, 2015).

1.2 IMPORTANCIA DE LOS BIOSURFACTANTES EN LA REMEDIACIÓN DE SUELOS

El uso de biosurfactantes para mejorar y acelerar los procesos de biorremediación ha sido ampliamente reportado (Jadidi *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2014; Karlapudi *et al.*, 2018). Son compuestos anfifílicos capaces de intercalarse en las interfases aire-agua y aceite-agua, por lo que disminuyen la tensión superficial e interfacial, promueven cambios en la mojabilidad del petróleo en el suelo y disminuyen la viscosidad del aceite, promoviendo su fluidización (Karlapudi *et al.*, 2018); debido a ello los compuestos hidrocarbonados son liberados, solubilizados y/o dispersados en la fase acuosa para ser atacados enzimáticamente por los microorganismos biodegradadores (Wang y Mulligan, 2004; Motevasel, 2014). Derivado de lo anterior, se logra una mejoría en las tasas de biodegradación (Al-Bahry *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2016).

Los biosurfactantes son producidos a partir de diversas especies de bacterias, levaduras y hongos, ya sea extracelularmente o como parte de la membrana celular (Karlapudi *et al.*, 2018). Presentan varias ventajas respecto a los surfactantes químicos: pueden obtenerse a partir de fuentes baratas y autosustentables, desechos y subproductos industriales (Silva *et al.*, 2014), son biocompatibles, estables a condiciones ambientales extremas, sus concentraciones micelares críticas son pequeñas, son altamente biodegradables y su toxicidad es baja (Deng *et al.*, 2016; Mani *et al.*, 2016). Al ser producidos por diversos microorganismos, los biosurfactantes se encuentran en una amplia variedad química y estructural. Entre los principales microorganismos productores de biosurfactantes se encuentran especies del género *Bacillus* (Borah y Yadav, 2017; Karlapudi *et al.*, 2018; Chen

et al., 2015), *Pseudomonas* y *Rhodococcus* (Hua y Wang, 2012; Pi *et al.*, 2017). Actualmente han sido empleados en la industria petrolera, en derrames de hidrocarburos y en la biorremediación de suelos (Silva *et al.*, 2014; Karlapudi *et al.*, 2018).

El uso de biosurfactantes ha sido reportado con éxito en la biodegradación a nivel laboratorio de aceites de motor (Karlapudi *et al.*, 2018), fracciones de petróleo, diésel y keroseno (Bezza y Chirwa, 2016), hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) (Bezza y Chirwa, 2017) y aceites medianos y ligeros (Pi *et al.*, 2017b). En los reportes disponibles, se emplea el biosurfactante parcial o completamente purificado obteniéndose buenas tasas de biodegradación (De França *et al.*, 2015). Sin embargo las concentraciones de aceite empleadas en estos trabajos han sido, en la mayoría de los casos, menores a las encontradas en los sitios contaminados (Maldonado-Chávez *et al.*, 2010).

Los reportes de biodegradación de crudos pesados son escasos en la literatura disponible (Montagnolli *et al.*, 2015; Tao *et al.*, 2017). En este tipo de aceites se tiene una gran complejidad química, un alto contenido de resinas y asfaltenos, y elevadas viscosidades (Pi *et al.*, 2017a; Hamzah *et al.*, 2013), por lo que la biodegradación de estos resulta muy difícil y dependerá de la proporción de los compuestos presentes (Montagnolli *et al.*, 2015). Por otro lado, los suelos con alto contenido de roca caliza son preferentemente mojables al aceite, limitando su liberación para poder ser aprovechado por parte de los microorganismos biodegradadores. Los biosurfactantes, al modificar la mojabilidad, resultan ser coadyuvantes en el proceso de biodegradación.

La temperatura, pH y salinidad, son factores ambientales que afectan el comportamiento de los biosurfactantes, por lo que la determinación de su actividad bajo diferentes combinaciones de estos resulta importante.

En este trabajo se empleó un biosurfactante producido por una cepa de *Bacillus subtilis* para la liberación y biodegradación de un crudo pesado de petróleo contaminando arena de roca caliza. Se escogió caliza debido a que este tipo de roca presenta un alto nivel de adherencia con el crudo empleado y es mojable a este.

1.3 REFERENCIAS DEL CAPÍTULO

- Abioye, O. P., Agamuthu, P., y Abdul Aziz, A. R. (2012). Biodegradation of Used Motor Oil in Soil Using Organic Waste Amendments. *Biotechnology Research International*, 2012, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2012/587041>
- Al-Bahry, S. N., Al-Wahaibi, Y. M., Elshafie, A. E., Al-Bemani, A. S., Joshi, S. J., Al-Makhmari, H. S., y Al-Sulaimani, H. S. (2013). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. *International Biodeterioration y Biodegradation*, 81, 141-146. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.006>
- Bezza, F. A., y Chirwa, E. M. N. (2016). Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Contaminated Soil by a Microbial Consortium through Supplementation of Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Strain. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 36(5), 848-872. <https://doi.org/10.1080/10406638.2015.1066403>
- Bezza, F. A., y Chirwa, E. M. N. (2017). The role of lipopeptide biosurfactant on microbial remediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil. *Chemical Engineering Journal*, 309, 563-576. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.10.055>
- Bezza, F. A., Chirwa, E. M. (2016). Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. *Chemosphere*, 144, 635-644. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.027>
- Borah, D., y Yadav, R. N. S. (2017). Bioremediation of petroleum based contaminants with biosurfactant produced by a newly isolated petroleum oil degrading bacterial strain. *Egyptian Journal of Petroleum*, 26(1), 181-188. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2016.02.005>
- Chen, W.-C., Juang, R.-S., y Wei, Y.-H. (2015). Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 103, 158-169. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.07.009>
- de França, Í. W. L., Lima, A. P., Lemos, J. A. M., Lemos, C. G. F., Melo, V. M. M., de Sant'ana, H. B., y Gonçalves, L. R. B. (2015). Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. *Catalysis Today*, 255, 10-15. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2015.01.046>
- Deng, M.-C., Li, J., Hong, Y.-H., Xu, X.-M., Chen, W.-X., Yuan, J.-P., Peng, J., Yi, M., y Wang, J.-H. (2016). Characterization of a novel biosurfactant produced by marine hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01. *Journal of Applied Microbiology*, 120(4), 889-899. <https://doi.org/10.1111/jam.13065>
- Fenibo, E. O., Ijoma, G. N., Selvarajan, R., & Chikere, C. B. (2019). Microbial surfactants: The next generation multifunctional biomolecules for applications in the petroleum industry and its associated environmental remediation. *Microorganisms*, 7(11), 1–29. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110581>
- Hamzah, A., Phan, C.-W., Abu Bakar, N. F., y Wong, K.-K. (2013). Biodegradation of Crude Oil by Constructed Bacterial Consortia and the Constituent Single Bacteria Isolated From Malaysia. *Bioremediation Journal*, 17(1), 1-10. <https://doi.org/10.1080/10889868.2012.731447>
- Hua, F., y Wang, H. (2012). Uptake modes of octadecane by *Pseudomonas* sp. DG17 and synthesis of biosurfactant: Uptake modes of octadecane by *Pseudomonas* sp. DG17. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), 25-37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05178.x>
- Jadidi, N., Roozbehani, B., y Saadat, A. (2014). *The Most Recent Researches in Oily Sludge Remediation Process*. 9.

Maldonadopudi, A. P., Venkateswarulu, T. C., Tammineedi, J., Kanumuri, L., Ravuru, B. K., Dirisala, V. ramu, y Kodali, V. P. (2018). Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum*, 4(3), 241-249. <https://doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007>

Li, T., Hu, H., Jin, L., Xue, B., Zhang, Y., y Guo, Y. (2015). Enhanced bioremediation of crude oil in polluted beach sand by the combination of bioaugmentation and biodiesel. *Journal of Water Reuse and Desalination*, jwr2015086. <https://doi.org/10.2166/wrd.2015.086>

Maldonado-Chávez, E., Rivera-Cruz, M. C., Izquierdo-Reyes, F., y Palma-López, D. J. (2010). Efectos De Rizosfera, Microorganismos Y Fertilización En La Biorremediación Y Fitorremediación De Suelos Con Petróleos Crudo Nuevo E Intemperizado. *Universidad y Ciencia*, 26(2), 121-136.

Mani, P., Sivakumar, P., y Balan, S. S. (2016). Economic Production and Oil Recovery Efficiency of a Lipopeptide Biosurfactant from a Novel Marine Bacterium *Bacillus simplex*. *Achievements in the Life Sciences*, 10(1), 102-110. <https://doi.org/10.1016/j.als.2016.05.010>

Montagnolli, R. N., Lopes, P. R. M., y Bidoia, E. D. (2015). Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(1), 4116. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-4116-8>

Motevasel, M. (2014). *A Study of Surface Biosurfactants Applications on Oil Degradation*. 6.

Pi, Y., Chen, B., Bao, M., Fan, F., Cai, Q., Ze, L., y Zhang, B. (2017a). Microbial degradation of four crude oil by biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp. *Bioresource Technology*, 232, 263-269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.007>

Ron, E. Z., y Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 249-252. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00316-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00316-6)

Silva, F, R. de C, Almeida, S., Rufino, D. G., Luna, R. D., Santos, J. M V. A., Sarubbo, L. A. (2014). Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills. *International Journal of Molecular Sciences; Basel*, 15(7), 12523-12542. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms150712523>

Souza, E. C., Vessoni-Penna, T. C., y de Souza Oliveira, R. P. (2014). Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International Biodeterioration y Biodegradation*, 89, 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.007>

Tao, K., Liu, X., Chen, X., Hu, X., Cao, L., y Yuan, X. (2017). Biodegradation of crude oil by a defined co-culture of indigenous bacterial consortium and exogenous *Bacillus subtilis*. *Bioresource Technology*, 224, 327-332. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.073>

Wang, S., y Mulligan, C. N. (2004). An evaluation of surfactant foam technology in remediation of contaminated soil. *Chemosphere*, 57(9), 1079-1089. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.08.019>

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Producir un biosurfactante y evaluar su capacidad para aumentar la biodisponibilidad y mejorar la biodegradación de un crudo pesado, para su uso futuro en la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Producir un biosurfactante a nivel biorreactor de 3L.
- Evaluar la actividad y la estabilidad del biosurfactante a diferentes condiciones ambientales.
- Determinar los mecanismos involucrados en la liberación del aceite de arena de caliza en elevadas concentraciones.
- Evaluar el efecto del biosurfactante en la degradación microbiana del aceite contaminando arena de caliza.

3. ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE

3. ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE

3.1 SUELOS CONTAMINADOS CON PETRÓLEO E HIDROCARBUROS

El suelo es la parte superior de la corteza terrestre, conformada por material no consolidado que ha estado sometido a la influencia de factores ambientales (Araujo *et al.*, 2006) y se trata de un sistema formado por componentes minerales, orgánicos, gases atrapados en los poros y agua (Saval, 1995); comprende la capa superior de la superficie y diferentes niveles de profundidad. Según las proporciones de arenas, limos, arcillas y materia orgánica, principalmente humus y derivados, existe una gran variedad de tipos diferentes de suelos. Los componentes minerales y la materia orgánica se distribuyen en el espacio generando una estructura porosa. El agua contenida en los poros del suelo contiene sales minerales y nutrientes y es el medio en el cual se puede desarrollar la actividad metabólica de los microorganismos que lo colonizan. El contenido en agua de un suelo puede oscilar enormemente, afectando dicha actividad (Klein, 2000). El suelo representa el medio filtrante y la capa de protección del agua que recarga los acuíferos, es un espacio para actividades económicas agrícolas, ganaderas, forestales y recreativas, sustenta una gran cantidad de microorganismos, es la base para la construcción de obras civiles y a su vez alberga parte de la riqueza cultural (Saval, 1995). Asimismo, el suelo constituye el reservorio de las actividades relacionadas con la explotación y producción del petróleo e hidrocarburos (Fenibo *et al.*, 2019).

La norma mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2012 define como suelo contaminado aquel en el que se encuentran presentes uno o más materiales o residuos peligrosos y que puede constituir un riesgo para el ambiente y la salud; asimismo, define suelo contaminado con hidrocarburos, como aquel en el cual se encuentran presentes hidrocarburos que por sus cantidades y características afecten la naturaleza de este. La contaminación de suelos es una de las consecuencias de la actividad industrial (Ulrici, 2000). La contaminación con petróleo, aceite e hidrocarburos es actualmente un fenómeno común que ha causado catástrofes ecológicas y sociales. A la fecha, los derrames de petróleo representan la mayor fuente de contaminación de suelos (Nadal *et al.*, 2009) siendo esta problemática a la que mayores esfuerzos se dedica (Thapa *et al.*, 2012). Al ser México un país petrolero, su industria en esta rama es una fuente importante de contaminación del suelo (Maldonado-Chávez *et al.*, 2010)

como resultado de la exploración, explotación, procesamiento, almacenamiento y transporte de hidrocarburos, ocasionando derrames, fugas, filtraciones, lodos y recortes de perforación (Adams *et al.* 1999).

Los compuestos hidrocarbonados contaminantes de suelos comprenden alcanos, cicloalcanos, hidrocarburos monoaromáticos (HMA), hidrocarburos poliaromáticos (HPA), resinas, asfaltenos e incluso metales pesados (Fenibo *et al.*, 2019). Estos compuestos además de ser tóxicos, poseen propiedades fisicoquímicas que los hacen insolubles y altamente recalcitrantes.

Estadísticas de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PFPA, 1998) indican que en los años noventa del siglo pasado, los productos mayormente encontrados en suelos contaminados en México eran los hidrocarburos, tan sólo en el estado de Tabasco, Pemex estimaba que había 7200 hectáreas de suelo afectadas por derrames de hidrocarburos, la mayor parte de ellas en zonas pantanosas o inundables donde las condiciones de salinidad son elevadas (Adams *et al.*, 1999). Entre 1993 y 2003 se dieron 5525 episodios de derrames de petróleo e hidrocarburos (Maldonado-Chávez *et al.*, 2010). De enero a junio de 2010, la PROFEPA reportó 138 emergencias ambientales, de las cuales 100 fueron provocadas por derrames de hidrocarburos (Jacott *et al.*, 2011).

El Instituto Mexicano de Transporte (IMT) reportó que entre 1996 y 2001, el petróleo crudo constituyó el 41.08% del total de sustancias químicas derramadas en suelos mexicanos, siendo la transportación por ductos la mayor fuente de estos derrames (Flores *et al.*, 2004).

La presencia de hidrocarburos en México ha sido motivo de preocupación tanto por sus efectos en el ambiente como por sus riesgos a la salud. De acuerdo con estadísticas de la PROFEPA, cada año ocurren en el país un promedio de 600 emergencias ambientales asociadas con materiales y residuos peligrosos, principalmente petróleo y sus derivados (gasolinas, combustóleo, diesel), agroquímicos, gas LP y natural, entre otros. Las tomas clandestinas de hidrocarburos actualmente constituyen una de las fuentes más importantes de contaminación de suelos, a este respecto, Pemex informó que las tomas clandestinas en el

país ascendían a mil 163 en el año 2011 (Riojas-Rodríguez *et al.*, 2013) y se estima que el número de ellas es mucho mayor a las registradas.

Entre los años 2002 y 2010, 91% de los productores agrícolas de Acatzingo, Puebla, consideró que hubo efectos negativos a los suelos de cultivo, árboles y animales, debido a derrames de hidrocarburos. Esto trajo como consecuencia disminución en la producción, ingresos y calidad de vida, asimismo, como producto de los derrames se desencadenaron procesos irregulares de producción, impacto en la salud, en la economía y en la organización familiar (Rivera-Pineda, 2011). La Comisión Nacional de Hidrocarburos estimó que entre 2006 y 2012 en el estado de Puebla se derramaron 6.91 billones de barriles de petróleo (CNH, 2013).

Los contenidos de petróleo en el suelo mexicano son variables, se han reportado concentraciones de hasta 100000 y 323000 mg·kg⁻¹ de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) (Ortiz, 1999; Rivera-Cruz *et al.* 2002). Estas concentraciones rebasan los límites máximos permisibles especificados en la norma ambiental mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2012, resumidos en la Tabla 1

Tabla 1. Límites máximos permisibles para hidrocarburos en suelos de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2012

Fracción de Hidrocarburos	Uso predominante del suelo		
	Agícola, forestal, recreativo y de conservación	Residencial, comercial	Industrial
Ligera	200	200	500
Media	1200	1200	5000
Pesada	3000	3000	6000

La existencia de tres fases en el suelo contaminado con hidrocarburos: líquida, gaseosa y sólida (Bidner, 2001), así como la gran diversidad de materiales que pueden constituirlo, lo convierten en un compartimento ambiental muy complejo. La distribución de los hidrocarburos dependerá de sus características y de sus interacciones con los diferentes constituyentes del suelo, los compuestos de elevada hidrofobicidad como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y los aceites minerales se encontrarán adsorbidos sobre el

particulado o la materia orgánica. Los medianamente solubles formarán dispersiones hidrocarburo-agua, los menos hidrofóbicos y solubles se encontrarán en disolución acuosa y por último los más volátiles se encontrarán en fase de vapor (Thapa *et al.*, 2012). Asimismo, la viscosidad determinará su migración vertical, de modo tal que los componentes más viscosos como petróleo crudo, combustóleo, aceites, lodos aceitosos y lodos de perforación permanecen en las capas superficiales y los menos viscosos incluso serán capaces de llegar a los mantos freáticos (Saval, 1995). Los hidrocarburos que se encuentran en la superficie pueden ser transformados fisicoquímica o biológicamente (Sharma y Parley, 2020).

El nivel de contaminación depende del tipo de suelo, de su porosidad y textura, así como de las características fisicoquímicas de los hidrocarburos, de su composición, su solubilidad en agua, la volatilidad y la interacción con los constituyentes del suelo. El petróleo y los hidrocarburos se adsorberán o penetrarán con mayor o menor fuerza y por lo tanto permanecerá mayor o menor tiempo en ese ambiente. En suelos arenosos la penetración es mayor en cuanto a cantidad y velocidad, alcanzándose en ocasiones las aguas subterráneas, no así en suelos arcillosos en los que debido a lo fino del grano la penetración es a poca profundidad, por lo que las técnicas de remediación pueden ser tan simples como lavado o recolección (Rahman *et al.*, 2003; Nadal *et al.*, 2009).

Los derrames de petróleo e hidrocarburos pueden causar un daño considerable a los recursos biológicos en una variedad de formas: mortalidad directa o indirecta, estrés oxidativo (oxidación de proteínas), inhibición de crecimiento e incorporación de sustancias potencialmente cancerígenas o mutagénicas en las cadenas tróficas, entre otras (Martí *et al.*, 2009; Thapa *et al.*, 2012).

3.2 REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS

En documentos oficiales mexicanos, el término remediación se utiliza para referirse a aquellas acciones aplicadas a suelos y acuíferos que conduzcan a la reducción de los niveles de contaminación. La norma NOM-EM-138-ECOL-2012 define restauración como el conjunto de actividades tendientes a la recuperación y restablecimiento de las condiciones

que propician la evolución y continuidad de los procesos naturales. En relación con el suelo, se entiende como el conjunto de acciones necesarias para recuperar y restablecer sus condiciones, con el propósito de que éste pueda ser destinado a alguna de las actividades previstas en el programa de desarrollo urbano o de ordenamiento ecológico que resulte aplicable para el predio o zona respectiva; en el mismo documento, se utiliza esta definición como sinónimo de remediación.

Se han desarrollado un gran número de opciones de remediación para suelos contaminados (Maldonado-Chávez *et al.*, 2010; Thapa *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2016), mismas que se pueden clasificar de acuerdo a diferentes principios algunas de ellas suponen una solución temporal, otras el traslado del contaminante a otro compartimento ambiental y un tercer grupo comprende a aquéllas que pueden transformar los contaminantes en productos inocuos por medio de reacciones químicas o bioquímicas (Exner, 1994; Alexander, 1999; Klein, 2000; Lagrega *et al.*, 2001; EPA, 2001; PROFEPA, 2003).

En la Tabla 2 se enlistan las principales técnicas de remediación y recuperación de suelos en base al efecto que estas tienen sobre los contaminantes.

Tabla 2. Clasificación de las tecnologías de remediación en base a su efecto en el contaminante

Efecto	Tecnologías
Retención	Confinamiento en celdas. Barreras impermeables. Fijación
Extracción o separación	Filtración por carbón activado Lavado con agentes tensoactivos Extracción de producto libre Extracción de vapores
Trasformación	Biorremediación Fitorremediación Incineración

Las tablas hacen alusión a tecnologías recogidas en las referencias revisadas

Una segunda forma de clasificación de las técnicas de recuperación y remediación de suelos se hace en base a su principio de funcionamiento, biológico o fisicoquímico (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de las tecnologías de remediación según su principio de funcionamiento

Principio	Tecnologías
Biológico	Biorremediación: <i>bioestimulación, bioaugmentación, biodegradación aerobia, biodegradación anaerobia. Composteo</i> Fitorremediación
Fisicoquímico	Solidificación Estabilización Extracción de vapores Desorción por inyección de vapor Incineración

La remediación de suelos puede tener diferentes objetivos, sin embargo, aspectos como costos y tiempos de implementación, ejecución y obtención de resultados son los factores más importantes para la toma de decisiones (Klein, 2000; Lagrega *et al.*, 2001; EPA, 2001). Las principales ventajas y desventajas de las diferentes técnicas de recuperación y remediación de suelos se listan en la Tabla 4 (PROFEPA, 2003).

3.2 BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación puede ser definida como el uso de organismos vivos, componentes celulares y enzimas libres, con el fin de realizar una mineralización o una transformación parcial de los residuos o de agentes contaminantes (Santos *et al.*, 2016). Los organismos utilizan los contaminantes como fuente de carbono y de energía (Sharma y Padey, 2020), para lo cual los hidrolizan secretando enzimas que los transforman en compuestos más simples que les permiten incorporarlos a sus procesos metabólicos (Cubitto *et al.*, 2004). A pesar de que la investigación en el campo de la biorremediación comenzó y se ha desarrollado desde hace décadas, actualmente la remediación exitosa de suelos contaminados con petróleo e hidrocarburos representa aún un reto (Rahman *et al.*, 2003).

Tabla 4. Ventajas y desventajas de las principales técnicas de remediación de suelos contaminados

Técnica	Ventajas	Desventajas
Arrastre por aire	Se logra la recuperación de contaminantes. Es efectiva y de bajo costo de operación	Uso limitado para compuestos volátiles
Extracción al vacío	Se logra la recuperación de contaminantes volátiles	Uso ilimitado para compuestos volátiles. Los contaminantes no se destruyen por lo que se deben acoplar a otras tecnologías
Solidificación/Estabilización	Es útil para tratar contaminantes que no pueden ser destruidos ni transformados	El suelo pierde algunas de sus propiedades originales
Lavado de suelo	Se logra la extracción de sustancias contaminantes	Es una tecnología costosa. Se utiliza en procesos exsitu. Se utilizan solventes orgánicos. Existe un alto riesgo de explosión. Los contaminantes no se destruyen por lo que se deben acoplar a otras tecnologías
Desorción Térmica	Se logra la recuperación de contaminantes. El costo es menor al de incineración. El suelo puede ser reutilizado	Se utiliza en procesos exsitu. No funciona para suelos contaminados con petróleo
Arrastre de vapor	Se extraen sustancias contaminantes	No funciona ante una contaminación con petróleo. Generación de ruido. Los contaminantes no se destruyen por lo que se deben acoplar a otras tecnologías
Incineración	Sirve para la destrucción de residuos peligrosos y contaminantes en grandes concentraciones	Uso ilimitado para sustancias orgánicas. Requiere sistemas de emisiones. Requiere de confinamiento
Confinamiento	Se dispone de sustancias peligrosas que no pueden ser transformadas ni tratadas	No es opción de remediación. En México no hay instituciones seguras. Alto costo. Se utiliza en demostraciones a escala
Vitrificación	Por mediación de microorganismos	Costo mayor a la incineración. Solo se utiliza en demostraciones a escala. Dificilmente funciona cuando los contaminantes están absorbidos en el material geológico o la zona es de baja permeabilidad
Biorremediación	Se logra la transformación de contaminantes. Puede adaptarse a las necesidades de cada sitio	Requiere de mucho tiempo. Existe riesgo de inhibición de los microorganismos

Fuente: PROFEPA, 2003

Las técnicas de biorremediación incluyen la bioestimulación, bioaugmentación, degradación aerobia, degradación anaerobia y composteo (Thapa *et al.*, 2012). La tecnología de la

biorremediación, basada en la utilización de microorganismos tiene ciertas ventajas respecto a los métodos fisicoquímicos (Alexander, 1999; PROFEPA, 2003) tanto por su menor costo económico (Das y Mukherjee, 2007; Thapa *et al.*, 2012), como por la no afectación de otros compartimentos ambientales y la optimización de los recursos (Exner, 1994; Klein, 2000). Se trata de la técnica más utilizada para la remediación *in situ* de suelos contaminados con petróleo e hidrocarburos (Cubitto *et al.*, 2004) dado que evita o disminuye las desventajas y limitantes económicas y técnicas que poseen otras técnicas físicas o químicas (Das y Mukherjee, 2007). La biorremediación puede ocurrir naturalmente en el suelo por acción de los microorganismos nativos o puede propiciarse por la adición de microorganismos especializados y fertilizantes, esto último conocido con el nombre de *land farming* (Thapa *et al.*, 2012).

Una de las limitaciones que presentan las técnicas biológicas respecto a las técnicas fisicoquímicas es el tiempo necesario para alcanzar una biodegradación aceptable, ya que durante la biorremediación se tiene una ralentización del proceso debida a la baja biodisponibilidad de los contaminantes (Alexander, 1999; PROFEPA, 2003). Sin embargo, las técnicas fisicoquímicas, aun pudiendo ser más rápidas y efectivas en la disminución de la concentración de contaminantes, alteran o eliminan por completo la microbiota autóctona del suelo; además modifican las características fisicoquímicas del suelo y algunas no eliminan los contaminantes, si no que los trasladan a otro compartimento ambiental (Cubitto *et al.*, 2004).

Durante la biorremediación, los microorganismos presentes en el suelo (ya sean nativos o adicionados) primero solubilizan a los hidrocarburos a través de la producción de biosurfactantes y bioemulsificantes, haciéndolos biodisponibles para entonces atacar enzimáticamente las estructuras químicas para utilizarlas como fuentes de carbono y de energía (Thapa *et al.*, 2012; Sharma y Padey, 2020). La elevada complejidad de la composición del crudo de petróleo y derivados implica la existencia de una amplia capacidad enzimática si se quiere conseguir una degradación significativa del crudo. La mayor parte de los estudios realizados se han llevado a cabo con cepas bacterianas individuales o con la combinación de diferentes cepas aisladas en lo que se conoce como cultivos mixtos. Dado

que los alcanos son los componentes más abundantes del petróleo, la mayoría de las cepas empleadas a la fecha son degradadoras de este tipo de compuestos de enlaces sencillos (Pi et al, 2017; Sharma y Padey, 2017). En algunos casos, los microorganismos tienen la capacidad de oxidar las cadenas alquílicas de ciertos policíclicos aromáticos alquilados que también se encuentran presentes en el petróleo, no obstante, pocos microorganismos de los reportados en la literatura son capaces de romper al anillo aromático (Santos *et al.*, 2016). Se han descrito algunas cepas de microorganismos con la capacidad de degradar tanto HAPs de elevado peso molecular, como alcanos, sin embargo, esto no parece ser algo generalizado y aquellos degradadores de HPA no son capaces de utilizar alcanos como fuentes de carbono y energía, por ello, algunos autores refieren mejores resultados por el uso de cultivos mixtos (Komukai-Nakamura *et al.*, 1996; Thapa *et al.*, 2012).

3.3 BIODISPONIBILIDAD

Parte de los hidrocarburos presentes en suelos contaminados es biodegradable, sin embargo, las tasas de biodegradación de éstos se ven limitadas por su hidrofobicidad, baja solubilidad en agua, su adsorción y absorción en las rocas constitutivas del suelo y al grado de intemperización (Roldán-Carrillo *et al.*, 2012). Dado que el petróleo crudo es una mezcla compleja de hidrocarburos, este presenta una pobre biodisponibilidad (Sharma y Padey, 2020). El petróleo en el suelo contaminado conforma una fase líquida que puede estar en dispersión en la fase acuosa o en forma de película adherida a la superficie de las partículas del suelo (Cubitto *et al.*, 2004). Todo lo anterior limita la biodisponibilidad de los hidrocarburos, por lo que, para mejorar el proceso de biodegradación, se han desarrollado estrategias para incrementar la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos mediante la adición de tensoactivos y por lo tanto aumentar su biodisponibilidad (Van *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2016; Sharma y Pandey, 2020).

3.4 USO DE SURFACTANTES EN LA BIORREMEDIACIÓN

Los surfactantes o agentes tensoactivos son compuestos activos en superficies, su nombre proviene del acrónimo en inglés surfactant, de surface - superficie, active - activo) y ante. Su molécula está compuesta de porciones hidrofóbicas (generalmente cadenas lipídicas) y porciones hidrofílicas (Banat et al., 2010; Amani et al., 2010; Gudiña et al., 2015). Actúan

como detergentes, emulsionantes o humectantes; debido a su naturaleza anfifílica, también conocida como anfipática, se distribuyen en las interfases aceite/agua o agua/aire o entre fases con diferente grado de polaridad y ejercen influencia en la zona de contacto que se crea entre dos fases (Mukherjee y Das, 2010; Sousa et al., 2014).

Son capaces de aumentar la solubilidad de los hidrocarburos al modificar ciertas propiedades fisicoquímicas como la tensión superficial de la fase acuosa, la tensión interfacial hidrocarburo-agua e hidrocarburo-suelo, el ángulo de contacto entre fases y la mojabilidad del hidrocarburo sobre la roca que constituye el suelo (Vaz et al., 2011; Sousa et al., 2014). Al distribuirse en la interfase, impiden que las moléculas de aceite interactúen entre sí por lo que se ven imposibilitados para formar gotas o agregados de mayor tamaño (Santos et al., 2016; Sharma y Pandey, 2020).

En solución, los surfactantes se adsorben a las interfases disponibles, entonces su concentración en forma mono-molecular aumenta hasta que se forman las primeras micelas (Santos *et al.*, 2016). Los surfactantes poseen una gran variedad de aplicaciones industriales como emulsificantes, desemulsificantes, agentes humectantes, formadores de espuma y se emplean como detergentes. Su utilización en biorremediación de suelos y recuperación mejorada de petróleo cada vez gana más importancia (Aguilar, 2014)

Con el uso de surfactantes se aumenta la remoción y velocidades de biodegradación de hidrocarburos, por lo que diversos autores los han propuesto en la biorremediación de suelos (Zeppieri *et al.*, 2009; Banat *et al.* 2010). Los tensoactivos incrementan la dispersión y solubilización acuosa de los compuestos de baja solubilidad en varios órdenes de magnitud y aumentan la hidrofobicidad de la superficie celular, necesaria para la adhesión al hidrocarburo y para la toma de nutrientes a partir de estos. No obstante, la biodegradación de compuestos de baja solubilidad puede estar inhibida por el uso de tensoactivos sintéticos como resultado de un efecto tóxico a concentraciones elevadas (Rahsepar, *et al.*, 2016; Pi *et al.*, 2017).

La mayoría de los surfactantes no resultan ser biodegradables, por lo que son considerados compuestos ecotóxicos ya que afectan directamente las características del medio ambiente

en el cual son desechados los productos que lo contienen (Makkar y Cameotra, 2011). Debido a esto, recientemente se está optando por ir sustituyendo el uso de surfactantes sintéticos por aquellos producidos por vía microbiológica (Banat *et al.*, 2010).

3.5 BIOSURFACTANTES

Los biosurfactantes son compuestos anfífilos de superficie-activa que pueden ser secretados por bacterias, levaduras y hongos (Banat, 1995; Calcavante *et al.*, 2008; Banat *et al.*, 2010) o permanecer adheridos a la superficie celular de estos microorganismos (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008), siendo las bacterias los microorganismos a partir de los cuales se obtienen la mayoría de estos compuestos (Calcavante *et al.*, 2008) (Tabla 5). Los biosurfactantes, como cualquier agente tensoactivo, poseen porciones hidrofílicas e hidrofóbicas (Banat, 1995; Vaz *et al.*, 2011), la porción hidrofílica se compone de aminoácidos o péptidos, aniones o cationes, o mono, du o polisacáridos (Banat, 1995). La región hidrofóbica generalmente está constituida de ácidos grasos saturados, insaturados o hidroxilados (Banat *et al.*, 2010).

3.5.1 CLASIFICACIÓN

De manera general, los biosurfactantes pueden ser clasificados en base a su estructura y el tipo de microorganismo que lo produce (Santos *et al.*, 2016). Algunos autores los agrupan en glicolípidos de peso molecular entre 500 y 1500, aminoácidos y lipoproteínas, también conocidos como lipopéptidos (Spoeckner *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000; Nakata, 2000; Bodour, 2002); ácidos carboxílicos y por último tenemos a los polímeros de peso molecular de 50000 a 1000000 (Banat, 1995; Desai y Banat., 1997; Bodour, 2002). Estos últimos pueden ser una mezcla de carbohidratos, proteínas y lípidos, sin embargo, se ha observado que no disminuyen de manera apreciable la tensión interfacial (Banat *et al.*, 2010). Los biosurfactantes de alto peso molecular, a pesar de ser menos efectivos para reducir la tensión superficial, son eficientes para cubrir las gotas de hidrocarburos e impedir que éstas se unan, emulsionando así a estas sustancias y aumentando su área superficial, asimismo se caracterizan por poseer elevada afinidad por las mezclas de hidrocarburos alifáticos y aromáticos (Banat *et al.*, 2010).

3.5.2 PROPIEDADES TENSOACTIVAS Y ESTABILIDAD

Los biosurfactantes poseen diversidad estructural, alta biodegradabilidad, baja toxicidad en relación con aquellos derivados de aceites minerales, actividad de superficie y de auto ensamblado (Tabla 5). Asimismo, tienen el potencial para ser empleados como tensoactivos ecoamigables (Lai *et al.*, 2009; Bana *et al.*, 2010; Mukherjee y Das, 2010; Sachdev and Cameotra, 2013) y han sido propuestos en aplicaciones petroquímicas como la recuperación mejorada de crudo y ambientales como la biorremediación de sitios contaminados, remoción de metales pesados, manejo de derrames de petróleo y aceites, dispersión de derrames (Dehghan-Noudeh *et al.*, 2005) y remoción de otros contaminantes (Banat, 1995; Cavalcante *et al.*, 2008; Banat *et al.*, 2010; Vaz *et al.*, 2011). Se han empleado biosurfactantes ramnolipídicos en combinación con tratamientos enzimáticos (enzimas de *Penicillium simplicissimum* y *Penicillium brevicompactum*), para la depuración de suelos contaminados con grasa permitiendo además mejorar la producción de metano, alcanzando una remoción de grasa de 51 a 90 % (Damasceno *et al.*, 2014).

El interés por los surfactantes producidos biológicamente se ha visto incrementado en los últimos años debido a que además de movilizar y solubilizar líquidos en fase no acuosa absorbidos en los constituyentes del suelo, poseen más altas selectividad y actividad específica bajo condiciones extremas, en comparación con aquellos obtenidos de manera sintética (Santos *et al.*, 2016).

Asimismo, y debido a sus porciones hidrofílica e hidrofóbica pueden acumularse entre fases fluidas tales como petróleo-agua o aire-agua reduciendo la tensión interfacial y superficial de soluciones acuosas y mezclas de hidrocarburos formando emulsiones (Desai y Banat, 1997; Vaz *et al.*, 2011), aumentan la solubilidad del crudo e hidrocarburos formando micelas (Cubitto *et al.*, 2004). Al disminuir las tensión superficial e interfacial en las interfaces, favorecen el mezclado de las dos fases líquidas inmiscibles petróleo y agua (Al-Bahry *et al.*, 2013). Se ha propuesto tres mecanismos principales de acción de los biosurfactantes en la biodegradación de hidrocarburos: aumentar la superficie de contacto de los sustratos hidrófobos insolubles en agua, aumentar la biodisponibilidad de los sustratos hidrófobos al

umentar su solubilidad aparente y por último influir en la adhesión de los microorganismos a las superficies de estos compuestos (Kapellos, 2017).

Tabla 5. Tipos de biosurfactantes y los microorganismos que los producen

Tipo de biosurfactante	Microorganismos productores	Aplicaciones	Referencias
<i>Glicolipídios</i>			
Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Degradación de hexaclorociclohexano y otros organoclorados como DDT y ciclodienos	Nitschke y Pastore, 2004
Sophorolípidos	<i>Torulopsis bombicola</i>		Cortés-Camargo y Barragán-Huerta, 2013
Trehalolípidos	<i>Rhodococcus erythropoli</i> <i>Mycobacterium sp.</i>		Yañez-Ocampo <i>et al.</i> , 2013
<i>Lipopéptidos y Lipoproteínas</i>			Abdel <i>et al.</i> , 2008
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Emulsión y solubilización de hidrocarburos o compuestos insolubles en agua	Amani <i>et al.</i> , 2010
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>		Deleu <i>et al.</i> , 1999
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>		Ghojavand <i>et al.</i> , 2008
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>		Ghribi <i>et al.</i> , 2011
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>		Gudiña <i>et al.</i> , 2015
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>		Hadad <i>et al.</i> , 2009
<i>Ácidos grasos, lípidos neutros y fosfolípidos</i>			Shao <i>et al.</i> , 2015
<i>Ácidos grasos, lípidos neutros y fosfolípidos</i>			Sousa <i>et al.</i> , 2014
<i>Ácidos grasos, lípidos neutros y fosfolípidos</i>		Remoción de metales pesados tóxicos como el uranio, el cadmio y el plomo en arenas contaminadas	Desai y Banat, 1997
<i>Polímeros</i>			
Emulsán	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Estos surfactantes son indispensables en procesos donde están involucrados macromoléculas naturales como en la deshidratación de petróleo	Rahman y Gakpe, 2008
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		
Liposan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		
Carbohidrato-lípido-proteína	<i>Candida lipolytica</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>		

En comparación con tensoactivos sintéticos, los biosurfactantes presentan mayor estabilidad frente a condiciones extremas de temperatura, pH y concentración de NaCl (Makkar *et al.*, 2011). En cuanto a su estabilidad térmica, algunos biosurfactantes han sido capaces de soportar las condiciones de esterilización por calor húmedo (121 °C durante 20 minutos) sin una pérdida significativa de su actividad surfactante (Vaz *et al.*, 2011).

La estabilidad de los biosurfactantes y su capacidad de reducir la tensión superficial e interfacial, se encuentra supeditada a las condiciones ambientales como el pH del medio, la temperatura y la salinidad de éste (Al-Bahry *et al.*, 2013; Sharma y Padey, 2020). El estudio del comportamiento de surfactantes y biosurfactantes ha cobrado importancia en los últimos años debido a que el entendimiento de éste, a diferentes condiciones ambientales puede ser un indicativo de su efectividad como coadyuvante en los diferentes procesos en que son empleados, como lo es la recuperación adicional o mejorada de petróleo (EOR por las siglas en inglés de Enhanced Oil Recovery) y la biorremediación de suelos. Por esta razón, se han desarrollado diversas técnicas para la medición y determinación de sus propiedades tensoactivas (Del Gaudio *et al.*, 2008; Karasawa *et al.*, 2007; Sharma y Padey, 2020).

Además de la tensión superficial e interfacial, los biosurfactantes son capaces de modificar la mojabilidad de la fase orgánica sobre la roca y estructuras porosas del suelo (Bidner, 2001). Debido a lo anterior, los biosurfactantes son capaces de aumentar la biodisponibilidad de los componentes hidrofóbicos presentes en crudo y sus derivados (Roldán-Carrillo *et al.*, 2011). En la mayoría de los trabajos que se reporta la efectividad de los biosurfactantes en la remoción de petróleo e hidrocarburos, el parámetro utilizado es la tensión superficial (Zeppieri *et al.* 2001; Gorevski *et al.*, 2008; Mejía, 2009), sin embargo algunos estudios agregan que la determinación de parámetros como la tensión interfacial petróleo-agua, el ángulo de contacto y la mojabilidad del hidrocarburo en la roca, son más importantes dado que con ellos se tiene una mejor descripción de las interacciones hidrocarburo-agua-suelo (Mejía, 2009; Sharma y Padey, 2020).

3.5.1 PRODUCCIÓN Y RECUPERACIÓN

Los biosurfactantes pueden ser producidos a partir de fuentes naturales, a partir de sustratos renovables y a partir de compuestos relativamente baratos y solubles en agua como glucosa, sacarosa, glicerol o etanol (Desai y Banat, 1997; Dehghan-Noudeh *et al.*, 2005). Pueden ser producidos por fermentación sumergida en lotes o lotes alimentados. En algunos casos, la producción está relacionada con el incremento de la densidad celular y el principio de la fase estacionaria. Los rendimientos de producción de biosurfactantes por gramo de biomasa,

depende del sustrato utilizado y su disponibilidad, de las condiciones ambientales y la fase de crecimiento del microorganismo (Ron y Rosenberg, 2002).

En su mayoría, los biosurfactantes se producen aeróbicamente, por lo que el suministro de oxígeno se hace insuflando aire estéril al medio de cultivo. En muchas ocasiones, la aireación provoca la formación de espuma en la que los biosurfactantes se ven distribuidos al ser esta una dispersión gas/líquido, en la que cada burbuja comprenderá una interfase. La formación de espuma es un problema común a muchas fermentaciones microbianas, siendo particularmente pertinente cuando se producen biosurfactantes. El fraccionamiento de espuma se ha aplicado con éxito como estrategia para la concentración y separación de estos agentes tensioactivos (Thitima *et al.*, 2010; Winterbur y Martin, 2012). Al recuperar la espuma producida durante una fermentación microbiana, las adiciones químicas de antiespumantes se hacen innecesarias, y puede ser posible integrar la producción y recuperación de biosurfactante en un solo paso (Davis *et al.*, 2001).

En lo relativo a su producción industrial, los biosurfactantes pueden obtenerse en cultivos sumergidos en lote, en lote alimentado, así como en continuo (Kronenberg *et al.*, 2010; Noh *et al.*, 2012). Entre los factores que condicionan los niveles de producción, rendimiento y productividad se encuentran la cepa de trabajo y el medio de cultivo (Akpa *et al.*, 2001), así como las relaciones carbono/nitrógeno, carbono/magnesio y carbono/hierro (Roldán-Carrillo *et al.*, 2011).

La biosíntesis es el paso limitante para la producción de biosurfactantes a escala industrial. Para tener un proceso de producción económicamente competitivo, es recomendable el uso de sustratos económicos o de desecho como los residuos agroindustriales (la fuente de carbono constituye entre 10 y 30% de los costos de producción). Además de la selección del microorganismo productor, la optimización del medio y condiciones de cultivo (pH, temperatura y velocidad de aireación) juegan un papel importante (Mukherjee *et al.* 2006).

Los procesos de separación representan el 60% de los costos de operación, por lo que el diseño del tren de separación y purificación resulta un punto crítico en la obtención de

biosurfactanes. Los métodos de separación y purificación de biosurfactantes dependen de sus características fisicoquímicas, así como del proceso de fermentación y si la molécula es producida de forma intracelular, extracelular o permanece anclada a la membrana (Tabla 6). Generalmente el uso de un único método de purificación no es suficiente, por lo tanto, se requieren de varias etapas (Valenzuela Ruiz *et al.*, 2020).

Tabla 6. Métodos de separación y purificación de biosurfactantes

Microorganismo productor	Método de separación	Descripción	Referencias
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Precipitación ácida	El pH se ajustó a 2 con HCl y se incubó durante toda la noche	Hsieh <i>et al.</i> , 2004
	Precipitación ácida	El pH se ajustó a 2 con HCl y se incubó durante toda la noche, centrifugación y secado a 70°C	Abdel-Mawgoud <i>et al.</i> , 2008
<i>B. subtilis</i>	Extracción líquido-líquido	Extracción con acetato de etilo	Alajlani <i>et al.</i> , 2016
	Cromatografía de adsorción/elución	Columna C ₁₈ como fase sólida y gradiente de acetonitrilo para elución de fracciones lipopeptídicas	Alajlani <i>et al.</i> , 2016
<i>B. mojavensis</i>	Ultrafiltración	Separación en membrana de 10 kDa	Hmidet <i>et al.</i> , 2017
<i>B. megaterium</i>	Ultrafiltración	Separación en membrana de 10 kDa	Ma <i>et al.</i> , 2016
<i>B. velezensis</i>	Extracción líquido-líquido	Extracción con acetato de etilo	Grady <i>et al.</i> , 2019

Adaptada de Valenzuela Ruiz et al., 2020

La purificación acida consiste en disminuir el pH del caldo de cultivo, de modo que las cargas negativas del lipopéptido son neutralizadas, disminuyendo su solubilidad en la fase acuosa, lo que resulta en la precipitación. Actualmente se han propuesto métodos de separación más eficientes como la cromatografía y la ultrafiltración con membranas (Montagnolli *et al.*, 2015). La primera consiste en pasar la mezcla de lipopéptidos a través de una columna donde los biosurfactantes interactúan con un adsorbente sólido y quedan retenidos en este; a este respecto se ha reportado que la columna C₁₈ es eficiente para la adsorción de lipopéptidos.

En últimos años la separación con membranas, concretamente la ultrafiltración ha cobrado importancia. La eficacia de la ultrafiltración está supeditada a la formación de micelas, fenómeno dependiente del pH y la concentración del lipopéptido. Para la purificación del lipopéptido surfactina, se ha propuesto el uso de membranas de tamaño de corte de entre 10kDa y 100 kDa (Jauregi y Kourmentza, 2019).

3.6 SURFACTINA

Es un lipopéptido cíclico bacteriano producido por algunas cepas de *Bacillus subtilis*, constituido por una fracción peptídica cíclica de siete aminoácidos y una porción hidrofílica, siendo esta un β -hidroxiácido de ente 12 y 15 carbonos (Figura 1). El peso molecular de la surfactina es de $1036.34 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. El principal ácido graso conjugado es el 3-hidroxi-13-metil-tetradecanoico unido al anillo peptídico por un enlace lactónico. Su biosíntesis lleva a la obtención de tres isoformas diferenciadas entre sí por el séptimo aminoácido (Montagnoli et al., 2015; Santos et al., 2016; Valenzuela-Ruíz *et al.*, 2020).

La surfactina natural es una mezcla de isoformas que difieren levemente en sus propiedades fisicoquímicas debido a variaciones en el tamaño de la cadena lipídica, la unión de su componente hidroxiácido graso y las sustituciones de los aminoácidos que componen el anillo. Dichas variaciones dependen de la cepa y de las condiciones nutricionales y ambientales, más que de la determinación genética (Santos *et al.*, 2016; Jauregi y Kourmentza, 2018).

La actividad tensoactiva de la surfactina depende tanto de la composición de los aminoácidos como de la secuencia peptídica y de la naturaleza de su parte lipídica. Las sustituciones de aminoácidos son responsables de cambios significativos en sus propiedades provocados por la modificación de la distribución polar/apolar y/o la accesibilidad de los grupos carboxílicos a los cationes del medio.

La surfactina está reconocida como uno de los biosurfactantes más efectivos, es capaz de disminuir la tensión superficial del agua de $72 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ a $27 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ a concentraciones tan bajas como 0.005%, asimismo es capaz de reducir la tensión interfacial del sistema de

agua/hexadecano de $43 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ a valores inferiores a $1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008). En comparación con otros biosurfactantes y tensioactivos sintéticos, como el dodecilsulfato de sodio SDS y el bromuro de trimetilamonio BTA, posee una capacidad mayor para reducir las tensiones superficial e interfacial y presenta valores más bajos de concentración micelar crítica (Pereira *et al.*, 2013).

B. subtilis crece y produce surfactina en diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno, bajo condiciones mesofílicas y termofílicas, 30 y 45 °C, respectivamente. Debido a que la surfactina se produce en bajas concentraciones, se han desarrollado trabajos para incrementar rendimientos. Cooper (1981) desarrollaron un método para producir surfactina por medio de la remoción de espuma al probar obteniendo un rendimiento de 0.7 a 0.8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Yeh *et al.* (2006), desarrollaron un método adicionando hierro en altas concentraciones obteniendo rendimientos de 3.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

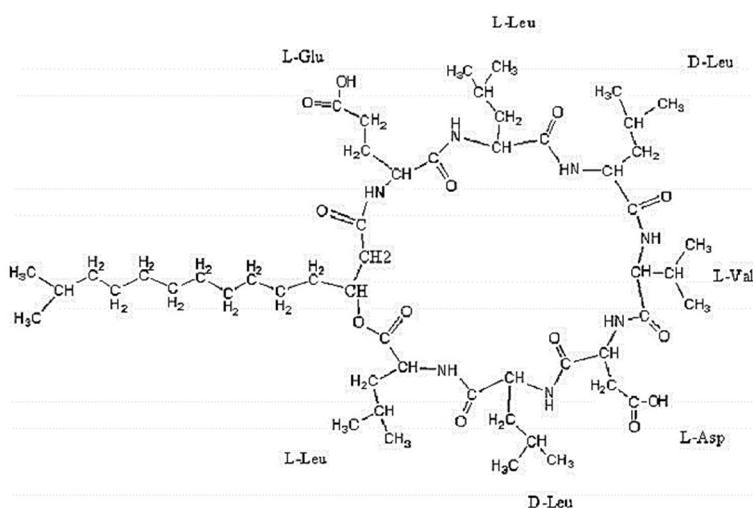


Figura 1. Estructura de la principal isoforma de la surfactina, en la que el séptimo aminoácido es una valina. La porción lipídica se compone de una cadena de 12 carbonos (Montagnoli *et al.*, 2015).

La surfactina se ha utilizado en aplicaciones médico-farmacéuticas, en la inhibición de formación de coágulos; posee actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral y antitumoral, asimismo provoca la formación de canales iónicos en la membrana celular (Santos *et al.*, 2016). En aplicaciones ambientales, la surfactina en forma cruda ha sido empleada para la

biodegradación mejorada de sedimentos de combustible en setinas de barcos, encontrándose que al final del proceso solo permanecieron 6.8% y 7.2% de los compuestos alifáticos y aromáticos respectivamente, ya que estos fueron degradados más rápidamente en presencia del biosurfactante, sin embargo, los compuestos entre C₁₇ y C₁₈ no fueron degradados (Fendino *et al.*, 2019). Makkar y Cameotra (1997) reportaron la remoción de un 62% de keroseno impregnado en arena, indicando su factibilidad para ser usado en la remoción de aceites *in situ*. La surfactina es capaz de remover magnesio, manganeso, calcio, bario, litio, rubidio y metales pesados (cobre, cadmio y zinc entre ellos) debido a la presencia de dos cargas negativas aportadas por el aspartato y el glutamato de su cadena de aminoácidos (Thimon *et al.*, 1992). También se ha reportado la remoción de estos metales pesados en agua contaminada, por aplicación de ultrafiltración en presencia de surfactina, siendo la formación de micelas el factor determinante, ya que los metales fueron integrados al interior de estas (Mulligan *et al.*, 1999).

Youssef *et al.* (2007) lograron movilizar y recuperar petróleo *in situ* a partir de reservorios arenosos en presencia de surfactina en concentración de 90 mg·L⁻¹, con lo que se demostró la factibilidad de este biosurfactante en la recuperación mejorada de petróleo, una de las aplicaciones más prometedoras de este bioproducto.

3.7 TENSION INTERFACIAL, MOJABILIDAD Y ÁNGULO DE CONTACTO

La tensión interfacial es la fuerza por unidad de longitud requerida para incrementar el área de contacto entre las fases al lado de una interfase (Bidner, 2001; Mejía, 2009). La mojabilidad es función del fluido mojante, del sólido con el que se encuentre en contacto, de las condiciones de la superficie de éste, así como de la presencia de impurezas sobre ésta (Bidner, 2001; Mejía, 2009). La mojabilidad hidrocarburo-roca está relacionada con la presencia de compuestos polares de naturaleza asfáltica en el petróleo. Estos compuestos, aún en pequeñísimas cantidades son capaces de absorberse en la roca y tornarla mojable por el petróleo (Li *et al.*, 2007).

La energía interfacial entre el sólido y los fluidos no son medibles de forma directa. No obstante, la tensión interfacial y el ángulo de contacto pueden determinarse

experimentalmente, de modo que pueden ser utilizados como una medida de la mojabilidad de la roca. Ángulos cercanos a 180° corresponden a rocas fuertemente mojadas por aceite, ángulos cercanos a 90° representan valores intermedios de mojabilidad mientras que, ángulos menores a 90° son considerados como superficies mojables al agua (Bidner, 2001).

Para el cálculo de la tensión interfacial de sistemas hidrocarburo-agua a diferentes valores de temperatura y presión, se han desarrollado varias técnicas experimentales. Los métodos más empleados y reportados en la literatura son el de la gota colgante (Mejía, 2009) y el método del anillo (Goebel y Lunkenheimer, 1997).

Se han reportado diversos trabajos que en su mayoría se abocan en la mejoría e implementación de las técnicas de medición de la tensión superficial e interfacial por diferentes métodos, en la adsorción y desorción del surfactante en la interfase hidrocarburo-agua, así como en la determinación de la tensión interfacial como función del tiempo o de alguna variable ambiental como el pH, la presión y la temperatura (Fuentes y López de Ramos, 2001; Li *et al.*, 2007; Gorevski *et al.*, 2008). También se han realizado estudios con el fin de analizar la influencia de las sales sobre el efecto tensoactivo de surfactantes y su capacidad de solubilizar y dispersar petróleo (Ghannam, 2008). No obstante, son escasos los trabajos que reporten la tensión interfacial y superficial como resultado de la interacción de dos o más factores ambientales (Al-Sahhaf *et al.*, 2005). A este respecto, Al-Sahhaf *et al.*, 2005, realizaron un estudio complejo en el que evaluaron la influencia de la temperatura, la presión, diferentes salinidades y concentraciones de tres surfactantes químicos, sobre la tensión interfacial de un sistema n-octano-agua con fines de recuperación adicional de crudo, determinaron que la tensión interfacial varío en sus experimentos de manera lineal con la temperatura, la presión y la salinidad, y de manera exponencial con la concentración del surfactante en estudio. Aun cuando los resultados de este trabajo son relevantes, sus aplicaciones se reducen al uso de hidrocarburos modelo, dejando sin despejar la interrogante en el caso de mezclas de hidrocarburos o de fracciones pesadas de petróleo.

En un proceso de biorremediación es importante determinar las propiedades tensoactivas del biosurfactante bajo diferentes condiciones ambientales y tipos de roca, ya que de esto

depende que sea capaz de dispersar los hidrocarburos en la fase acuosa y desorberlos haciéndolos biodisponibles y por tanto su uso pueda favorecer la degradación, la eficiencia del proceso y mejorar los tiempos de tratamiento. Debido a esto, en este trabajo se propone la producción de un biosurfactante a partir de una cepa de *Bacillus subtilis*, su caracterización y el estudio del efecto conjunto de la temperatura, el pH y la salinidad sobre la tensión interfacial de sistemas hidrocarburo-agua y sobre la mojabilidad en sistemas crudo-agua-roca. Asimismo, se propone el empleo de este biosurfactante en la biodegradación de un crudo pesado contaminando arena de caliza, ya que se ha visto que en suelos arenosos la adsorción y adherencia de este tipo de crudos limita liberación y por tanto su biodisponibilidad. El análisis permitirá predecir las condiciones para el uso del biosurfactante en la biorremediación de suelos y en el futuro, ampliar el estudio a otros tipos de suelos.

3.8 REFERENCIAS DEL CAPÍTULO

- Abdel-Mawgoud A., Aboulwafa M. y Abdel-Haleem N. (2008). Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5, *Appl. Biochem and Biotech*, 150, 305-325.
- Adams S. R. H., Domínguez R. V. I. y García H. L. (1999). Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano, *Terra* 17, 159-174.
- Akpa E., Jacques P., Wathelet B., Paquot M., Fuchs R., Budzikiewicz H. y Thonart P. (2001). Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91, 551 - 561.
- Al-Bahry S.N., Al-Wahaibi Y.M., Elshafie A.E., Al-Bemani A.S., Joshi S.J., Al-Makhmari H.S., y Al-Sulaimani H.S. (2013). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery, *Int Biodeterioration y Biodegradation*, 81,141-146.
- Alexander M. (1999). *Biodegradation and Bioremediation*. Segunda edición. Academic Press, Inc., San Diego, USA.
- Al-Sahhaf T., Elkamel A., Suttar A. y Khan A. R. (2005). The influence of temperatura, preassure, salinity and surfactant concentration on the interfacial tensión of the n-octane-water system, *Chemical engineering communications*, 19, 667-684.
- Amani H., Mehrnia M. R., Sarrafzadeh M. H., Haghghi M. y Soudi M. R. (2010). Scale up and application of biosurfactant from *Bacillus subtilis* in enhanced oil recovery, *Appl. Biochemical and Biotechnology*, 162, 510-523.
- Araujo I., Montilla M., Cárdenas C., Herrera L., Angulo N. y Morillo G (2006). Lodos estabilizados y cepas bacterianas en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *INCI*, 31, 268-275.
- Banat I. M. (1995). Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review, *Bioresource Tech*, 51, 1-12.
- Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, Marchant R (2010) Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87, 427–
- Bidner, M. S. (2001). *Propiedades de la roca y los fluidos en reservorios de petróleo*, Eudeba, Buenos Aires.
- Bodour A. A. (2002). *Approaches to assessing microbial communities in soil, two examples : biosurfactant production and phenanthrene degradation*, Tesis de doctorado, Universidad de Arizona.
- CNH (Comisión Nacional de Hidrocarburos). (2013). *Reporte de derrames de petróleo crudo al segundo semestre del 2013*. Disponible en http://www.cnh.gob.mx/_docs/reporte_de_fugas_y_derrames_II_2013.pdf.
- Cortés-Camargo, S y Barragán-Huerta, B. E. (2013). Producción de biosurfactantes por microorganismos halófilos, *Revista Sistemas Ambientales*, 1, 1-8
- Cooper, D. G. (1981). Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42, 5

- Cubitto M. A., Morán A. C., Commendatore M., Chiarello M. N., Baldini M. D. Faustino Siñeriz F. (2004). Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils, *Biodegradation*, 15, 281–287.
- Damasceno F.R., D.M. Freire D.M. y Cammarota M.C. (2014). Assessing a mixture of biosurfactant and enzyme pools in the anaerobic biological treatment of wastewater with a high-fat content, *Environ Technol*, 35, 2035-2045.
- Das K. y Mukherjee A.K. (2007). Differential utilization of pyrene as the sole source of carbon by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains: role of biosurfactants in enhancing bioavailability, *J Appl Microbiol*, 102, 195-203.
- Dehghan-Noudeh G., Housaindokht M. y Bazzaz B. S. F. (2005). Isolation, characterization, and investigation of surface and hemolytic activities of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *The J of Microbiol*, 43, 272-276.
- Del Gaudio L., Pandolfini P., Ravera F., Krägel J., Santini E., Makievski A.V., Noskov B.A., Liggieri L., Miller R. y Loglio G. (2008). Dynamic interfacial properties of drops. Relevant to W/O-emulsionforming systems: A refined measurement apparatus, *Colloids and Surface A: Physicochem Eng Aspect*, 323, 3-11.
- Deleu M., Razafindralambo H., Popineau Y., Jacques P., Thonart P. y Paquot M. (1999). Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*, *Colloids and Surfaces*, 152, 3-10.
- Desai J. D. y Banat I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their comercial potential, *Microbiol and mol biol reviews*, 61, 47 – 64.
- EPA. (2001). A Citizen's guide to phytoremediation. EPA 542-F-01-002.
- Exner J. H. (1994). *Bioremediation: Field Experience*. Lewis publishers. Boca ratón, FL, USA.
- Fenibo, E. O., Ijoma, G. N., Selvarajan, R., & Chikere, C. B. (2019). Microbial surfactants: The next generation multifunctional biomolecules for applications in the petroleum industry and its associated environmental remediation. *Microorganisms*, 7(11), 1–29. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110581>
- Flores M., Torras S., Téllez R. (2004). Medidas de mitigación para suelos contaminados por derrames de hidrocarburos en infraestructura de transporte terrestre. Instituto Mexicano del Transporte. Recuperado de <https://imt.mx/resumen-boletines.html?IdArticulo=273yIdBoletin=91>
- Fuentes J. y López de Ramos A.L. (2001). Nuevo método para medir la tensión superficial mediante la técnica de la gota colgante, *Información Tecnológica*, 12, 181-188.
- Ghannam M. (2008). Experimental investigation of dynamic interfacial tensiono f crude oil-different aqueous Solutions, *J of Chem Eng Of Japan*, 41, 121-129.
- Ghojavand H., Vahabzadeh F., Roayaei E., Shahraki A.K. (2008). Production and properties of a biosurfactante obtained from a member of *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696), *Journal of Colloid and Interface Science*, 324, 172-176.
- Ghribi D. y Ellouze-Chaabouni S. (2011). Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration, *Biotechnology Research International*, 2011, 1-6.

- Goebel A. y Lunkenheimer K. (1997). Interfacial tension of the water/n-alkane interface, *Langmuir*, 13, 369 - 372.
- Gorevski N., R. Miller R. y Ferri J.K. (2008). Non-equilibrium Exchange kinetics in sequential non-ionic surfactant adsorption: Theory and experiment, *Colloids and Surface A: Physicochem. Eng. Aspect*, 323, 12-18.
- Gudiña E. J., Fernandes E. C., Rodrigues A. I., Teixeira J. A. y Rodrigues L. R. (2015). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium, *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-7.
- Haddad N. M., Wang J. y Mu B. (2009). Identification of a biosurfactant producing strain: *Bacillus subtilis* HBO2, *Protein y Peptide Lett*, 16, 7-13.
- Jacott M., Arias J. M., Ireta-Guzmán H. y Franco A. (2011). Impactos de la actividad petrolera en la salud humana y el ambiente, creative commons, recuperado de http://www.mexicotoxico.org.mx/sites/default/files/pdf/documentos/impacto_del_petroleo.pdf
- Jauregi, P., y Kourmentza, K. (2018). Membrane filtration of biosurfactants. In *Separation of Functional Molecules in Food by Membrane Technology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815056-6.00003-6>
- Karasawa, M., Hasegawa T y Narumi T (2007). Measurement of dynamic surface tension of surfactant solutions, *J of the Society of Rheology*, 35, 265-271.
- Kim S. H., Lim E. J., Lee S. O., Lee J. D. y Lee T. H. (2000). Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417, *Biotechnology Appl Biochemistry*, 31, 249-253.
- Klein J. (2000). Possibilities, limits, and future developments of soil bioremediation. En H. J. Rehm y G. Reed (Eds), *Environmental processes II. Soil Decontamination, Biotechnology*, Vol. 11 b. Wiley-VCH. Weinheim, FRG.
- Komukai-Nakamura S., Sugiura K., Yamauchi-Inomata Y., Toki H., Venkateswaran K., Yamamoto S., Tanaka H. y Harayama S. (1996). Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude, *J Ferm Bioeng*, 82, 570-574.
- Kronemberger, F.A., Borges, C.P., Freire, D.M., 2010. Fed-Batch Biosurfactant Production in a Bioreactor. *International Review of Chemical Engineering* 2, 513-518.
- Lagrega M. D., Buckingham P. L., Jeffrey C. J. (2001). *Hazardous waste management*, Segunda edición, McGraw-Hill Companies, New York, USA.
- Lai C.C., Huang Y.C., Wei Y.H., Chang J.S. (2009). Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil, *J Hazard Mater*, 167,609-614.
- Li G., Prasad S. y Dhinojwala A. (2007). Dynamic interfacial tension at the oil/surfactant-water interface, *Langmuir*, 23, 9929-9932.
- Maldonado-Chávez E., Rivera-Cruz M. C., Izquierdo-Reyes F. y Palma-López D. J. (2010). Efectos de rizosfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleo crudo nuevo e intemperizado, *Universidad y Ciencia*, 6(2), 121-136.
- Makkar, R. S., Cameotra, S. S., Banat, I. M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, 1(1), 5. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-5>

Martí C. M., Camejo D., Fernández-García, N., Rellán-Álvarez, R., Marques S., Sevilla F., Jiménez A. (2009). Effect of oil refinery sludges on the growth and antioxidant system of alfalfa plants. *J Hazard Mater*, 171, 879-885.

Mejía S. M. (2009). Determinación de la tensión interfacial agua-decano bajo confinamiento por técnicas de simulación molecular, Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia.

Mukherjee A.K. y Das K. (2010). Microbial surfactants and their potential applications: an overview, *Adv Exp Med Biol*, 672, 54–64.

Mulligan, C. N., Yong, R. N., Gibbs, B. F., James, S., & Bennett, H. P. J. (1999). Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. *Environmental Science and Technology*, 33(21), 3812–3820. <https://doi.org/10.1021/es9813055>

Nadal M., Mari M., Schuhmacher M., Domingo J. L. (2009). Multi-Compartmental Environmental Surveillance of a Petrochemical Area: Levels of Micropollutants, *Environ Int*, 35(2), 227-235.

Nakata, K. (2000). Two glycolipids increase in the bioremediation of halogenated aromatic compounds, *J Biosci and Bioeng*, 89, 577-581.

Nitschke M. y Pastore G. M. (2004). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using cassava processing effluent, *Applied Biochem and Biotech*, 112, 163–172.

Noh, N.A.M., Salleh, S.M., Abdullah, A.A., Yahya, A.R.M., 2012. Fed-batch cultivation of *Pseudomonas aeruginosa* USM-AR2 producing rhamnolipid in bioreactor through pulse feeding strategy. *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering* 40, 168–174.

NOM-138-SEMARNAT/SSA-2012 (2013, septiembre 10). Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación. *Diario Oficial de la Federación de México*.

NOM-EM-138_ECOL-2002 (2002, agosto 20). *Diario Oficial de la Federación de México*.

Ortíz-Brito, O, Ize, I. y Gavilán A. 2003. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta Ecológica* 69, 83-92.

Ortiz C. A. (1999). Biodegradación del petróleo crudo (Maya) en una matriz sólida, en reactores de tipo columna. Tesis Maestría en Ciencias en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Centro de Investigaciones en Biotecnología (CEIB/UAEM), Cuernavaca, Morelos, México.

PFPA (1998). Manual técnico para la aplicación de medidas para la atención de emergencias ambientales. Subprocuraduría de Auditoría Ambiental, Dirección de Emergencias Ambientales, México.

Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., Banat, I.M., 2003. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology* 90, 159–168.

Riojas-Rodríguez, H., Schilman, A., López-Carrillo, L., Finkelman, J., 2013. La salud ambiental en México: situación actual y perspectivas futuras. *Salud Pública de México* 55, 638–649.

Rivera-Cruz M. C, Ferrera-Cerrato R., Volke-Haller V., Fernández-Linares L. y Rodríguez-Vázquez R (2002) Poblaciones microbianas en perfiles de suelos afectados por hidrocarburos del petróleo en el Estado de Tabasco, México. *Agrociencia* 36, 149-159.

Rivera-Pineda F., 2011. Situación socio económica y ambiental de los Productores de Acatzingo Puebla por el derrame de hidrocarburo en sus suelos agrícolas. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Puebla, Puebla, México.

Roldán-Carrillo T., Martínez-García X, Zapata-Peñasco I, Castorena-Cortés G., Reyes-Avila J., Mayol-Castillo M., Olguín-Lora P. (2011). Evaluation of the effect of nutrient ratios on biosurfactant production by *Serratia marcescens* using a Box-Behnken design, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 86, 384–389.

Ron, E. Z., y Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 249–252. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00316-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00316-6)

Sachdev, D.P., Cameotra, S.S., 2013. Biosurfactants in agriculture, *Appl. Microbiol Biotechnol*, 97, 1005–1016.

Santos, D. K., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., y Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 401. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>

Saval, S. (1995). Remediación y restauración. En Pemex: Ambiente y Energía, los retos del futuro, UNAM-Petróleos Mexicanos, México, 151-189.

Shao, C., Liu, L., Gang, H., Yang, S., Mu, B., 2015. Structural Diversity of the Microbial Surfactin Derivatives from Selective Esterification Approach. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 1855–1872.

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

Sousa, M., Dantas, I.T., Feitosa, F.X., Alencar, A.E.V., Soares, S.A., Melo, V.M.M., Gonçalves, L.R.B., Sant'ana, H.B., 2014. Performance of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LAMI005 on the formation of oil / biosurfactant / water emulsion: study of the phase behaviour of emulsified systems. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 31, 613–623.

Spoeckner, S., Wray V., Nimiz M. y Lang S. (1999). Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources, *Appl Microbiol Biotechnol*, 5, 33-39.

Thapa B., Kumar A. y Ghimire A. (2012). A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil, *Kathmandu U J of Sci Eng and Tech*, 8, 164 – 170.

Thimon, L., Peypoux, F., & Michel, G. (1992). Interactions of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis*, with inorganic cations. *Biotechnology Letters*, 14(8), 713–718. <https://doi.org/10.1007/BF01021648>

Thitima Sarachat, Orathai Pornsunthorntawe, Sumaeth Chavadej, Ratana Rujiravanit,(2010). Purification and concentration of a rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using foam fractionation, *Bioresource Technology*, 101, 324-330. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.012>.

Ulrici W. (2000). Contaminated soil areas, different countries and contaminants monitoring of contaminants. En H. J. Rehm y G. Reed (Eds.). *Environmental Processes II. Soil Decontamination*, Biotechnology, Vol 11b. Weinheim.

Van J. D., A. Singh y Ward O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology, *Microbiol Mol Biol Rev*, 67, 503-549.

Valenzuela Ruiz, V., Gálvez Gamboa, G. T., Villa Rodríguez, E. D., Parra Cota, F. I., Santoyo, G., De los Santos Villalobos, S. (2020). Lipopéptidos producidos por agentes de control biológico del género *Bacillus*: revisión de herramientas analíticas utilizadas para su estudio. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(2), 419–432. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i2.2191>

Vaz D. A., Gudiña E. J., Jurado E., Teixeira J. A. y Rodrigues L. R. (2011). Performance of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil as compared to comercial chemical surfactants, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 89, 167-174.

Winterburn, J.B., Martin, P.J. (2012). Foam mitigation and exploitation in biosurfactant production. *Biotechnol Lett* 34, 187–195. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0782-6>

Yañez-Ocampo, G. y Wong-Villareal, A. (2013). Biosurfactantes Microbianos, Producción Potencial con Residuos Agroindustriales de Chiapas, *BioTecnología*, 17(3), 12-28.

Yeh, M.-S., Wei, Y.-H., y Chang, J.-S. (2006). Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 41(8), 1799–1805. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.027>

Youssef, N., Simpson, D. R., Duncan, K. E., McInerney, M. J., Folmsbee, M., Fincher, T., & Knapp, R. M. (2007). In situ biosurfactant production by *Bacillus* strains injected into a limestone petroleum reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1239–1247. <https://doi.org/10.1128/AEM.02264-06>

Zeppieri S., Ramírez Y, Molina J. y López de Ramos A. L. (2009). Estudio experimental de la tensión interfacial transitoria para sistemas Alcanos-Agua-Triton X-100 empleando la técnica de la gota emergente, *Información Tecnológica*, 20(6), 125-135.

4.MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología seguida para la realización de este trabajo se resume en el diagrama de flujos presentado en la Figura 2.

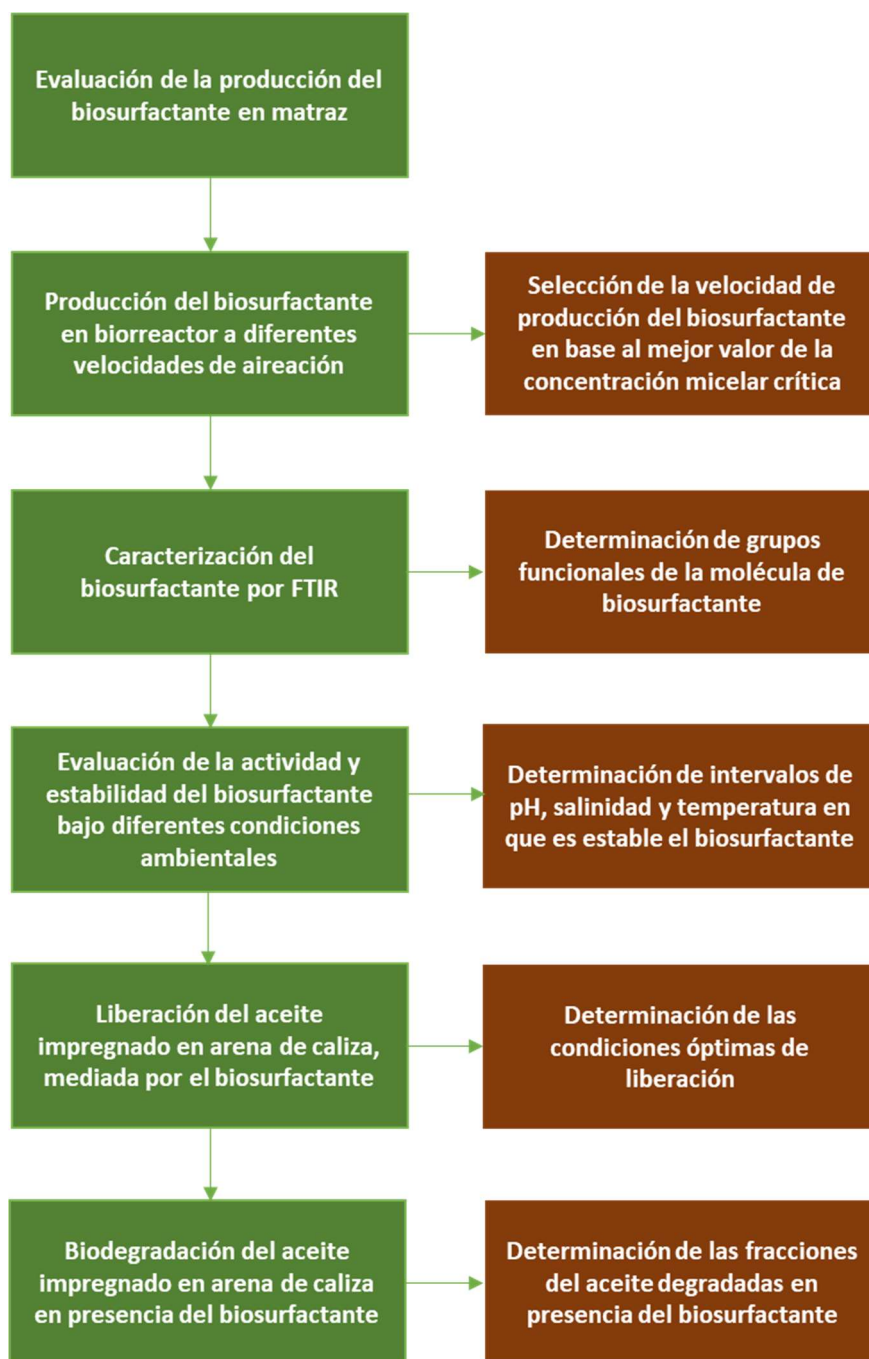


Figura 2. Diagrama de flujo de la metodología seguida

4.1 ACEITE, ROCAS Y ARENA

Se empleó un crudo proveniente de campos mexicanos de 14.85°API, considerado como pesado según la clasificación API (entre 22.3 y 10 °API, ANEXO III), caracterizados por poseer una elevada concentración de hidrocarburos de mediano peso molecular. Las densidad y viscosidad evaluadas a 20°C, fueron 0.964kg·m⁻³ y 4236mPa·s respectivamente. El análisis de compuestos saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA) del crudo reveló que su composición inicial fue 16% de compuestos saturados, 31% de aromáticos, 36% de resinas y 17% de asfaltenos.

La arena se obtuvo a partir de roca caliza molida, tamizada entre 20/30 mallas (tamaño promedio de 0.841 mm), lavada con agua destilada y secada en estufa a 50 °C durante 72 h. Para la determinación de la mojabilidad, se emplearon placas rectangulares de roca caliza de 1×2×0.25 cm, pulidas a espejo y libres de residuos.

4.2 MICROORGANISMOS DE TRABAJO

Para la producción del biosurfactante se empleó la cepa de *Bacillus subtilis* CDBB-B-1015 proveniente de la colección de microorganismos del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). Para los ensayos de biodegradación, se usó una cepa de *Rhodococcus sp.* de la colección del Instituto Mexicano del Petróleo, Figura 3.

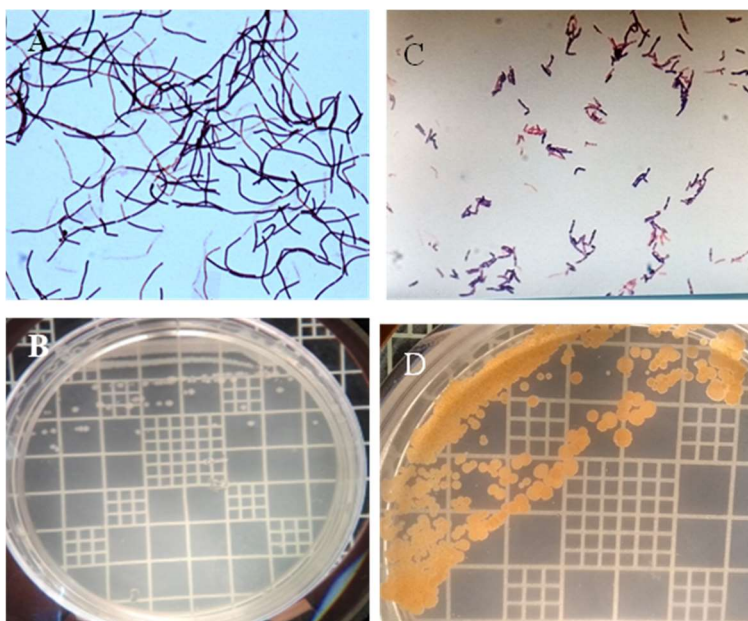


Figura 3. Cepas de trabajo A) Aspecto microscópico de *B. subtilis* B) Morfología colonial de *B. subtilis* C) Aspecto microscópico de *Rhodococcus sp.* y D) Morfología colonial de *Rhodococcus sp.*

4.3 PROPAGACIÓN DE CEPAS

A partir de viales con las cepas de *B. subtilis* y *Rhodococcus sp.* conservadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio líquido con peptona de caseína 5.0 y extracto de carne $3.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Las condiciones de cultivo fueron $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ para *B. subtilis* y $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ para *Rhodococcus sp* con agitación de 130 rpm, después de 24 horas se hicieron frotis y tinciones de Gram a fin de verificar la pureza de los cultivos.

Una vez obtenido crecimiento en medio líquido se tomó una asada de estos cultivos y se sembraron en medio sólido (Tabla 7) por la técnica de estría cruzada a fin de obtener colonias aisladas y bien diferenciadas.

Componente	Concentración ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Extracto de carne	3.0
Extracto de levadura	2.0
Peptona de gelatina	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0

4.4 DESARROLLO DE INÓCULO PARA LA PRODUCCIÓN DEL BIOSURFACTANTE

El inóculo fue preparado a partir de transferir una colonia aislada y pura en 50 mL del medio nutritivo líquido contenido en matraces, los cuales fueron entonces incubados a 30°C con 130 rpm de velocidad de agitación.

4.5 PRODUCCIÓN DEL BIOSURFACTANTE EN MATRAZ

La producción del biosurfactante a nivel matraz se llevó a cabo utilizando el medio mineral líquido descrito en la Tabla 8. Se utilizó azúcar mascabado como fuente de carbono, debido a que en la literatura disponible se ha reportado que los mejores rendimientos de biomasa se han obtenido cuando se usa sacarosa como fuente de carbono (de França *et al.*, 2015) y con la finalidad de tener un sustrato barato. Dado que el biosurfactante producido por *B. subtilis* está asociado al crecimiento (Heryani y Putra, 2017), a mayores rendimientos de biomasa, mayores rendimientos de este bioproducto. El medio de cultivo fue suplementado con 5 mL·L⁻¹ de solución de elementos traza (de composición en g·L⁻¹; FeCl₂, 0.116; H₃BO₃, 0.232; CoCl₂·6H₂O, 0.41; MnSO₄·H₂O 0.008; ZnSO₄ 0.174).

Tabla 8. Composición del medio mineral para la producción del biosurfactante

Componente	Concentración (g·L ⁻¹)
NaNO ₃	2.0
KCl	1.0
CaCl ₂	0.01
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50
Azúcar mascabado	10.0
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.00005
K ₂ HPO ₄	1.0
KH ₂ PO ₄	0.5

En cada una de las cinéticas, se preparó un set de tres matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 70 mL de medio mineral y se agregaron 3.5 mL del inóculo, de modo que éste último representara el 5% del volumen. Las condiciones de cultivo fueron 30 °C y 130 rpm de velocidad de agitación.

Los matraces fueron muestreados periódicamente y a cada muestra se le determinó la densidad óptica como indicador del crecimiento celular, posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos manteniendo la temperatura a 4°C, a los sobrenadantes se les practicaron los análisis de tensión superficial como indicador de la producción del tensoactivo (de acuerdo con lo descrito en 4.13.4) y de azúcares totales (según lo descrito en 4.13.2).

Se trazaron las cinéticas de producción de biomasa y de consumo de sustrato en función del tiempo de cultivo. Los datos de biomasa fueron ajustados con la ecuación modificada de Gompertz (Heryani y Putra, 2017) (ecuación 1), minimizando la sumatoria de errores al cuadrado. Los datos de sustrato y la tensión superficial fueron ajustados con la ecuación logística generalizada (ecuación 2), en todos los intervalos se empleó un límite de confianza de 0.95. Para el ajuste de los datos, se utilizó el software MathCad Prime 7.00.

$$B(t) = B_{max} * e^{-e^{\left(\frac{\mu_{max} * e}{B_{max}}\right) * (\lambda - t) + 1}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde

$B(t)$ es la concentración de biomasa en función del tiempo de cultivo ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$).

B_{max} es la concentración máxima potencial de biomasa ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$).

μ_{max} es la velocidad máxima de crecimiento ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

λ es el tiempo de duración de la fase lag (h).

$$F(t) = \min(x) + \frac{\max(x) - \min(x)}{[1 + \alpha e^{-(t-\gamma)}]^{\frac{1}{\beta}}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde

t es el tiempo de cultivo.

α es el índice de persistencia.

β es la velocidad máxima.

γ es el tiempo en que se alcanza la velocidad máxima.

$\max(x)$ es el valor máximo de la variable de respuesta.

$\min(x)$ es el valor mínimo de la variable de respuesta.

4.6 PRODUCCIÓN POR LOTE EN BIORREACTOR TIPO TANQUE AGITADO

Una vez constatada la producción del biosurfactante en matraz, se procedió a realizar la obtención a nivel de biorreactor. Para ello, se utilizó un biorreactor *Applikon* de 3 L de capacidad con 1.5 L de medio de cultivo mineral de composición dada en la Tabla 8. El biorreactor fue inoculado con 5% de su volumen (75 mL) de un cultivo de 24 h de edad de la cepa de *B. subtilis*. Las condiciones de cultivo probadas fueron 180 rpm, 30 °C y cinco diferentes velocidades de aireación: 0.7, 0.75, 0.8, 0.94 y 1.02 volúmenes de aire por volumen de medio líquido por minuto (vvm), es decir 1.05, 1.125, 1.2, 1.35 y 1.53 L de aire·min⁻¹ respectivamente. El pH inicial fue de 6.9 ± 0.5 .

Estudios previos de producción del biosurfactante llevados a cabo en el IMP (no reportados en este trabajo), demostraron que este bioproducto se separaba y acumulaba en la espuma una vez que esta se formaba. Esto quedó constatado ya que se observó que, al momento de formación de la espuma, la tensión superficial del medio dejó de descender, mientras que en la espuma este parámetro disminuyó con respecto al tiempo hasta valores cercanos a los 27 mN·m⁻¹.

Debido a lo anterior, al biorreactor se le acopló un sistema de recuperación de espuma que consistió en un tubo de vidrio de 0.82 cm de diámetro interno acoplado a una reducción de 0.43 cm de diámetro interno conectada a una manguera de silicón del mismo diámetro conectada a su vez a un recipiente de recolección con venteo a la atmósfera. El tubo de succión se colocó 0.5 cm por encima del nivel del líquido en el biorreactor, con esto se garantizó que no se succionara medio de cultivo. La succión de espuma comenzó cuando se obtuvo una acumulación de 0.5 cm sobre la superficie del medio de cultivo. Con este sistema se logró que la espuma fuera conducida hacia un reservorio de recolección, Figura 4. Con este arreglo se obtiene un efecto de tobera en el que el aire entra a una presión de aproximadamente 0.5 bar y sale a presión atmosférica. En el proceso de expansión del aire, esta gana velocidad y por tanto energía cinética (Granet, 1988). De esta forma se logra que la espuma sea succionada.

La producción del biosurfactante fue determinada por la disminución de la tensión superficial del medio mineral y de producción de en función del tiempo.

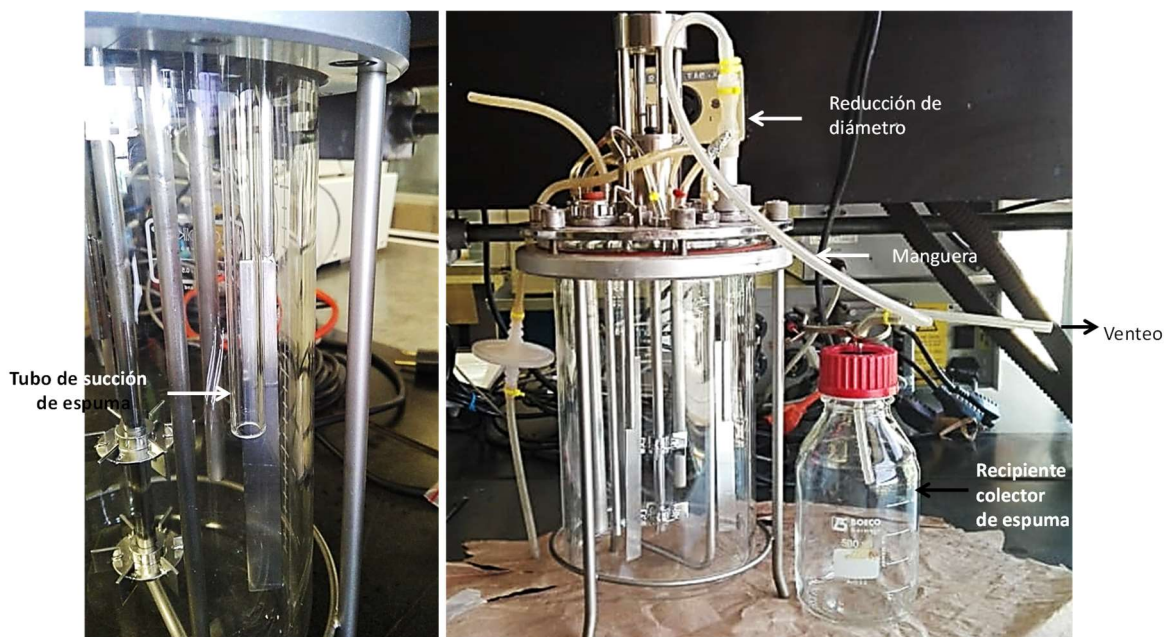


Figura 4. Configuración del biorreactor para la recuperación y recolección de la espuma formada

4.7 RECUPERACIÓN DEL BIOSURFACTANTE A PARTIR DEL MEDIO DE CULTIVO

Una vez finalizada la cinética de producción, la espuma fue recolectada y centrifugada a 10000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4°C; el sobrenadante fue recuperado por decantación.

El sobrenadante, espuma libre de células, fue sometido a desecación a 60 ± 2 °C durante 72 horas. El material recuperado fue pesado y se procedió a determinar el rendimiento del proceso de producción. A este material recuperado se le denominó biosurfactante crudo.

4.8 CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA

La concentración micelar crítica (CMC) del biosurfactante producido, fue determinada al medir la variación de la tensión superficial de disoluciones acuosas de éste a diferentes concentraciones medidas en partes por millón. El valor de la CMC lo establece el cambio de régimen de la variable de medición (Novelo Torres y Gracia Fadrique, 2018). Con la curva obtenida, se realizaron diferentes ajustes a fin de determinar el cambio de pendiente de ésta, el punto de inflexión que corresponde a la CMC (Chang *et al.*, 1987).

4.9 CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROGRAFÍA DE LUZ INFRA ROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER FTIR

El pH de la espuma libre de biomasa fue ajustado a 2.0 empleando HCl 2 y la espuma fue refrigerada a 4 °C durante 12 h. Transcurrido este periodo, se realizó una extracción líquido/líquido empleando metanol (Ghojavad, *et al.*, 2008; Valenzuela Ruíz *et al.*, 2020). El producto sólido se desecó en estufa a 50°C por 24 h para después ser caracterizado por FTIR para elucidar los principales grupos funcionales presentes en el biosurfactante. La muestra fue preparada en pastillas de KBr.

El espectrograma se obtuvo con un equipo *Nicolet FT-IR Spectrometer* operando con una reflexión total atenuada y una velocidad de barrido de 2 cm⁻¹, en barrido se realizó en el intervalo de longitud de onda de 399 a 4000 cm⁻¹.

4.10 ACTIVIDAD DEL BIOSURFACTANTE BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS AMBIENTAL

El criterio de actividad y estabilidad fue la conservación de la capacidad del biosurfactante para disminuir la tensión superficial. Para estos ensayos, se trabajó con una espuma que inicialmente tenía una Tensión Superficial (TS) de 30.777 mN·m⁻¹ determinada a 25 °C, a pH 6.5 y libre de sal, dicho valor de TS se utilizó como valor de referencia y se evaluó su variación respecto a las diferentes condiciones ambientales. Los estudios de estabilidad se realizaron en tubos de ensayo con 10 mL de espuma.

4.10.1 ESTABILIDAD TÉRMICA

Los tubos de ensayo con la espuma se incubaron a diferentes temperaturas: 4, 20, 40, 60 y 80°C, durante 24 horas. Al término del periodo de incubación, los tubos fueron atemperados a 25 °C y se procedió a determinar la TS.

4.10.2 ESTABILIDAD AL PH

El pH de la espuma contenida en los tubos fue ajustado a 5, 6, 7, 8 y 9 (con HCl 2 N y/o NaOH 2 N). los tubos fueron incubados a temperatura ambiental durante 24 horas, al término de las cuales se determinó la TS de la espuma.

4.10.3 ESTABILIDAD A DIFERENTES SALINIDADES

Para esta prueba, se prepararon tubos con 10 mL de espuma y se adicionó NaCl hasta obtener las diferentes concentraciones de 2, 4, 6, 8, y 10% de sal, se incubaron a temperatura ambiental durante 24 h y se procedió a determinar la TS.

4.11 ESTUDIO DE LOS FACTORES AMBIENTALES QUE TIENEN EFECTO EN EL COMPORTAMIENTO DEL BIOSURFACTANTE DURANTE LA LIBERACIÓN DEL CRUDO IMPREGNADO EN ARENA DE CALIZA

La tensión interfacial (TIF) (de acuerdo con el numeral 4.13.5), la tensión superficial y el ángulo de contacto (AC) (según lo descrito en 4.13.6) fueron evaluados a diferentes condiciones para determinar los mecanismos principales en la liberación del crudo de la arena de caliza. Para determinar el efecto de los factores ambientales en la TIF y el AC, se empleó un diseño experimental (DOE) de Taguchi L₉ de cuatro factores a tres niveles: tiempo de impregnación de la arena con el aceite (atemperado), temperatura, salinidad, y concentración del ion SO₄⁻², Tabla 9.

Las unidades experimentales consistieron en columnas cilíndricas de vidrio con 13 ± 0.02g de arena de caliza impregnada con el crudo pesado a concentración de 300,000 ppm. En cada sistema se agregaron 10 mL de biosurfactante (espuma con una TS inicial de 27.78 mN·m⁻¹

a 25°C), se ajustó el pH a 6.7 y se incubaron por siete días. Paralelamente se corrieron controles con agua destilada en lugar del biosurfactante.

Tabla 9. Diseño experimental ortogonal de Taguchi L9

Corrida	Factores			
	Tiempo de añejamiento (h)	Temperatura (°C)	Salinidad %	SO ₄ ⁻² (molar)
1	22	30	0	0
2	22	40	5	0.01
3	22	50	10	0.02
4	96	30	5	0.02
5	96	40	10	0
6	96	50	0	0.01
7	120	30	10	0.01
8	120	40	0	0.02
9	120	50	5	0

Después de siete días las columnas fueron retiradas de la incubadora y se dejaron enfriar a temperatura ambiente antes de realizar la medición del volumen de crudo liberado (Figura 5). El volumen de aceite liberado se estimó al medir la altura de la capa de aceite y considerando el diámetro interno de las columnas, que fue de 2.5 cm. El volumen calculado se empleó para determinar la masa de aceite liberada, considerando la densidad del aceite a 20 °C como 0.964 g/cm³. A cada columna se le agregaron 3 ± 0.02 gramos de aceite, que corresponde a un volumen de 3.112 ± 0.0207 mL; a partir de este valor y de los volúmenes obtenidos para cada tratamiento, se determinaron los porcentajes de liberación. A los sobrenadantes de cada tratamiento se les determinaron la TS y la TIF.



Figura 5. Determinación del volumen de aceite liberado por medición del espesor de la capa formada en la superficie

Para la determinación de la modificación de la mojabilidad se impregnaron rocas con el crudo durante 72 horas a 50 °C y se determinó el ángulo de contacto, de acuerdo con lo referido en el numeral 4.13.6. Posteriormente, las rocas fueron embebidas de acuerdo con las condiciones establecidas en el arreglo experimental de Taguchi y se incubaron durante siete días a las temperaturas indicadas en la Tabla 9. Después del periodo de incubación, se procedió a determinar nuevamente el AC usando como fase circundante la misma mezcla de imbibición y agua destilada; el AC fue determinado a temperatura ambiental.

4.12 BIODEGRADACIÓN DEL CRUDO PESADO IMPREGNADO EN ARENA DE CALIZA

4.12.1 DESARROLLO DE INÓCULO

El inóculo se desarrolló en matraces con 50 mL de medio mineral a partir de un cultivo puro de la cepa de *Rhodococcus sp.* Los matraces fueron incubados a 28°C y 130 rpm, una vez transcurridas 48 horas se separó la biomasa por centrifugación a 10000 rpm por diez minutos. La biomasa obtenida fue lavada con solución isotónica estéril ($\text{NaCl } 8.9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) tres veces y resuspendida en 50 mL de ésta misma. Esta suspensión de densidad óptica 1.24 a 620 nm, se utilizó como inóculo en los experimentos de biodegradación.

4.12.2 IMPREGNADO DE LA ARENA CON EL CRUDO PESADO

Se impregnaron 10 ± 0.02 gramos del granulado con 0.5 ± 0.002 gramos del aceite pesado, de modo que la concentración fuera de 50000 ppm. El método de impregnación consistió en extender el aceite en una placa de Petri con ayuda de una espátula hasta formar una capa delgada, se agregó la arena limpia y seca y se extendió con varilla de vidrio en forma de L. Las placas fueron incubadas a 60 °C durante 72 horas, al final de las cuales se retiró el granulado impregnado (Figura 6).

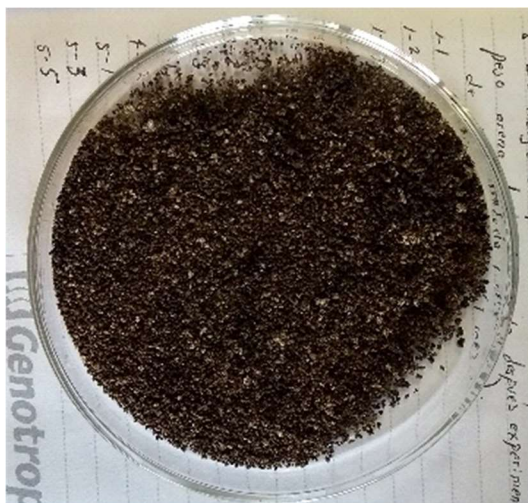


Figura 6. Aspecto de la arena impregnada con el aceite pesado

4.12.3 BIODEGRADACIÓN

Los ensayos de biodegradación se llevaron a cabo en matraces de 250 mL con válvulas Mininert para el muestreo de la fase gaseosa. Se usó un medio de cultivo de peptona y caseína basado en el reportado por Karpenko et al. (Karpenko *et al.*, 2006), Tabla 10, el pH se ajustó a 6.7 ± 0.2 .

Tabla 10. Composición del medio empleado en los experimentos de biodegradación

Componente	Concentración ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
K_2HPO_4	1.50
KH_2PO_4	1.20
NH_4NO_3	4.00
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.10
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$8\cdot 10^{-4}$
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$5\cdot 10^{-6}$
NaCl	1.00
Extracto de levadura	0.50
Peptona de caseína	0.50

La salinidad de los sistemas (como NaCl) se ajustó a 3.5%. Los tratamientos se resumen en la Tabla 11; las condiciones de cultivo fueron 30°C y 150 rpm. Previo a la inoculación, al tratamiento identificado como CL se le aplicó un pretratamiento de bioaumentación que consistió en mezclar la arena impregnada con 20 mL de biosurfactante (espuma estéril cuya TS a 25°C fue de $27.78 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) e incubarla a 40°C y 150 rpm durante 72 h, para después retirar el biosurfactante con una micropipeta de 5 mL y proceder a la biodegradación. El hecho de retirar el biosurfactante fue para evitar que el microorganismo lo utilizara como fuente de carbono en lugar del aceite, por otro lado, se esperaba que el biosurfactante formara una capa en la superficie del aceite, que permitiría la implantación del microorganismo.

La biodegradación fue monitoreada por respirometría (Montagnolli *et al.*, 2015), por lo que periódicamente se tomó una muestra de 1 mL de la fase gaseosa para determinar la producción de CO_2 , de acuerdo con lo descrito en 4.13.8, como indicador de la mineralización de los componentes del crudo. Los matraces se aireaban bajo condiciones estériles durante 1h después de ser muestreados (Figura 7). Con los resultados, se determinó

la acumulación de CO₂ y la velocidad de producción de este gas, de acuerdo con lo descrito en 4.13.9, como indicativo de la utilización del aceite como fuente de carbono.

Tabla 11. Diseño de los tratamientos para el ensayo de biodegradación del crudo impregnado en arena

Tratamiento	Arena (g)	Crudo (ppm)	Medio de Cultivo (mL)	Inóculo (mL)	Pretratamiento con biosurfactante
Control abiótico AB	10	50000	50	-	No
Control sin crudo y sin biosurfactante SC	10	-	45	5	No
Sin biosurfactante SL	10	50000	45	5	No
Con biosurfactante CL	10	50000	45	5	Sí



Figura 7. Matracos de biodegradación siendo aireados en condiciones estériles en campana de flujo laminar

4.13 TÉCNICAS ANALÍTICAS

4.13.1 DETERMINACIÓN DE BIOMASA CELULAR

La biomasa fue evaluada por densidad óptica a 620 nm (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008) con un espectrofotómetro *Thermo Scientific BIOMATE 35 UV-Vis*, previamente se construyó una curva tipo de absorción a 620 nm contra diferentes concentraciones de biomasa en base seca, obtenida a partir de un cultivo de 24 horas de incubación que se encontraba en fase exponencial de crecimiento.

4.13.2 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES

Se realizó por el método del reactivo fenol-sulfúrico (DuBois *et al.*, 1956). Las muestras obtenidas fueron puestas en tubos *Eppendorf* de 1.5 mL y centrifugadas a 10000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó y de aquí se tomaron 0.5 mL que fueron depositados en tubos de ensayo. A cada tubo se le agregaron 0.5 mL de solución de fenol (5 g de fenol por cada 100 mL de solución) y 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado (al 98%). Los tubos fueron agitados en *Vortex* durante un minuto y se dejaron reposar en baño de hielo por 10 minutos. El contenido de cada tubo fue entonces transferido a una celda de cuarzo y se le determinó la absorbancia a 490 nm con el espectrofotómetro de luz *UV/Vis*. La concentración de azúcares totales fue determinada por interpolación en una curva tipo construida previamente.

4.13.3 DISPERSIÓN DE ACEITE

Se basa en la modificación local de la tensión superficial por acción de un agente tensoactivo. Esta prueba se realizó de acuerdo con la técnica reportada por Youseff *et al.* (Youssef *et al.*, 2004). Para ello, se colocó una gota de crudo (aproximadamente 40 μ L) en el centro de una caja de *Petri* de 12 cm de diámetro conteniendo agua destilada, con ello se forma una capa delgada de petróleo en la superficie del agua. Posteriormente, se adicionaron 10 μ L de la disolución de biosurfactante a probar en el centro de la placa y se observó el efecto en espera de la dispersión del crudo al formarse un halo claro (Hassanshahian, 2014). La determinación se hizo midiendo el diámetro del halo formado (Figura 8).

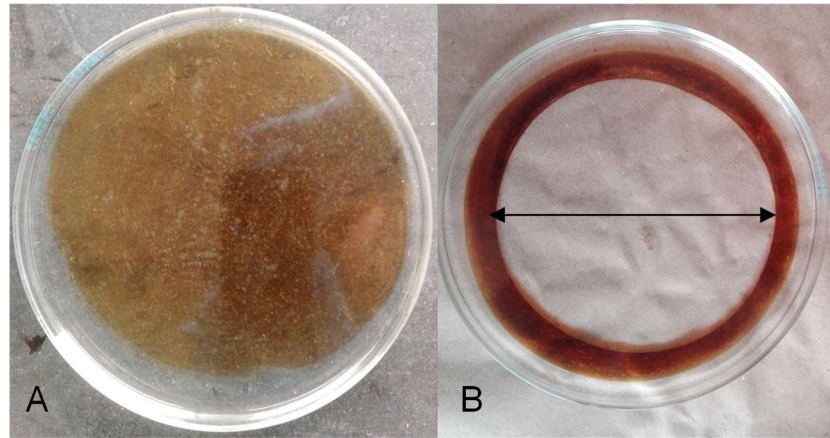


Figura 8. Determinación de la dispersión de aceite por el diámetro del halo formado. A) Gota de aceite formando una película en la superficie del agua antes de adicionar el biosurfactante B) Halo formado al adicionar el biosurfactante

4.13.4 DETERMINACIÓN DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL

Se empleó un tensiómetro *KRÜSS* modelo *K100* y el método empleado fue el de la placa de Wilhelmy. Para ello, 4.5 mL de muestra fueron centrifugados a 10000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C, el sobrenadante libre células fue depositado en una cubeta de vidrio o de teflón, con capacidad para 4.5 mL. Las determinaciones fueron realizadas a una temperatura de 25 ± 0.5 °C. Asimismo, cada muestra fue dejada un minuto en el interior de la cámara del equipo antes de la determinación para permitir que alcanzara la temperatura de prueba. Previamente, se probó la funcionalidad del equipo al determinar la tensión superficial de una muestra de agua destilada, la que debe ser de 72.8 ± 1.0 mN·m⁻¹.

4.13.5 DETERMINACIÓN DE LA TENSIÓN INTERFACIAL

Se llevó a cabo por el método de la gota pendiente desde el fondo, con un analizador de forma de gota *DSA100* de *KRÜSS*. Para esto, 3 mL de crudo pesado se colocan en una jeringa dispensadora que cuenta con una aguja de 0.907 mm de diámetro. En la celda de cuarzo se depositan de 10 a 12 mL del líquido de prueba (la espuma o las mezclas de esta) y se sumerge la aguja con el crudo. Una vez que se forma la gota en la punta de la aguja, se comienza a medir la TIF entre el crudo y el líquido de prueba con ayuda del software del equipo, de acuerdo con la forma que aquella adquiera. La TIF varía con la edad de la gota, por lo que la

evaluación se lleva a cabo hasta que se observa el estado estable de este parámetro. La lectura adoptada es aquella alcanzada antes de que la gota se elongue y se desprenda de la aguja. La estimación de la TIF se hace con la ecuación de Laplace-Young de acuerdo con la curvatura de la gota, su diámetro y las densidades de los líquidos en contacto.

4.13.6 DETERMINACIÓN DEL ÁNGULO DE CONTACTO

Se llevó a cabo por el método de la gota cautiva en el analizador de forma de gota *DSA 100*, colocando una gota del aceite en el centro de la placa de roca caliza embebida en agua destilada o en el líquido de prueba. El ensayo se realizó a temperatura ambiental en todos los casos (Figura 9).

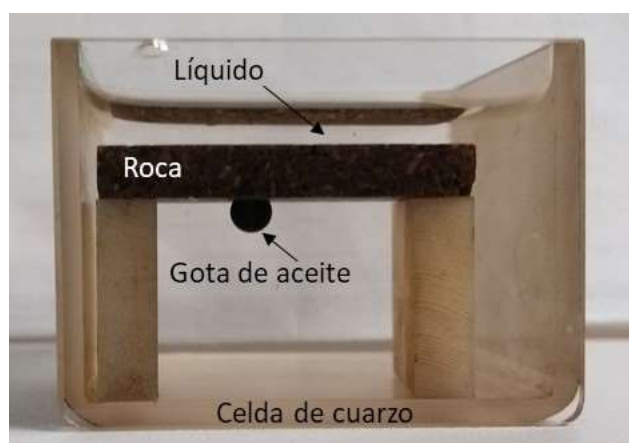


Figura 9. Determinación del ángulo de contacto por el método de la gota cautiva

4.13.7 CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA

Para determinar la concentración micelar crítica del biosurfactante (CMC), el parámetro de respuesta fue la tensión superficial de soluciones a diferentes concentraciones (en ppm) del producto crudo y seco. Las soluciones fueron preparadas por diluciones sucesivas a partir de una solución a 10000 ppm del biosurfactante. La TS se graficó frente a la concentración y se obtuvieron las curvas de respuesta. Se aplicó una regresión lineal a las rectas extrapoladas a partir de los segmentos rectos de cada lado de la curva de respuesta (Volonte *et. al.*, 1989; Vaz *et al.*, 2012), es decir, a las partes concentración-dependiente y concentración-

independiente (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008). Se igualaron las ecuaciones resultantes y se despejó la concentración, con lo que se obtuvo la CMC.

4.13.8 DETERMINACIÓN DE CO₂

Se desarrolló por cromatografía de gases (GC) con un cromatógrafo GowMac II usando helio a 65 mL·min⁻¹ como fase móvil y una columna CTR. Las condiciones fueron: temperatura de la columna, ambiental; temperatura del inyector, 45 °C; temperatura del detector, 100 °C; y corriente del detector, 125 V.

4.13.9 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE CO₂

Las curvas de producción acumulada de CO₂ fueron ajustadas con la ecuación de Gompertz modificada (Castorena-Cortés *et al.*, 2009; Heryani y Putra, 2017)(ecuación 3).

$$P_{CO_2}(t) = P * e^{-e^{\left(\frac{r * t}{P}\right) * (\lambda - t) + 1}} \text{ (Ecuación 3)}$$

Donde

$P_{CO_2}(t)$ es la producción acumulada de CO₂ en función del tiempo t (mg·g_{oil}⁻¹).

P es la producción máxima estimada de CO₂ (mg·g_{oil}⁻¹).

r es la velocidad de producción de CO₂ (mg·g_{oil}⁻¹·día⁻¹).

λ es la duración de la fase lag o de adaptación (días).

P , r y λ se calcularon por un método iterativo usando el software MathCad Prime 7.0.0.

4.13.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las determinaciones experimentales se realizaron por triplicado, en el caso de los ensayos de biodegradación estos fueron por sextuplicado; se determinaron la media y desviación estándar y se realizaron análisis de varianza de una sola cola. Se realizaron pruebas de contraste y agrupación de medias con la prueba de la diferencia honesta

significante (HSD) de Tukey (Bezza y Chirwa, 2017; Hamzah *et al.*, 2013) y en el caso de estabilidad del BS, se realizó la prueba de Dunnett; se usó una α de 0.05 en todos los casos.

4.14 REFERENCIAS DEL CAPÍTULO

- Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M., y Hassouna, N. A.-H. (2008). Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150(3), 305–325. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8155-x>
- Bezza, F. A., y Chirwa, E. M. N. (2017). The role of lipopeptide biosurfactant on microbial remediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil. *Chemical Engineering Journal*, 309, 563–576. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.10.055>
- Castorena-Cortés, G., Roldán-Carrillo, T., Zapata-Peñasco, I., Reyes-Avila, J., Quej-Aké, L., Marín-Cruz, J., y Olguín-Lora, P. (2009). Microcosm assays and Taguchi experimental design for treatment of oil sludge containing high concentration of hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 100(23), 5671–5677. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.050>
- Chang, C. Y., Wang, S. J., Liu, I. J., y Chiu, Y. C. (1987). A Simple Method for Determining the Critical Micellar Concentration of a Surfactant. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 34(3), 243–246. <https://doi.org/10.1002/jccs.198700037>
- de França, Í. W. L., Lima, A. P., Lemos, J. A. M., Lemos, C. G. F., Melo, V. M. M., de Sant'ana, H. B., y Gonçalves, L. R. B. (2015). Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. *Catalysis Today*, 255, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2015.01.046>
- DuBois, Michel., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., y Smith, Fred. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Granet, I., 1989. Termodinámica. Prentice-Hall Hispanoamericana, México.
- Hamzah, A., Phan, C.-W., Abu Bakar, N. F., y Wong, K.-K. (2013). Biodegradation of Crude Oil by Constructed Bacterial Consortia and the Constituent Single Bacteria Isolated From Malaysia. *Bioremediation Journal*, 17(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/10889868.2012.731447>
- Heryani, H., y Putra, M. D. (2017). Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, 27, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.03.005>
- Karpenko, E. v, Vil'danova-Martshishin, R. I., Scheglova, N. S., Pirog, T. P., y Voloshina, I. N. (2006). The prospects of using bacteria of the genus *Rhodococcus* and microbial surfactants for the degradation of oil pollutants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(2), 156–159. <https://doi.org/10.1134/S0003683806020074>
- Montagnolli, R. N., Lopes, P. R. M., y Bidoia, E. D. (2015). Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(1), 4116. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-4116-8>
- Novelo Torres, A. M., y Gracia Fadrique, J. (2018). Concentración micelar crítica mediante la ecuación de adsorción de Gibbs. *Educación Química*, 16(1), 63. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2005.1.66139>
- Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., y McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.001>

5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE EN MATRAZ

De acuerdo con los datos obtenidos en las cinéticas, Figura 10 se estimó que la velocidad de producción del biosurfactante es proporcional a la de crecimiento. Las curvas de crecimiento, de consumo de sustrato y de producción de biosurfactante, medida como actividad tensoactiva, mostraron el comportamiento reportado anteriormente (Parthipan *et al.*, 2017).

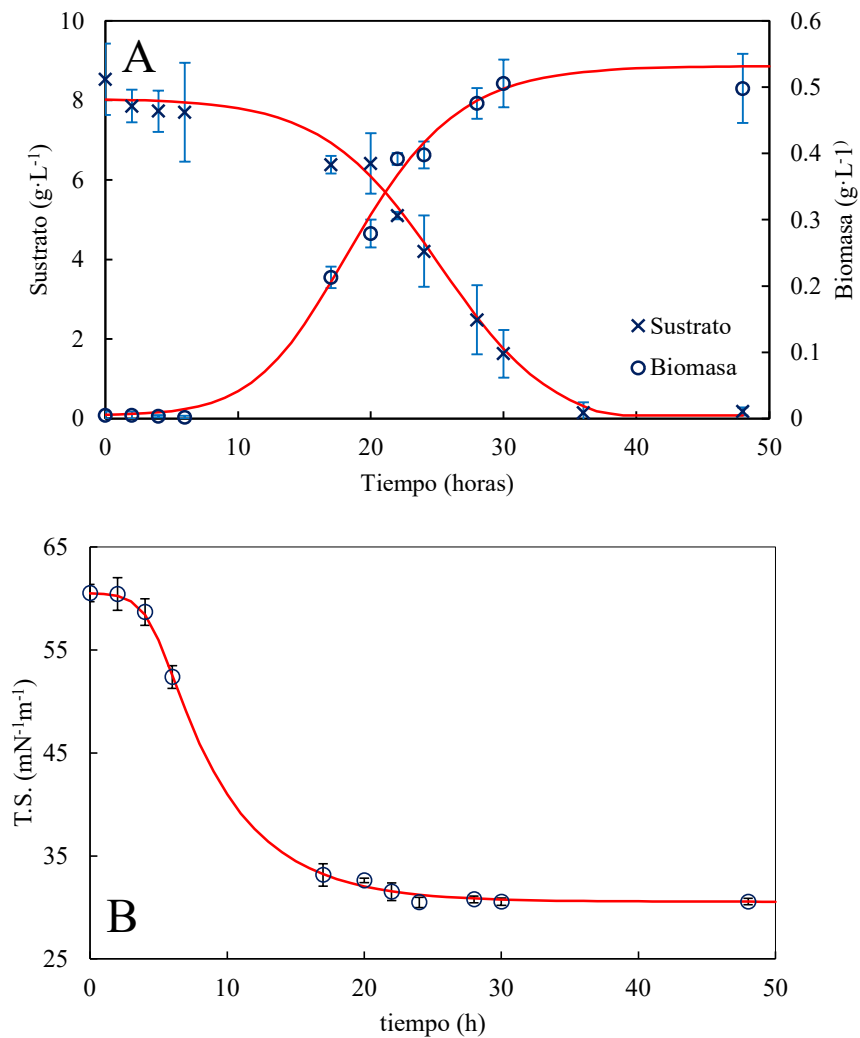


Figura 10. Cinéticas de A) crecimiento de *B. subtilis* y de consumo de sustrato y B) de producción del biosurfactante expresada como disminución de la tensión superficial del medio de cultivo.

La disminución de la TS comenzó alrededor de las 6 horas de incubación, de $60 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ iniciales a $52 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, lo que indicó que la producción comenzó cuando el microorganismo se encontraba en la fase de adaptación o fase lag. La fase de crecimiento exponencial comenzó aproximadamente a las diez horas de incubación, cuando la TS tuvo un valor de $40.8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. La velocidad máxima de crecimiento (Tabla 12), $0.038 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ se alcanzó a las 18 horas, cuando la TS fue de $32 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. La TS final (y la más baja alcanzada) fue de $30.544 \pm 0.306 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Con estos datos fue posible determinar que el biosurfactante es producto del metabolismo primario de acuerdo a lo reportado por Vaz *et al.* (Vaz *et al.*, 2012) y De Andrade y Pastore (de Andrade y Pastore, 2016). Esto contrastó con lo reportado por Kluge *et al.* (Kluge ., 1988), quienes postulan que la surfactina de *B. subtilis* es producida durante la fase exponencial. Adicionalmente, Rahman *et al.* (2003), describieron a la surfactina producida por *B. subtilis* como un compuesto con propiedades antimicrobianas y por tanto como un producto del metabolismo secundario, es decir, que se produce durante la fase estacionaria. Estas observaciones podrían ser debidas a las altas concentraciones del biosurfactante alcanzadas al final de la etapa exponencial de crecimiento. Por otro lado, la atribución de propiedades antimicrobianas al biosurfactante producido por *B. subtilis*, deriva de que es capaz de fluidizar la membrana microbiana causando lisis y muerte celular y a que impide la formación de biopelículas de otros microorganismos (Seydlová, 2008; Rautela *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2019).

Tabla 12. Parámetros cinéticos de la producción del biosurfactante en matraz

Parámetro	Valor - unidad
Velocidad máxima de crecimiento	$0.038 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
Rendimiento de biomasa	$0.532 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
Rendimiento de producto crudo	$0.530 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
Rendimiento de producto crudo en base a biomasa	$0.997 \text{ g}\cdot\text{g}_{\text{biomasa}}^{-1}$
Sustrato residual	$1.63 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

En estudios de producción a nivel matraz, Al-Wahaibi *et al.* (2014), reportaron rendimientos similares al encontrado en este trabajo, $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ utilizando la cepa *B. subtilis* B30, reportando buena actividad tensoactiva (50% de emulsificación de un crudo no especificado).

Los cultivos se finalizaron cuando se observó un incremento significativo en la TS. La síntesis de biosurfactante estuvo asociada a la producción de biomasa, por lo que, al detenerse el crecimiento, también lo hizo la producción del biosurfactante. A partir de ese momento la velocidad de desnaturalización del biosurfactante es mayor a la de síntesis.

En la curva de tensión superficial se observó que el cambio de pendiente ocurrió más rápido que en las curvas de crecimiento y de consumo de sustrato, esto es debido a que se requieren concentraciones muy bajas de biosurfactante para causar decrementos drásticos en la tensión superficial y por tanto en la pendiente de la curva. Al estar relacionada la síntesis del biosurfactante al crecimiento celular, un incremento en la concentración de biomasa conlleva a un incremento en la actividad tensoactiva (Parthipan *et al.*, 2017). De acuerdo con Cortés-Camargo y Barragán-Huerta (2013) y Pereira *et al.* (2013), los biosurfactantes tales como la surfactina, producida por cepas de *B. subtilis*, son capaces de disminuir la tensión superficial del agua de $72 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ a $27 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ a concentraciones muy bajas ($0.01 - 0.05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), por lo que el cambio de pendiente en la curva de TS a las seis horas de cultivo en matraz, demostró la síntesis temprana del biosurfactante.

La CMC del producto seco obtenido a partir de la espuma, fue de 1028.108 ppm (Figura 11). La CMC indica la concentración en la cual el biosurfactante alcanza la saturación en la fase acuosa y comienza a agregarse formando micelas. Mientras el biosurfactante se encuentre distribuido en la superficie, será capaz de disminuir la TS, por lo que mientras menor sea la CMC, menor será la cantidad de BS requerida para que este se distribuya en la superficie y se alcance la TS estable mínima posible (Santos *et al.*, 2016).

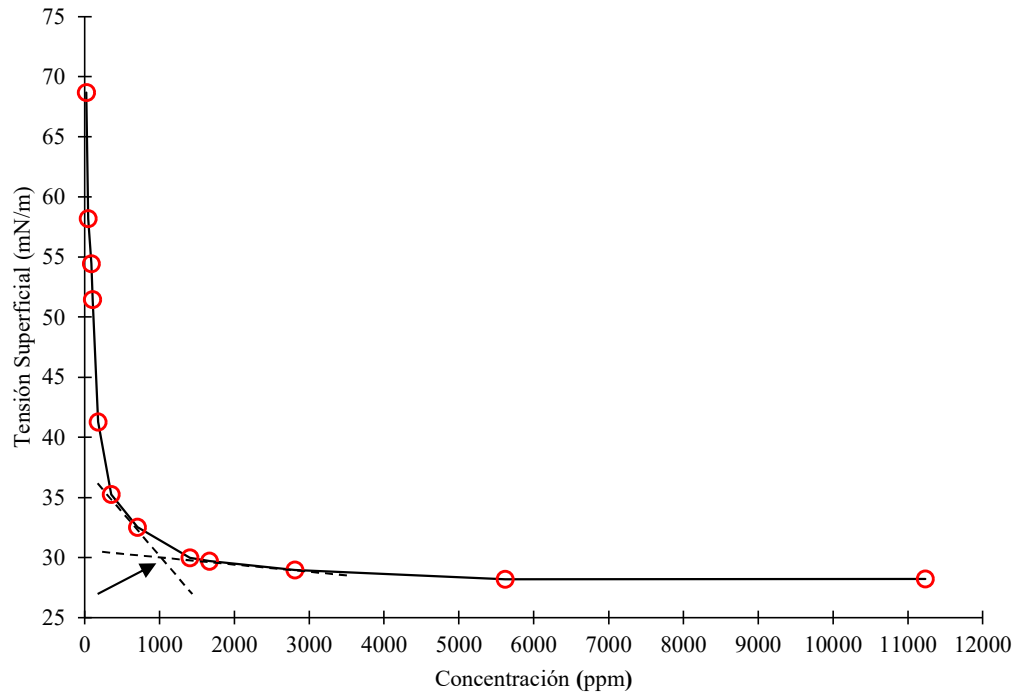


Figura 11. Determinación de la concentración micelar crítica del biosurfactante obtenido

Una vez que se constató la producción del biosurfactante en matraz, se procedió al escalamiento del proceso a nivel de biorreactor.

5.2 PRODUCCIÓN DEL BIOSURFACTANTE EN BIORREACTOR

Las cinéticas de producción de biomasa a las diferentes velocidades de aireación ensayadas se muestran en la Figura 12. La producción del biosurfactante en biorreactor, permitió recuperarlo a partir de la espuma formada (Figura 13). Una vez formada la espuma, la producción del biosurfactante fue monitoreada por determinación de la TS en esta (Figura 14).

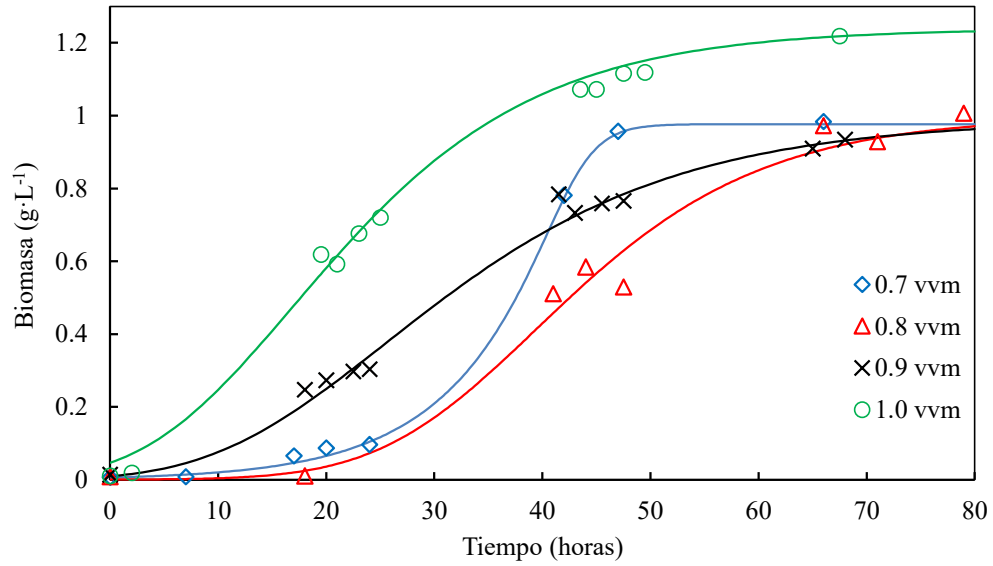


Figura 12. Evolución de la biomasa en biorreactor a diferentes velocidades de aireación

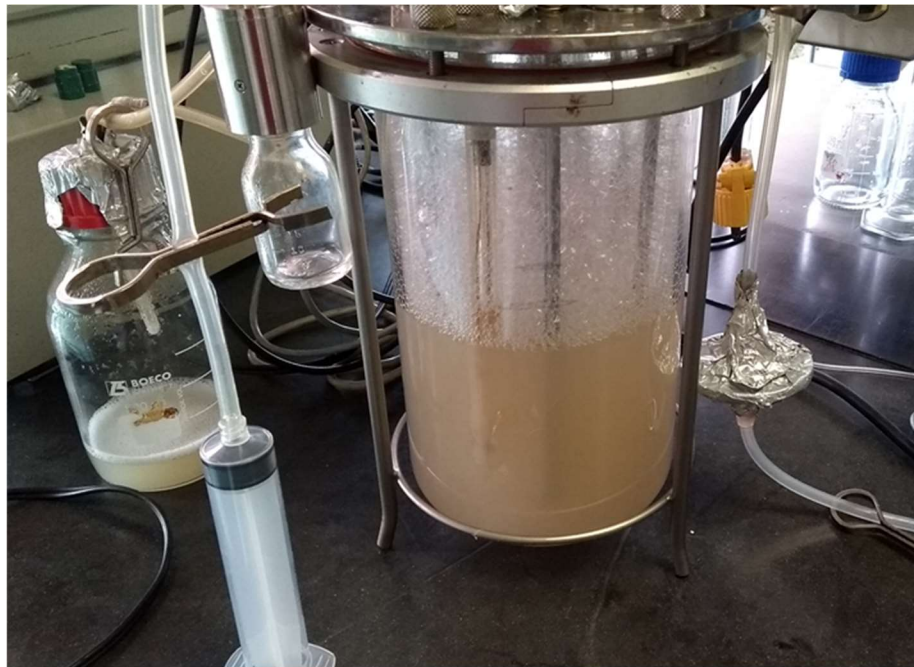


Figura 13. Formación y recolección de espuma durante la producción del biosurfactante en biorreactor. A) Puerto de muestreo. B) Reservorio recolector de espuma

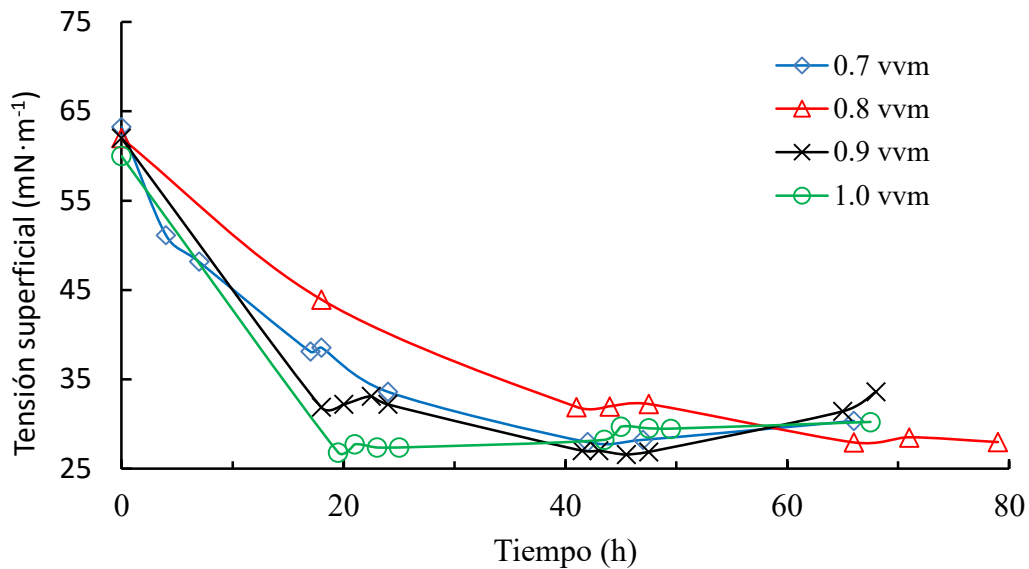


Figura 14. Tensión superficial como indicativo de la producción del biosurfactante a diferentes velocidades de aireación

Los resultados de producción en biorreactor confirmaron que el biosurfactante es un metabolito primario, pues la producción de éste comenzó entre las cuatro y siete horas de incubación, cuando el cultivo estaba aún en fase de adaptación. Para la velocidad 0.7 vvm (Figura 15) se obtuvo una velocidad de crecimiento de $0.0438 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, asimismo, el tiempo en que la velocidad de crecimiento alcanzó su valor máximo fue de 22.7 horas. En cuanto a la dispersión de aceite, tenemos que una vez que se forma la espuma, la capacidad de dispersión aumentó desde 3 cm a 11 cm, y llega a 13 cm al final del proceso concordando con las fases logarítmica y estacionaria de crecimiento. Se recuperaron 400 mL de espuma, similar a lo reportado por De Andrade et al. (2016), quienes lograron separar 3L de espuma de un biorreactor de 10L. La CMC del surfactante obtenido fue de 684 ppm (Figura 16).

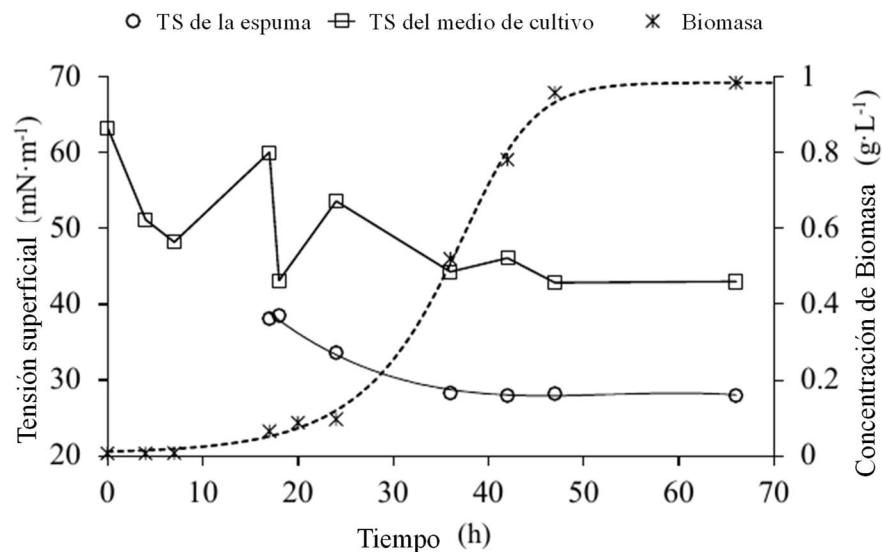


Figura 15. Cinéticas de crecimiento y de disminución de la tensión superficial del cultivo en biorreactor a 0.7 vvm

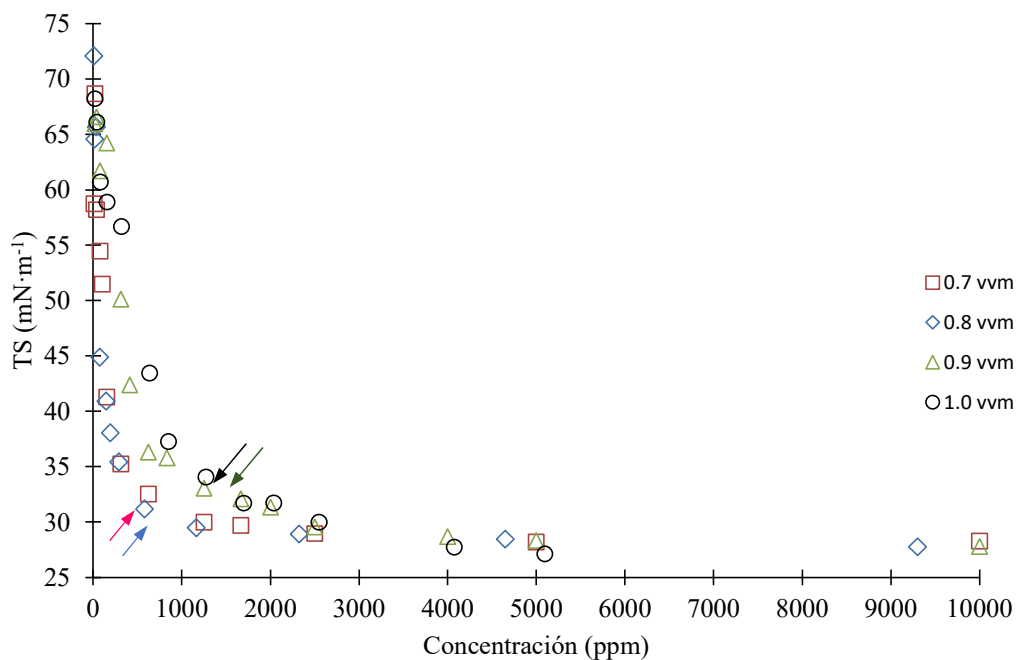


Figura 16. Concentración micelar crítica (CMC) del biosurfactante obtenido a diferentes velocidades de aireación

Para la velocidad de aireación de 0.80 vvm la espuma se recolectó a las 48 horas de incubación. A las 66 horas, se lograron separar alrededor de 300 mL de espuma, la que mostró

una coloración rojiza (Figura 17). La cantidad final de biomasa producida en este reactor fue de 1.094 g a las 79 h, la TS de la espuma fue de $27.973 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. La TS más baja medida fue de $27.947 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. En este cultivo, una vez que aparece la espuma la capacidad de dispersión de aceite aumentó de $4.546 \pm 0.432 \text{ cm}$ a $10.8667 \pm 0.514 \text{ cm}$.

Para la velocidad de aireación de 0.90 vvm, la espuma se recolectó a las 41.5 horas con una TS de $27.022 \pm 0.033 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. El valor más bajo de TS fue de $26.578 \pm 0.038 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, que fue la más baja de las cuatro velocidades probadas. No obstante, este parámetro aumentó a partir de las 65 horas de cultivo a $31.413 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, lo que indica que la concentración del surfactante ha disminuido debido a que éste ha comenzado a degradarse y perder estabilidad. Esto último se vio reforzado con la cinética de dispersión de aceite, pues a partir de las 65 horas disminuyó el diámetro del halo de dispersión, de 13.43 cm a 7.346 cm y a 1.97 cm al final del cultivo a las 68 horas; esto puede indicar que el biosurfactante se desnaturalizó en la espuma, lo que pudo apreciarse al determinar la CMC del producto desecado que fue de 1858 ppm, la más alta encontrada en este trabajo (Figura 16).



Figura 17. Aspecto de la espuma y el biorreactor a 0.80 vvm a las 66 horas de cultivo

A 1.0 vvm la espuma se formó más rápido como consecuencia del mayor flujo de aire empleado que propicia una mayor dispersión gas-líquido (Wallin *et al.*, 2010). A las 19.5 horas se recuperaron 200 mL y se tuvo una TS de $26.825 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, con lo que se infirió una

concentración alta del tensoactivo. En este cultivo se obtuvo la mayor cantidad de espuma formada y separada. La cantidad recuperada al final del proceso fue de alrededor de 400 mL, por lo que se obtuvo también la mayor cantidad de producto recuperado, 1.358 g/100 mL de espuma. Asimismo, se obtuvo el mayor rendimiento de producto dado que la concentración de biomasa alcanzada fue mayor, 1.218 g.

La cinética de dispersión de aceite arrojó junto con la de TS, que el producto disminuyó su concentración en la espuma conforme aumentó el volumen recuperado de ésta, diluyéndolo. A las 43.5 horas de cultivo aumentó la TS (de 27.377 a 28.229 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) y disminuyó el diámetro del halo de dispersión (de 10.436 a 5.663 cm). Estos datos indicaron que las mayores concentraciones de surfactante en la espuma se obtuvieron entre las 19 y las 25 horas, cuando se tienen los valores más bajos de TS y los más altos de dispersión (26.825 - 27.377 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y 6.923 - 10.436 cm respectivamente). La disminución de la concentración del biosurfactante en la espuma fue puesta de manifiesto al determinar la CMC del producto seco recuperado, que fue de 1778 ppm (Tabla 13).

Tabla 13. Concentración micelar crítica, tensión superficial y diámetro del halo de dispersión a las diferentes velocidades de aireación ensayadas

Velocidad de aireación (vvm)	CMC (ppm)	TS ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$)	Diámetro del halo (cm)
0.7	684	27.747	11.00
0.8	606	27.947	10.87
0.9	1858	26.578	13.43
1.0	1778	27.377	10.44

El BS obtenido en este trabajo mostró una actividad tensoactiva, en cuanto a disminución de la TS, comparable con la de la surfactina producida por *B. subtilis*, capaz de disminuir la TS del agua de 72 a 27 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ en concentraciones tan bajas como 0.005 % (Deng *et al.*, 2016; Mani *et al.*, 2016).

Empleando la ecuación de crecimiento modificada de Gompertz (Cayre *et al.*, 2001; Heryani y Putra, 2017), se ajustaron los datos de crecimiento de biomasa de cada una de las velocidades de aireación probadas a fin de obtener las velocidades de crecimiento. Los

resultados se resumen en la Tabla 14 La velocidad de crecimiento es función de las condiciones de cultivo y de la composición del medio, particularmente de las fuentes de carbono y nitrógeno. De acuerdo con los resultados, la velocidad de crecimiento resultó ser función de la velocidad de aireación.

Tabla 14. Velocidades de crecimiento y consumo de sustrato a diferentes velocidades de aireación, 180 rpm y 30°C

Aireación (vvm)	Velocidad de Crecimiento ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	Velocidad de consumo de sustrato ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
0.70	0.0438	1.078
0.80	0.0249	0.615
0.90	0.0243	0.690
1.02	0.0361	0.667

La tendencia general indicó que a mayor velocidad de aireación menor velocidad de crecimiento, no obstante, a 1.0 vvm se obtuvo que este parámetro vuelve a incrementarse. A 0.8 vvm la velocidad de crecimiento fue de $0.0249 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, en este cultivo pudimos recolectar espuma hasta las 66 horas de incubación, comparadas con las 17 horas a 0.70 vvm, 20 horas a 0.9 vvm, 41.5 horas a 0.9 vvm y 19.5 horas a 1.02 vvm.

En lo relativo a la velocidad de crecimiento, Sousa et al. (2014a), encontraron valores de 0.1 h^{-1} en un cultivo continuo usando un medio a base de glicerol como fuente de carbono y una velocidad de aireación de 0.25 vvm. Esto parece indicar que velocidades de aireación bajas favorecen la velocidad de crecimiento. Ghribi y Ellouze-Chaabouni (2011), dedujeron que las bajas y altas velocidades de aireación tienden a disminuir el rendimiento de síntesis del biosurfactante de *B. subtilis*, asimismo, encontraron que los mejores rendimientos se obtienen cuando la concentración de oxígeno disuelto se mantiene alrededor del 30%.

Las TS más bajas obtenidas para las diferentes velocidades de aireación, se resumen en la Tabla 15. Entre menor la TS, mayor la concentración del agente tensoactivo. Investigadores como Pereira et. al. (2013a) reportan que los valores más bajos de TS obtenidos usando la misma fuente de nitrógeno que en este estudio fueron $29.3 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, $29.5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y $29.9 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ para tres cepas de *B. subtilis* empleadas. Asimismo, utilizando sacarosa como fuente de carbono obtuvieron TS de $28.0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, $27.9 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y $28.4 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ para las cepas

mencionadas. En ninguno de los casos reportados, la TS alcanzó valores de $26.5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ que fue el más bajo obtenido en este trabajo.

Tabla 15. Resumen de resultados obtenidos para las velocidades de aireación empleadas

Velocidad de aireación (vvm)	TS más baja ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$)	Sustrato final ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Biomasa final ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Producto seco recuperado ($\text{g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}_{\text{espuma}}$)
0.70	27.982	1.641	0.983	0.563
0.80	27.947	0.438	1.007	0.892
0.90	26.578	0.336	0.939	0.984
1.00	27.373	1.434	1.218	1.358

De acuerdo con la columna 2 de la Tabla 15, se observó que se obtuvieron variaciones pequeñas en la TS, López-López (2006) al trabajar con cepas de *Bacillus* determinó que no hubo una correlación entre la actividad superficial del producto obtenida (evaluada como TS) y la velocidad específica de crecimiento. En este estudio tampoco se encontró una correlación debido a que en todas las velocidades de aireación estudiadas, se obtienen concentraciones suficientes para disminuir la TS alrededor de $27 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, que es la más baja alcanzada con el biosurfactante producido por cepas del género *Bacillus* (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008; Al-Bahry *et al.*, 2013; Cubitto *et al.*, 2004; Das y Mukherjee, 2007; Calvacante *et al.*, 2008; Amani *et al.*, 2010).

En este trabajo se utilizó como fuente de nitrógeno una sal inorgánica (NaNO_3) y se obtuvieron rendimientos similares a lo reportado por Pereira *et al.* (2013), quienes encontraron que los mejores rendimientos se obtuvieron cuando se empleó extracto de levadura, reportando la TS más baja de $38.3 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. En este trabajo, se obtuvo una TS considerablemente más baja (Tabla 15) con una fuente de nitrógeno más barata, lo que aunado a la separación por desecación simple o a su utilización directamente en forma de espuma colapsada, podría disminuir considerablemente los costos de producción del biosurfactante. El 60% de los costos de producción de la surfactina están relacionados con las operaciones de separación y purificación (José de Andrade y Maria Pastore, 2016) y el 30% de estos, con la materia prima y el medio de cultivo (Silva *et al.*, 2010).

De las cinéticas de crecimiento y de consumo de sustrato y los resultados reportados en la Tabla 15, se observó que el sustrato residual varió de 0.336g a 1.641g, lo que indicó que aún había sustrato disponible al momento de detener los cultivos. Sin embargo, se observó que el crecimiento de biomasa se volvió asintótico a las 47 horas para 0.70 vvm, a las 66 horas para 0.80 vvm, a las 65 horas para 0.90 vvm y a las 47.5 horas para 1.02 vvm. Este efecto ha sido reportado por otros investigadores (Sousa *et al.*, 2014a), los que sugirieron que la fuente de carbono no es el sustrato limitante, dado que esta se encontraba presente aún en cantidades considerables al final de la fermentación. Asimismo, este efecto podría indicar algún tipo de inhibición; a este respecto Seydovlá et al. (2013), explicaron este fenómeno argumentando que durante la producción de surfactina por cepas de *B. subtilis*, se dan cambios en la composición de la membrana celular, particularmente en la composición de los fosfolípidos, como respuesta a la producción de este compuesto. Según estos autores, cuando la concentración de surfactina aumenta al llegar a la etapa estacionaria de crecimiento, se encontró un incremento del 22% en el contenido de cardiolipina, un fosfolípido relacionado con el estrés ambiental. Como consecuencia, la rigidez de la membrana aumenta para enfrentar el efecto de fluidización por la surfactina, evitando la formación de poros. De acuerdo con estos autores, la presencia del biosurfactante puede provocar estrés celular y por tanto desencadenar una respuesta metabólica. Estos dos efectos, podrían explicar el hecho que a 1.00 vvm, velocidad de aireación a la que se obtienen las concentraciones más elevadas de producto (2.674 ± 0.079 g) el crecimiento se detenga, aun cuando existía una concentración considerable de sustrato disponible (1.43 g/L). Por otro lado, también es posible que algún otro nutriente u oligoelemento, haya sido consumido en su totalidad, lo que limitaría el crecimiento.

De acuerdo con los resultados de la Tabla 16, a mayores velocidades de aireación, se tienen los mayores rendimientos. A este respecto, Abdel-Mawgoud *et al.* (2008), reportaron rendimientos de producto crudo de $0.720 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en un medio a base de melazas y nitrato de sodio mientras que Makkar y Cameotra (2011) reportaron un rendimiento de $1.120 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, utilizando un medio de cultivo a base de sacarosa como fuente de carbono y de urea y nitrato de potasio como fuentes de nitrógeno. Los medios de cultivo de estos autores difieren del empleado en este estudio, que está preparado a base de azúcar mascabado y nitrato de sodio

como fuente de nitrógeno, con el que se lograron obtener rendimientos mayores en todas las velocidades de aireación probadas. En cuanto al rendimiento en base a biomasa, Sousa *et al.* (2014) encontraron un rendimiento de $0.23 \text{ g}_{\text{biosurfactante}} \cdot \text{g}_{\text{sustrato}}^{-1}$ usando glicerol como fuente de carbono, así como de $0.49 \text{ g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{g}_{\text{sustrato}}^{-1}$ de rendimiento de biomasa. Aun cuando las mayores velocidades de aireación arrojan los mejores rendimientos de producto, se observó que las mejores calidades de éste, referida como menor CMC, se obtienen a velocidades bajas, 0.7 y 0.8.

En base a los resultados obtenidos, se eligió la velocidad de aireación de 0.7 vvm para la producción del biosurfactante empleado en los experimentos de liberación de aceite y de biodegradación.

Tabla 16. Rendimientos obtenidos para los cultivos en biorreactor a diferentes velocidades de aireación

Velocidad de aireación (vvm)	Rendimiento de biomasa en base a sustrato ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) ^a	Rendimiento de producto crudo ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) ^b	Rendimiento de producto en base a biomasa ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) ^c	Espuma recuperada (mL)
0.70	0.104	1.127	1.109	300
0.80	0.106	1.727	1.715	300
0.90	0.098	1.906	2.040	300
1.02	0.110	2.674	2.194	400

a: Gramos de biomasa seca por gramo de sustrato. b: gramos de producto seco por litro de medio y c: gramos de producto seco por gramo de biomasa seca

Los productos concentrados obtenidos en el reactor a las diferentes velocidades de aireación se muestran en la Figura 18.

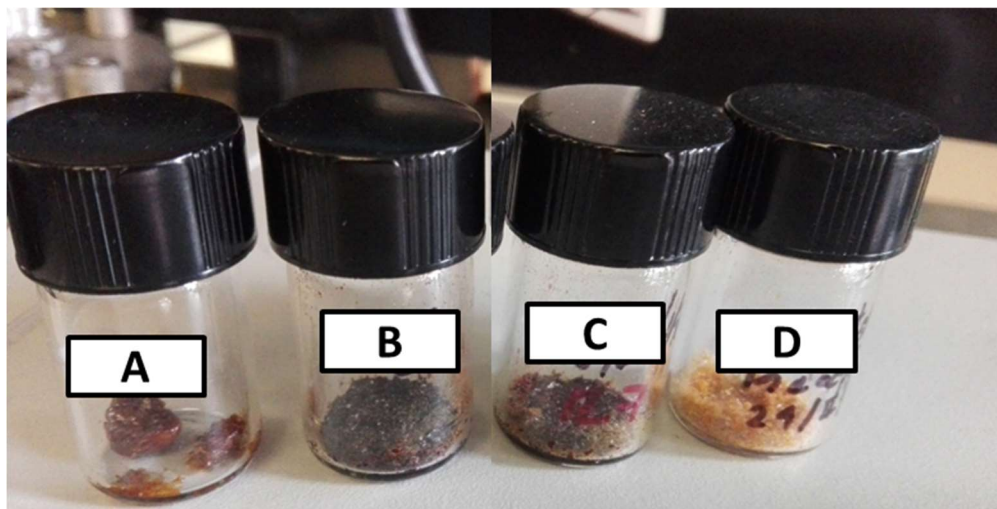


Figura 18. Productos secos obtenidos a diferentes velocidades de aireación A) 0.7 vvm, B) 0.8 vvm, C) 0.9 vvm y D) 1.02 vvm

5.3 CARACTERIZACIÓN DEL BIOSURFACTANTE

El espectrograma FTIR del BS obtenido demostró que éste posee hidrocarburos alifáticos y una fracción peptídica en su molécula, Figura 19. Las bandas de absorción más relevantes fueron encontradas en las longitudes de onda de 3320 cm^{-1} debida al estiramiento por la presencia de grupos amino (NH) atribuible a residuos peptídicos (Pereira *et al.*, 2013a); en 1650 cm^{-1} por el estiramiento del enlace CO-N; en 1590 cm^{-1} debida al modo de deformación del enlace N-H combinado con el estiramiento del enlace C-N; en 1250 cm^{-1} por la deformación y vibración del C-O (Deng *et al.*, 2016); en 2930 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} y 1370 cm^{-1} de los radicales $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}$ respectivamente; en 1750 cm^{-1} se observó la banda de absorción de grupos carbonilo (Birria *et al.*, 2010) (Shao *et al.*, 2015); el pico medio en 995 cm^{-1} mostró la presencia del enlace O-H propio de ácidos carboxílicos; en 621 cm^{-1} se observó la presencia del grupo $-\text{CH}_2$. Estos datos revelaron que el producto obtenido en este trabajo posee una estructura química de naturaleza lipopeptídica. Por otro lado, el espectrograma obtenido tuvo una gran similitud con los reportados por Pereira *et al.* (2013b), Sousa *et al.* (2014) y por Shao *et al.* (2015), quienes trabajaron con *B. subtilis* y concluyeron que el BS obtenido por ellos fue un lipopéptido similar a la surfactina, constituida por una cadena alifática unida a siete aminoácidos (Tang *et al.*, 2010). Se ha reportado que *B. subtilis* produce, entre otros, el lipopéptido surfactina, capaz de disminuir la ST del medio de

producción hasta 27 mNm⁻¹ (Al-Sulaimani *et al.*, 2011), valor obtenido en los ensayos realizados en este trabajo.

La comparación entre las bandas obtenidas en este trabajo y las de la surfactina (Al-Sulaimani *et al.*, 2011) e iturina (Zhao *et al.*, 2017) se presentan en la Tabla 17. Algunas cepas de *B. subtilis* producen una mezcla de surfactina e iturina, ambas con características tensoactivas (Pathak *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2020; Castillo-Campos, *et al.*, 2021) y otros compuestos de moderada capacidad tensoactiva como la fengicina, micosubtilina y bacilomicina (considerados como antibióticos). Existen tres tipos diferentes de surfactina, conocidos como A, B y C de acuerdo con su secuencia de aminoácidos; se sabe que las cepas del género *Bacillus* no producen un tipo único de este compuesto (Pereira *et al.*, 2013 y Shao *et al.*, 2015) sino que pueden producir una mezcla de este y sus isoformas (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008), algunas cepas de *B. subtilis* son capaces de producir mezclas de hasta ocho isoformas con pesos moleculares de 1030 a 1086 Da (Liu *et al.*, 2007). La surfactina es un lipopéptido cíclico lactónico de C₁₄ o C₁₅ (Shao *et al.*, 2015) cuya estructura está compuesta, como se mencionó anteriormente, por siete aminoácidos y un ácido graso β-hidroxilo, la secuencia de aminoácidos típica es L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu (Shao *et al.*, 2015), el último aminoácido puede ser Val (surfactina Val7), Ile (surfactina Ile7) (Tang *et al.*, 2010); algunas isoformas contienen Ala en el cuarto aminoácido, Asp en el primer aminoácido y Glu en el quinto aminoácido. La Iturina por su parte, posee una estructura péptido lactónica compuesta por un ácido graso unido a una cadena de siete aminoácidos L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser; una variedad conocida como iturina C tiene como secuencia L-Asp-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser (Ariza y Sánchez, 2012).

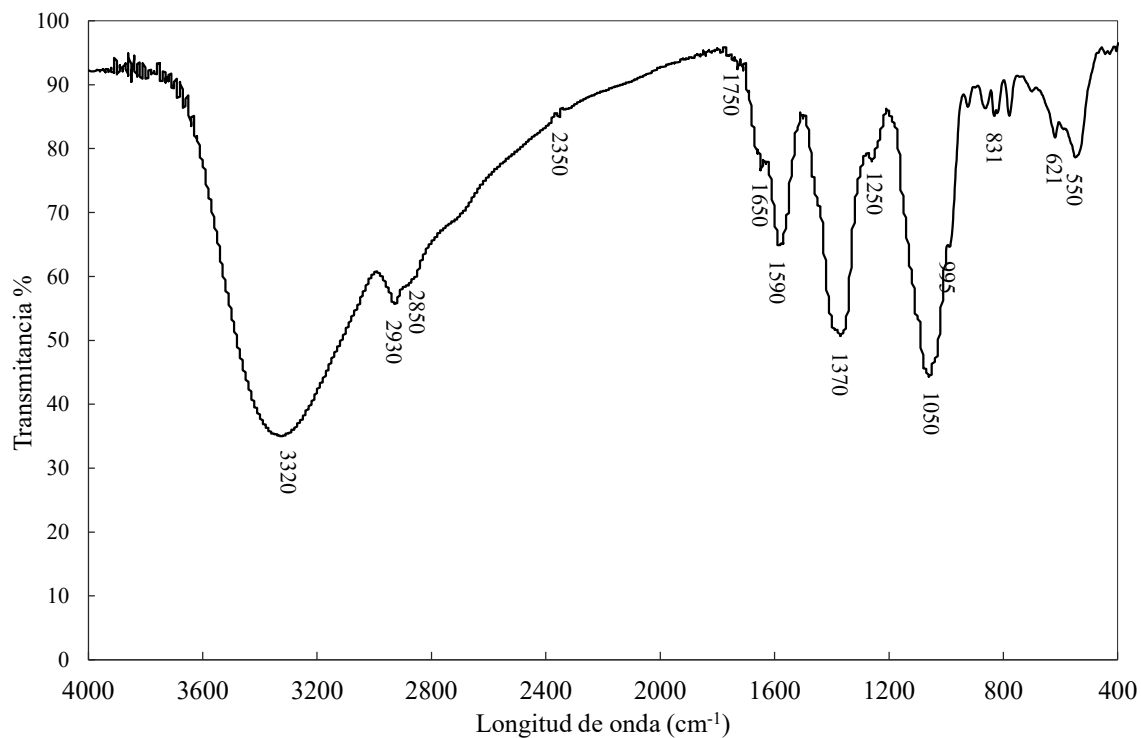


Figura 19. Espectrograma FTIR del biosurfactante obtenido

Tabla 17. Principales bandas de absorción FTIR del biosurfactante obtenido y comparación con las de la surfactina e iturina

Enlace/Vibración/Grupo Funcional	Banda de absorción (cm ⁻¹)		
	Este trabajo	Surfactina	Iturina
Vibración lactona carbonilo	1250	1389	1236
CH ₃ Doblamiento simétrico	1370	1388	1339 y 1449
NH Deformación, estiramiento del enlace C-N	1590	1541	1543
CO-N Doblamiento	1650	1652	1655
C=O Estiramiento carboxilo. No iónico	1750	1729	1720
CH ₃ -, CH ₂ -	2850	2850	2855
CH ₃ -, CH ₂ -	2930	2959 y 2930	2959
NH Estiramiento	3320	3313 y 3070	3400

5.4 ACTIVIDAD DEL BIOSURFACTANTE BAJO DIFERENTES CONDICIONES AMBIENTALES

Los resultados de la actividad tensoactiva como respuesta a diferentes condiciones de salinidad, pH y temperatura, se muestran en la Figura 20.

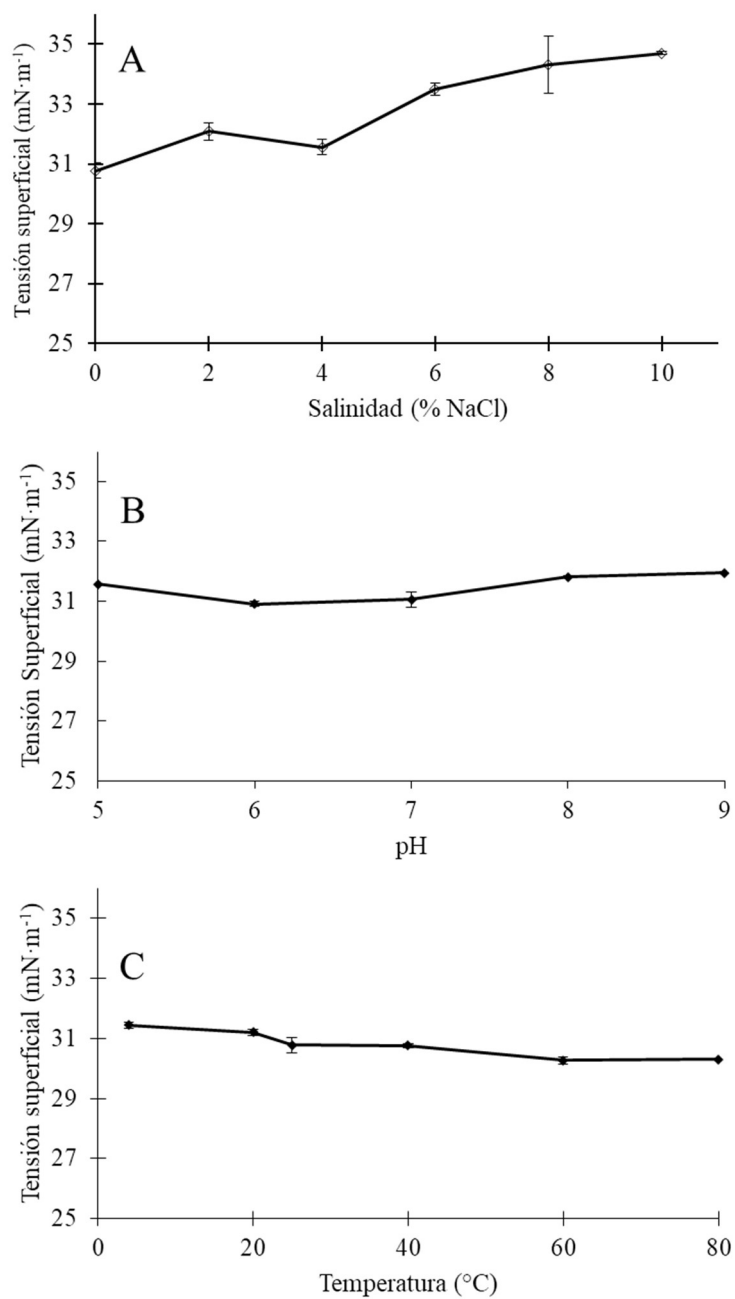


Figura 20. Actividad del biosurfactante bajo diferentes condiciones ambientales: A) Salinidad B) pH y C) Temperatura

La variación total de la actividad tensoactiva del BS producido por *B. subtilis* fue de 3.93 mN·m⁻¹ en el intervalo de salinidad ensayado. Entre 0 y 4% de NaCl las diferencias de la TS respecto al testigo no fueron significantes. Aunque a partir de 6% de concentración de sal, la tensión superficial aumentó, aún se observó actividad tensoactiva. A concentración de 10% de NaCl, la tensión permanece baja (34 mN·m⁻¹) respecto al control que fue de 72 mN·m⁻¹ (Tabla 18).

Tabla 18. Resultados de estabilidad del biosurfactante de acuerdo con la prueba de Dunnett*

NaCl (%)	TS (mN·m ⁻¹)	Dev. Std.	
0	30.78	0.25	1-α: 0.95
2	32.08	0.29	Comparaciones: 15
4	31.56	0.26	Valor t: 3
6	33.50	0.21	Grados de libertad: 12
8	34.31	0.96	Diferencia significativa: 2.36
10	34.71	0.06	n = 3

pH	ST (mN·m ⁻¹)	Dev. Std.	
5	31.58	0.00	1-a: 0.95
6	30.86	0.09	Comparaciones: 5
6.65	30.77	0.25	Valor t: 3
7	31.05	0.02	Grados de libertad: 12
8	31.09	0.04	Diferencia significativa: 0.285
9	31.89	0.10	n = 3

T °C	TS (mN·m ⁻¹)	Dev. Std.	
4	31.04	0.09	1-a: 0.95
20	31.01	0.10	Comparaciones: 15
25	30.78	0.25	Valor t: 3
40	30.76	0.07	Grados de libertad: 12
60	30.27	0.13	Diferencia significativa: 0.198
80	30.31	0.01	n = 3

*Control: ST=30.78 at 25°C, pH 6.65 and 0% NaCl

Respecto al pH el biosurfactante mostró estabilidad en todo el intervalo ensayado: la tensión superficial fue estadísticamente igual a la del testigo a pH cercanos al neutro (30.9 mN·m⁻¹ a pH 6 y 31.05 mN·m⁻¹ a pH 7) y no se encontraron diferencias significativas entre las TS

obtenidas a pHs ácido y alcalino evaluados ($31.579 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ a pH 5 y $31.949 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ a pH 9).

En cuanto a la temperatura, no se observaron diferencias significativas en la TS entre 4 y 40°C ; a partir de 60°C se observó un ligero aumento en la actividad tensoactiva (reflejado como disminución en la TS).

De acuerdo con los resultados, el BS conservó su actividad tensoactiva en salinidades comprendidas entre 0% y 4% de NaCl, en el intervalo de pH de 5 a 9 y en el intervalo de temperaturas comprendido entre 4 y 80°C .

Al conservar su actividad en los intervalos de salinidad, pH y temperatura ensayados, el biosurfactante probó también ser estable bajo esas condiciones ambientales. La actividad tensoactiva ha sido cuantificada por el índice de emulsión con aceites (E_{24}), la TS y la TIF; se considera estable el BS cuando la variación en el parámetro de medición no es muy amplia, esto ha permitido que algunos autores consideren estable un BS que conservó solo el 60% de su actividad tensoactiva después de someterlo a condiciones específicas (Udoh y Vinogradov, 2019; Al-Sulaimani *et al.*, 2011); en este trabajo se encontraron variaciones de la TS no mayores de 3% respecto al testigo (comprendido por espuma con TS de $30.777 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$).

Se ha reportado en la literatura que los electrolitos son un factor que afectan a los BS aniónicos como los lipopéptidos (de Andrade y Pastore, 2016; Bouassida *et al.*, 2018a), esto se debe a que la salinidad de la fase acuosa afecta la solubilidad relativa de los BS; cuando el BS comienza a perder solubilidad la TS aumenta (Fernandes *et al.*, 2016). La solubilidad de los BS peptídicos en fase acuosa está en función de la concentración de sal de manera similar al comportamiento de proteínas: la solubilidad aumenta conforme lo hace la concentración de sal, hasta un máximo a partir del cual la solubilidad comienza a disminuir (Tejeda *et al.*, 2011).

La estabilidad del BS a altas concentraciones de sal también puede deberse a su contenido de porciones hidrofílicas e hidrofóbicas. En el caso de compuestos de naturaleza peptídica, las sales eliminan el agua de la molécula hidratada. Dicha deshidratación deja las regiones hidrofóbicas libres para interactuar entre sí, de modo que aquellos compuestos con mayor

número de regiones hidrofóbicas en su superficie formarán agregados y precipitarán rápidamente. Dado que los BS poseen porciones hidrofílicas e hidrofóbicas en equilibrio, el fenómeno descrito no ocurre y por tanto podrán permanecer en solución a altas concentraciones de sal. A este respecto, Al-Sulaimani et al. (2011) reportaron que el lipopéptido producido por la cepa *B. subtilis* W19 perdió el 50% de su actividad tensoactiva a salinidades de 5%. El lipopéptido producido por *Achromobacter sp* tuvo una pérdida de más del 50% de actividad tensoactiva a salinidad de 6%. En este trabajo la pérdida de actividad a dicha salinidad fue de solo 8.88% (Deng et al., 2016).

El BS mostró estabilidad en todo el intervalo de pH contrastando con lo reportado por otros autores, que refieren mayor estabilidad a pH alcalinos (Bouassida et al., 2018 a y b; Al-Sulaimani et al., 2011). Lo anterior podría deberse a que a condiciones de pH ácidos los BS lipopeptídicos pierden solubilidad y comienzan a precipitar. El intervalo de estabilidad reportado para lipopéptidos producidos por *B. subtilis* es el comprendido entre pH de 6 y 12 (Deng et al., 2016) encontrándose la máxima actividad tensoactiva alrededor del pH neutro (Al-Sulaimani et al., 2011; Varadavenkatesan y Murty, 2013).

El efecto de la temperatura sobre la actividad del biosurfactante ha sido documentado anteriormente en la literatura disponible, en la que se ha sugerido que las temperaturas altas podrían afectar las formas de agregación del BS modificando la actividad tensoactiva (Karnanda et al., 2013). La estabilidad de BS a la temperatura también se ha relacionado con la fuerza de los enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de la porción hidrofílica y las moléculas de agua (Udoh y Vinogradov, 2019). Se ha reportado que la temperatura óptima para el lipopéptido obtenido a partir de dos cepas de *B. subtilis* fue de 40 °C (Bouassida et al., 2018a), en este trabajo se encontró que a 40°C la TS fue estadísticamente igual a la del testigo (30.76 y 30.78 mN·m⁻¹, respectivamente).

5.5 LIBERACIÓN DE ACEITE A DIFERENTES COMBINACIONES DE CONDICIONES AMBIENTALES

La roca caliza empleada para obtener la arena fue inicialmente mojable al crudo, ya que su ángulo de contacto con este fue de 117° en la condición inicial (sin el tratamiento con el BS); la arena por lo tanto resultó mojable al crudo y con una fuerte afinidad por este.

El diseño experimental empleado para los ensayos de liberación de aceite fue un arreglo ortogonal (OA) de Taguchi L_9 (Tabla 9; sección 4.11). Estos arreglos se caracterizan por permitir el análisis de un número grande de variables con un número reducido de corridas experimentales (Castorena-Cortés *et al.*, 2009), asimismo permite determinar las relación entre las variables de estudio y las interacciones que afectan a la variable respuesta. Las variables y sus niveles fueron seleccionadas en base a los resultados obtenidos previamente en los ensayos de actividad del biosurfactante bajo diferentes condiciones ambientales, y en el caso del ion SO_4^{2-} , en los reportes encontrados en la literatura acerca del efecto de iones determinantes en la recuperación de aceite y en el cambio de mojabilidad en las rocas que presentan interacción con dicho ion.

Después de siete días de incubación, las columnas de experimentación (Figura 21) fueron retiradas de las incubadoras y se dejaron enfriar a temperatura ambiente antes de realizar la medición del volumen liberado; el que se calculó considerando la densidad del aceite a 20°C como $0.964 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ y el diámetro interno de las columnas de 2.5 cm. Dado que a cada columna se le agregaron 3 ± 0.02 gramos de aceite que corresponde a un volumen de 3.112 ± 0.02 mL; a partir de éste valor y de los volúmenes obtenidos para cada tratamiento, se determinaron los porcentajes relativos de liberación. Los resultados obtenidos se enumeran en la Figura 22, las letras representan la distribución de medias de acuerdo con la prueba de la diferencia honesta significativa (DHS) de Tukey, datos con la misma letra indican que son estadísticamente semejantes y que no existen diferencias significativas entre ellos.



Figura 21. Aspecto de las columnas para los ensayos de liberación de aceite. A) Arena impregnada con el aceite pesado B) Columnas control con agua destilada y C) Columnas con el biosurfactante

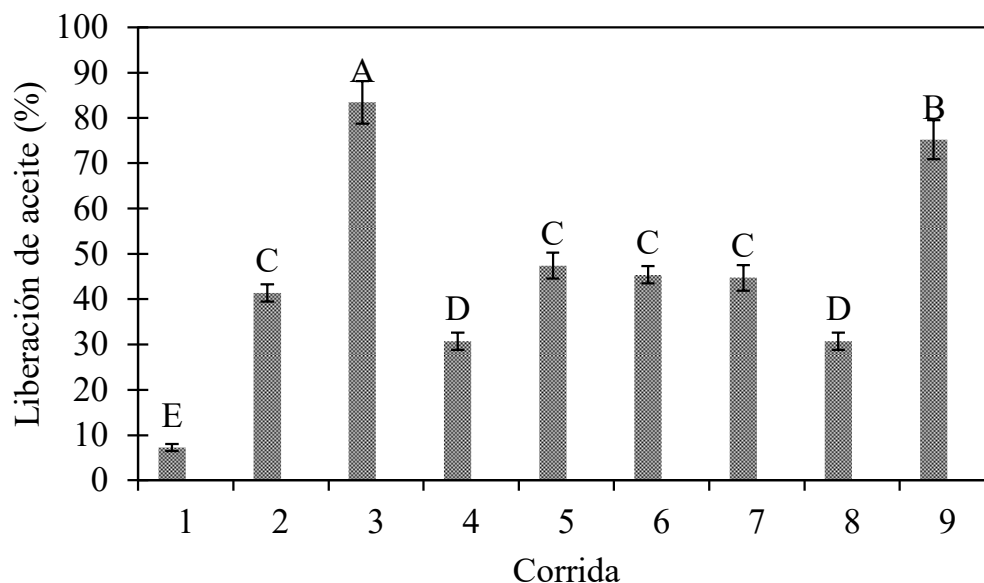


Figura 22. Liberación de aceite en porciento (%) de las corridas del diseño experimental. Las barras de error representan la desviación estándar.

En todos los casos, los controles no mostraron liberación de aceite o esta fue tan pequeña que no fue cuantificable (Figura 23). Debido a ello, la liberación fue atribuida a la presencia del biosurfactante y no a la fluidización del aceite por gradientes de temperatura o de concentración de sal.

El mejor resultado se obtuvo con el tratamiento 3, que correspondió a los niveles altos de temperatura, salinidad y concentración de ion sulfato y con el nivel bajo del tiempo de impregnación, es decir 50°C, 10% de NaCl, 0.01 M de SO_4^{2-} y 1 d. Los resultados menos favorables se obtuvieron con el tratamiento 1, que correspondió a los niveles bajos de los cuatro factores en estudio, 30 °C, 0% de NaCl, 0 M de SO_4^{2-} y 1 día de contacto aceite-arena.

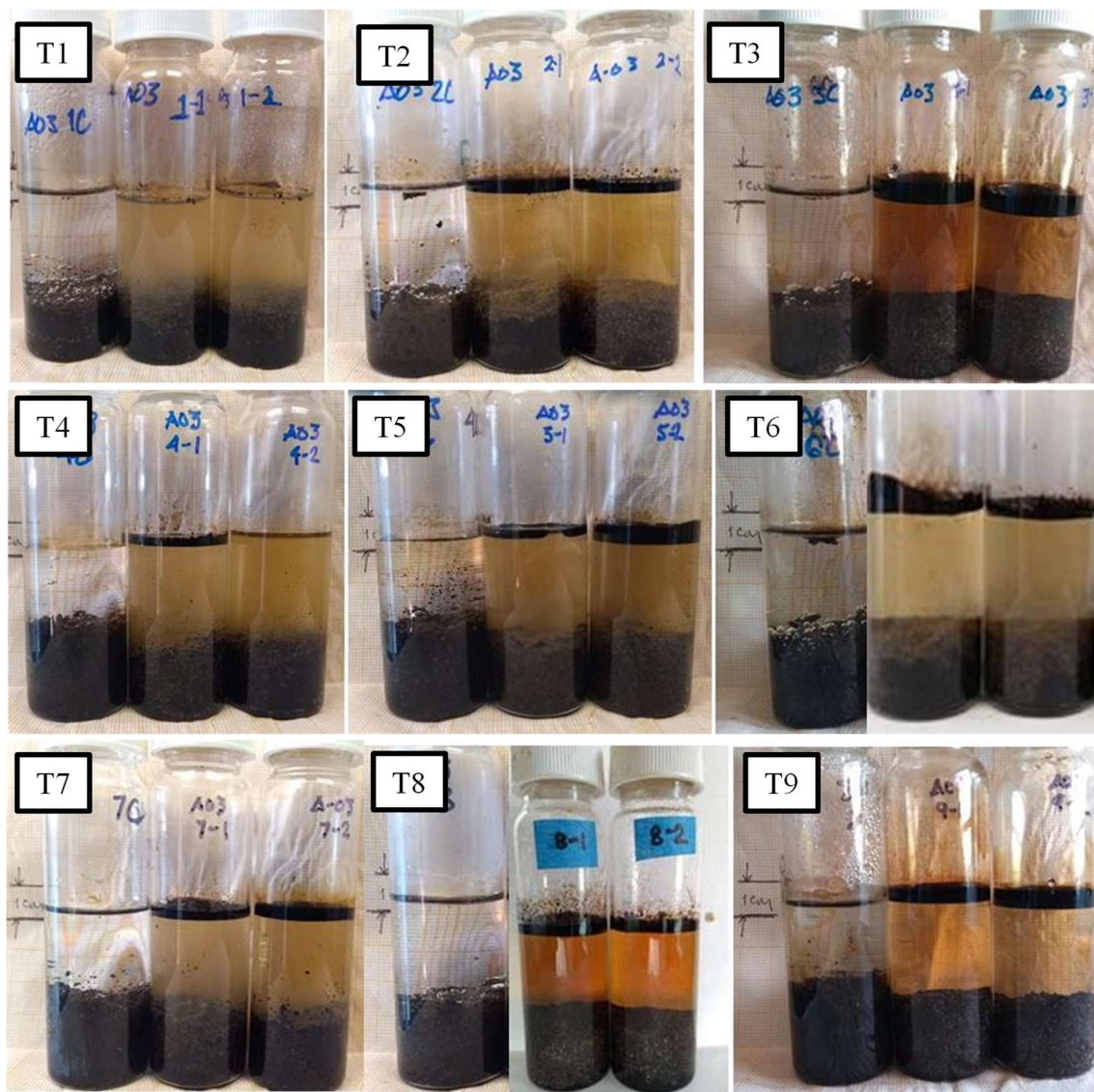


Figura 23. Tratamientos (T1 a T9) a los siete días de incubación. En todos los casos, el frasco a la izquierda representa el control

El análisis estadístico del DOE de Taguchi indicó que las variables que tuvieron mayor influencia en la liberación de aceite fueron la temperatura y la salinidad, Figura 24. El tiempo de impregnación en el intervalo estudiado, así como la concentración del ion sulfato resultaron ser de poca relevancia. El resultado respecto al tiempo de impregnación, contrasta con lo reportado por otros autores que indican que los tratamientos de recuperación son más efectivos cuando se aplican en las primeras horas después de sucedido un episodio de derrame de hidrocarburos (Abioye *et al.*, 2012; Bravo-Linares *et al.*, 2013). Por otro lado,

también podría sugerir que los tiempos de contacto aceite-arena probados en este trabajo, no fueron suficientes para observar diferencias significativas. Respecto al ion SO_4^{2-} , los resultados contrastan con lo reportado por Strand et al. (2006), quienes encontraron que la presencia de este ion provocó cambios en la mojabilidad de rocas en contacto con petróleo, lo que condujo a mejores tasas de liberación de este último. El SO_4^{2-} es uno de los iones reportados como influyentes en la mojabilidad de la calcita mojada por aceite. Se ha reportado que la interacción entre los iones de sulfato y de calcio, unidos a los grupos carboxilato de la superficie de la roca, es el mecanismo principal de alteración de la mojabilidad (Karimi *et al.*, 2016). Estos autores reportan que la presencia conjunta de iones SO_4^{2-} y un tensioactivo catiónico, pueden alterar las propiedades humectantes hacia el estado de mojabilidad por agua sobre la roca de manera más efectiva que los iones SO_4^{2-} solos. Debido a lo anterior, en este trabajo se decidió estudiar el efecto de la interacción del SO_4^{2-} con el BS obtenido, sin embargo, los resultados indicaron que la presencia del SO_4^{2-} no afectó de manera significativa la actividad del BS.

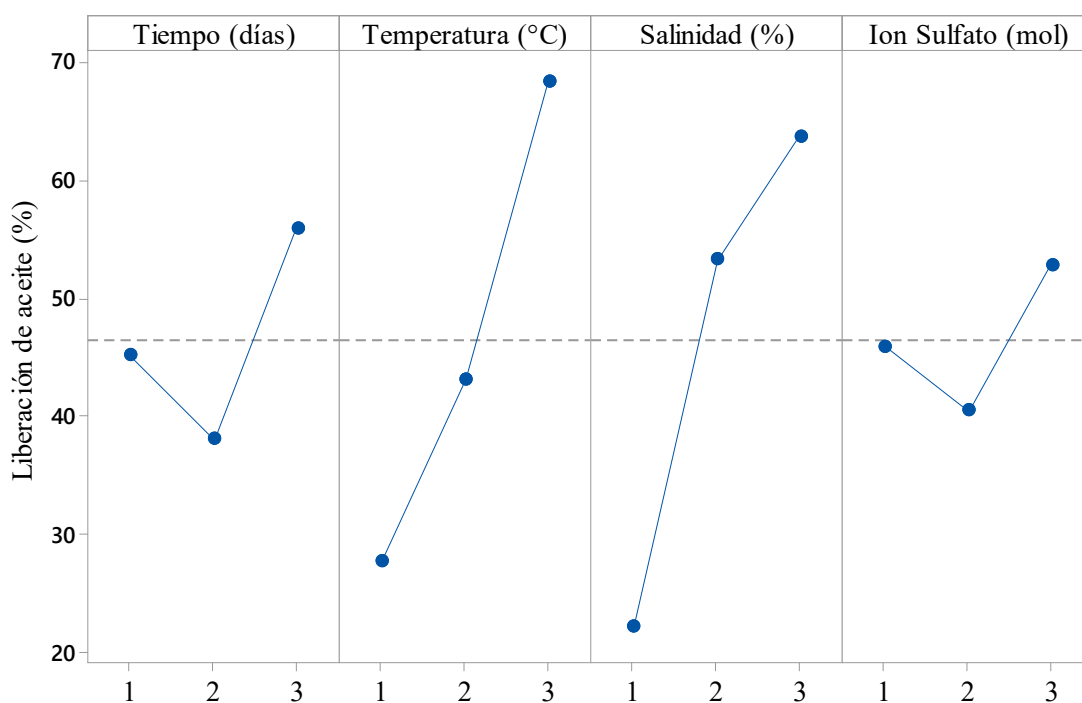


Figura 24. Resultados de liberación de aceite. La línea punteada representa la media global. Entre mayor es el tamaño del efecto, mayor es su influencia en la liberación de aceite

En los tratamientos con el nivel bajo de salinidad, 1, 6 y 8, la liberación obtenida mostró los valores más bajos. En contraste, los tratamientos con mayor concentración de sal (3, 5 y 7), se obtuvieron los valores más altos de liberación y particularmente el tratamiento 3, en el que la salinidad tiene el nivel más alto, se obtuvo la mayor liberación de aceite de acuerdo con el análisis estadístico. Al-Sulaimani et al. (2011), reportaron que la salinidad óptima para la actividad del biosurfactante producido por *B. subtilis* es de 15%, a dicha salinidad le correspondió una TIF de $3.21 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Resultados obtenidos previamente en este trabajo, demostraron que el biosurfactante conservó su actividad tensoactiva, medida como TIF, cuando la salinidad fue del 10%, con relación a espuma libre de sal. Karnanda *et al.* (2013) refieren que la liberación de aceite está supeditada a la disminución de las fuerzas interfaciales aceite-agua, cambiando la partición del aceite entre las fases, como resultado de la disminución en la TIF, resultando esto en uno de los mecanismos básicos para que se dé tal liberación.

En lo referente a la temperatura, los resultados de estabilidad obtenidos en este trabajo demostraron que a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (nivel alto en los experimentos de liberación) la espuma conserva sus propiedades tensoactivas, en lo referido a su capacidad para disminuir las TS y TIF. La temperatura promueve una disminución de la densidad y la viscosidad de los aceites, cambiando el equilibrio entre las fuerzas de gravedad y de flotación de estos, lo que provoca su liberación de los espacios en que se encuentran. Los resultados en los controles demostraron que la temperatura por sí sola, no tiene ningún efecto en la liberación del aceite empleado. A $50 \text{ }^\circ\text{C}$, la densidad del aceite fue de $0.9436 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ y la viscosidad fue de $413 \text{ mPa}\cdot\text{s}$. La densidad se modificó un 2% respecto al valor de referencia a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ($0.9637 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) y esto podría explicar en parte la poca influencia de la temperatura por sí sola. Aunque se observó un cambio considerable en la viscosidad (10.32 veces menor respecto a $4263 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$), las propiedades de adhesión del aceite a la caliza y su alto nivel de cohesión impiden que tal disminución por sí sola tenga un efecto considerable en la liberación del aceite, como quedó constatado por la nula liberación en los controles. De aquí que la liberación del aceite haya estado supeditada a la acción del biosurfactante bajo las diferentes condiciones ambientales probadas y no por efectos puramente físicos.

El análisis de varianza de las relaciones señal a ruido y de medias de liberación de aceite, se muestran en la Tabla 19. La concentración de sal (como % de NaCl) arrojó los mayores valores de la sumatoria de cuadrados (SC) y de la media de los cuadrados (CM), seguida de la temperatura y la concentración del ion sulfato. Entre mayores sean los parámetros SC y CM, es mayor el efecto del factor estudiado sobre la variable de respuesta (Krottmaier, 1993).

Tabla 19. Análisis de varianza de relaciones señal a ruido y medias de liberación de aceite

Factor	GL	SC	CM	Clasificación de efectos
t (h)	2	104.548	52.274	4
T (°C)	2	218.916	109.458	2
Sal (%)	2	327.328	163.664	1
SO4 (molar)	2	124.126	62.063	3
Total	8	774.918		

GL: grados de libertad; SC: sumatoria de cuadrados; CM: media de los cuadrados

Con los factores que afectan en mayor medida a la liberación de aceite, se construyó la gráfica de superficie de respuesta de la liberación en función de la temperatura y la salinidad, Figura 25. Los mayores porcentajes de liberación teóricos se obtendrían a concentraciones altas de sal y a temperaturas altas (10 % y 50 °C, respectivamente).

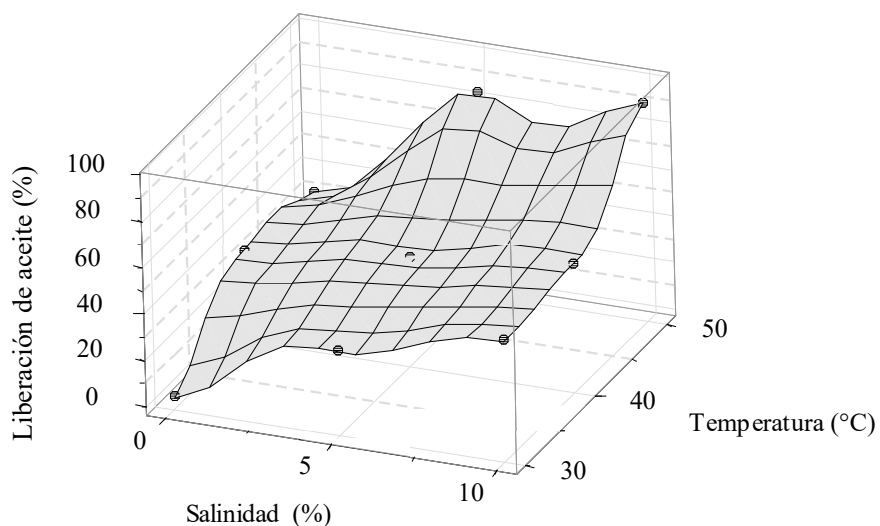


Figura 25. Superficie de respuesta de la liberación de aceite en función de la temperatura y la salinidad

La predicción de Taguchi estimó que la liberación bajo las mejores condiciones experimentales sería de 93.69 %. Esta se realizó fijando las variables de estudio en sus niveles altos 120 h, 50 °C, 10 % de NaCl y 0.02 M de SO_4^{2-} (resultados obtenidos con el programa MiniTab 18).

La tensión superficial de la espuma a partir de la cual se realizaron las mezclas fue de 27.7 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, la TIF en el medio con biosurfactante y una gota del aceite fue 1.4 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Los resultados de la determinación de la TS de los tratamientos y sus controles se presentan en la Tabla 20. La menor tensión superficial la presentó el tratamiento 9. Los menores valores de esta variable se obtuvieron con la temperatura de 50 °C. Se ha demostrado que existe una dependencia de la tensión superficial a la temperatura y que conforme esta última aumenta, la primera disminuye (Karnanda *et al.*, 2013). Los tratamientos a 50 °C (3, 6 y 9), por otro lado, también son los de concentración alta de NaCl. A pesar de las variaciones encontradas en la TS, este parámetro se mantiene en valores bajos en todas las combinaciones de condiciones ambientales probadas, mostrando la actividad de superficie del BS.

Tabla 20. Tensión superficial de los tratamientos y sus controles

Corrida	Tensión Superficial ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$)				Reducción %
	Tratamientos	Desv. Std	Controles	Desv. Std	
1	29.757	± 0.055	70.98	± 0.78	58.08
2	28.180	± 0.259	70.33	± 0.87	59.93
3	27.276	± 0.082	69.94	± 0.52	61.00
4	29.498	± 0.200	70.53	± 1.72	58.18
5	28.917	± 0.166	69.97	± 2.21	58.67
6	26.508	± 0.121	69.32	± 0.33	61.76
7	30.357	± 0.247	71.62	± 0.84	57.61
8	27.377	± 0.134	69.15	± 0.76	60.41
9	27.451	± 0.162	69.20	± 0.46	60.33

La TIF más baja se obtuvo con el tratamiento 9, que corresponde a la combinación espuma-5% de NaCl-50 °C (Tabla 21).

Tabla 21. Tensión interfacial de los tratamientos y sus controles

Corrida	T.IF. (mN·m ⁻¹)				
	Tratamientos	Desv. Std.	Controles	Desv. Std.	% Reducción
1	1.58	0.19	12.64	0.22	87.52
2	3.46	0.36	16.29	0.49	78.74
3	2.70	0.20	12.33	0.69	78.09
4	2.10	0.07	13.49	0.26	84.43
5	4.49	0.16	13.19	0.37	65.95
6	2.32	0.09	18.71	1.94	87.62
7	2.51	0.13	11.41	0.13	78.03
8	2.63	0.22	17.53	1.01	84.97
9	1.27	0.07	13.83	0.93	90.84

Trabajos relacionados a movilidad de aceite reportaron un efecto de la temperatura, la salinidad y la concentración de surfactante sobre la TIF, a su vez este parámetro se ha correlacionado con la movilidad de aceite en reservorios rocosos, encontrando que una disminución en la TIF redundaba en mayor movilidad y por tanto liberación y recuperación de aceite (Al-Shhaf, 2005). Se ha reportado que un aumento en la salinidad conlleva a un incremento en la TIF, es decir a una disminución en la actividad tensoactiva (Law y Zhao, 2016). En contraste, en este trabajo los mejores resultados se obtuvieron en los niveles altos de salinidad. En los experimentos de liberación, quedó demostrado que el BS mantuvo sus propiedades tensoactivas a salinidades altas.

La liberación de aceites de medios poroso está supeditada a la disminución de las fuerzas interfaciales agua-aceite y arena-aceite, lo que puede lograrse usando un BS para promover una disminución en la TIF y también modificar la mojabilidad (Law y Zhao, 2016). La disminución de la TIF por biosurfactantes en presencia de sales ha sido observada y reportada anteriormente por diversos autores (Karnanda *et al.*, 2013), algunos trabajos encontraron que la salinidad favorece la liberación de aceites actuando como coadyuvante del BS utilizado (Al-Sulaimani *et al.*, 2012). De Andrade y Pastore (2016), al trabajar con diferentes cationes y surfactina, determinaron que la presencia del catión Na⁺ derivó en TS bajas, por lo que concluyeron que dicho catión favoreció la actividad tensoactiva. Otra explicación plausible

es la dada en (Fernandes *et al.*, 2016), quienes arguyen que la salinidad afecta la partición del BS, un aumento en la concentración de ésta en la fase acuosa promueve la migración de las moléculas del BS hacia el aceite. La concentración óptima de sal para la liberación de aceite es aquella que promueve la acumulación del BS en la interfase agua-aceite (Santos *et al.*, 2016), que generalmente se corresponde con valores bajos de ST y TIF, tales como los encontrados en este trabajo. Concentraciones por encima de la óptima conllevan a aumentos en las TS y TIF, esto sugiere que esta concentración no fue rebasada en este estudio, ya que estos parámetros permanecieron en valores bajos en los nueve tratamientos. Respecto al efecto de la temperatura, De Andrade y Pastore, (2016) sugieren que las altas temperaturas pueden afectar las formas de agregación modificando la actividad tensoactiva.

5.5.1 DISPERSIÓN DE ACEITE

El diámetro del halo de dispersión de aceite logrado con la espuma de trabajo fue de 7.2 ± 0.2 cm, a temperatura ambiental. Los tratamientos a las diferentes combinaciones de factores ambientales demostraron conservar la capacidad de dispersar el aceite, Figura 26. El diámetro del halo de dispersión de los tratamientos se encontró entre un 60% (tratamiento 5) y un 87% (tratamiento 8) con respecto a la espuma de referencia. Los diámetros obtenidos con los controles se encontraron alrededor de 1 cm, por lo que la dispersión lograda es atribuible a la acción del BS.

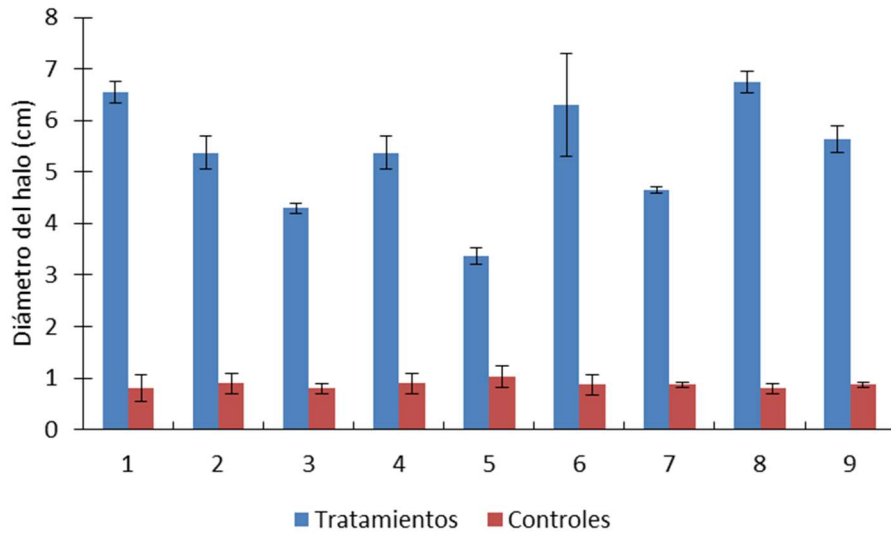


Figura 26. Gráfica comparativa de los diámetros del halo de dispersión. Se presenta la desviación estándar.

5.5.2 EVALUACIÓN DE LA MOJABILIDAD

Respecto a la mojabilidad evaluada en función del ángulo de contacto, se observó que después del proceso de impregnación con el aceite, las rocas fueron mojables al aceite, ya que el ángulo de contacto fue mayor a 90° en todos los casos (Tabla 22). Después del proceso de imbibición con el biosurfactante y bajo las combinaciones de condiciones probadas, la mojabilidad de las rocas se modificó a ser mojables preferentemente por agua, al presentar ángulos menores a 90° que es la condición de referencia (Figura 27). El ángulo de contacto reportado es el obtenido utilizando agua destilada como líquido circundante, ya que se observó que este fue menor incluso al obtenido usando la misma mezcla de los tratamientos (Figura 28). Se observó también, que el cambio de mojabilidad fue independientemente del tiempo de impregnación.

Tabla 22. Ángulos de contacto de los tratamientos antes y después del proceso de imbibición con el biosurfactante bajo las diferentes combinaciones de condiciones ambientales

Tratamiento	Antes de la imbibición	Después de la imbibición	Reducción %
1	112.11°	51.92°	53.69
2	127.19°	44.18°	65.26
3	113.47°	46.98°	58.60
4	118.50°	37.66°	68.22
5	113.70°	62.10°	45.38
6	130.23°	47.42°	63.59
7	113.69°	38.61°	66.04
8	127.05°	45.30°	64.34
9	117.04°	46.91°	59.93

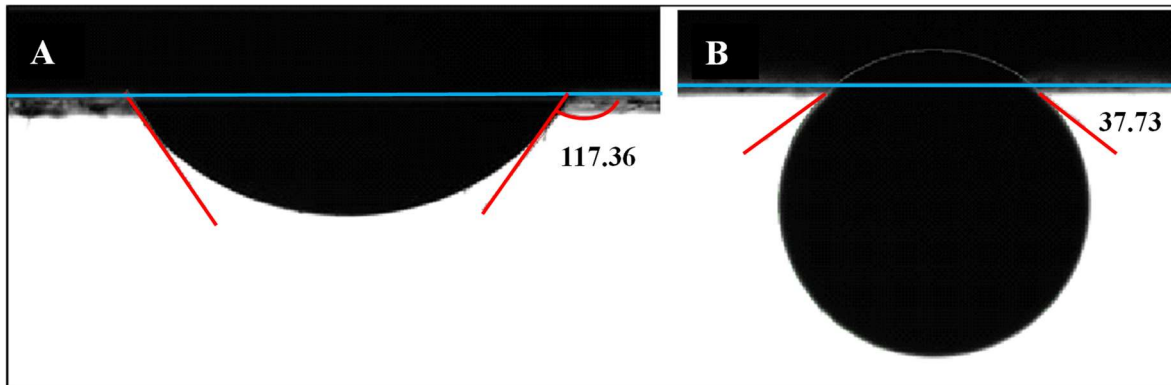


Figura 27. Cambio de mojabilidad en los tratamientos. A) Antes del proceso de imbibición en el biosurfactante y B) Después del periodo de incubación.

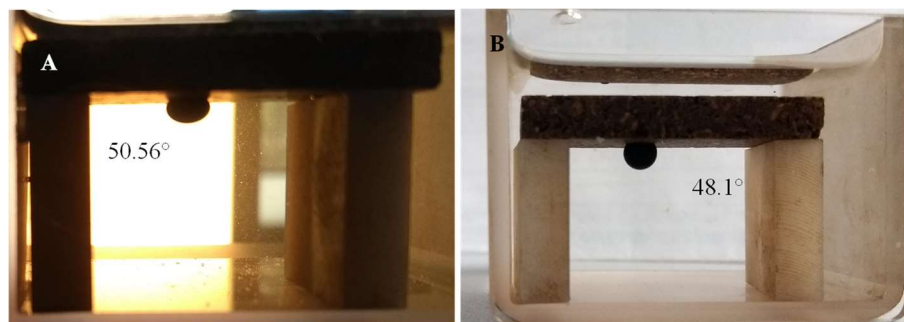


Figura 28. Ángulo de contacto del tratamiento 1 en A) Sistema con BS y B) Sistema con agua destilada

Se apreció también un cambio de aspecto en las rocas después de la imbibición inicialmente se observaron totalmente impregnadas de aceite y después de la imbibición se observaron

con superficies más limpias y libres de aceite. Se pudo apreciar la liberación de gotas de aceite en las rocas tratadas con el biosurfactante, Figura 29.

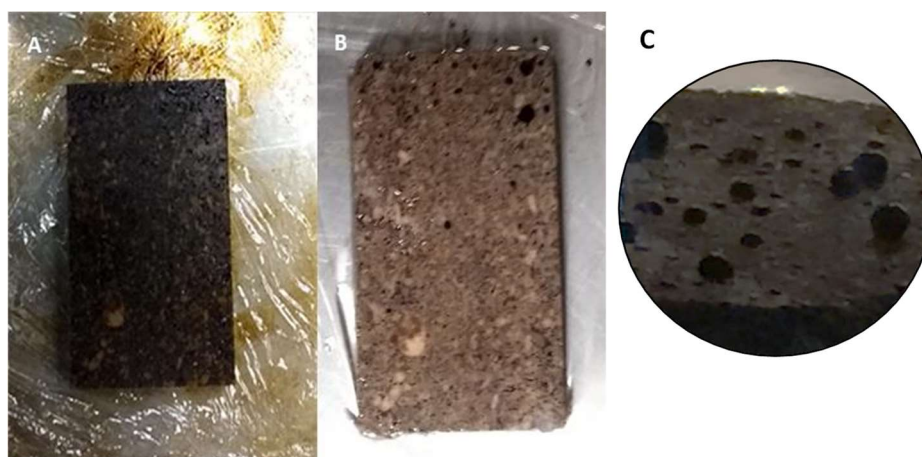


Figura 29. Aspecto de la roca del tratamiento 2 A) después de la impregnación y B) después del periodo de imbibición. C) Liberación de gotas de aceite en rocas tratadas con el biosurfactante

La disminución de la TIF entre el aceite y el agua y la modificación de la mojabilidad son mecanismos básicos de acción de los BS en los procesos de liberación, recuperación y movilización de aceites; la modificación de la IFT se observó en todos los tratamientos mientras que la disminución de las fuerzas interfaciales arena-aceite quedó constatada por el cambio de mojabilidad observado. A este respecto, Sharma y Padey (2020) reportaron disminuciones del ángulo de contacto usando parafina como superficie hidrofóbica y agua como líquido de prueba, el ángulo de contacto inicial fue de 96° y después de tratar la superficie con el biosurfactante producido por la cepa *B. subtilis* RSL-2, el ángulo de contacto fue de 73° . Estos autores concluyen que el biosurfactante obtenido mejoró las interacciones sólido-líquido en la superficie hidrofóbica.

En este trabajo, se obtuvieron cambios de mojabilidad más considerables usando un crudo pesado y un sustrato sólido más cercano a lo que se pudiera encontrar en episodios de derrame en suelos, el biosurfactante propiciaría una mejor interacción con el aceite y resultaría útil en su liberación y en aplicaciones de recuperación de suelos.

5.5.3 EFECTO SINÉRGICO ENTRE LA TEMPERATURA Y LA SALINIDAD Y MECANISMO DE TRANSPORTE DE MASA

El tratamiento 6 de la Tabla 9 que presenta un nivel alto de temperatura y el bajo de salinidad (0%), tuvo una liberación de aceite de 45.38%, de aquí que el solo efecto de la temperatura no es suficiente para arrojar remociones por arriba del promedio global de 45.12% a pesar de que la temperatura disminuye la viscosidad del aceite; por otro lado, aunque el tratamiento 1 con un nivel bajo de temperatura y salinidad tuvo TS y TIF bajas y fue capaz de disminuir el AC, solo arrojó liberación de aceite del 7.25%; lo anterior podría denotar un efecto sinérgico de la temperatura y salinidad sobre el comportamiento del biosurfactante. Dicho efecto observado podría explicarse en los siguientes términos: dado que se ha sugerido que la salinidad promueve la migración de moléculas de BS hacia la interfase agua-aceite (Fernandes *et al.*, 2016) y la temperatura provoca el movimiento de los fluidos, esta combinación de factores resultaría en mayores tasas de transporte del BS desde la fase líquida hasta la interfase citada.

En la literatura existen reportes en los que se ensayó el efecto individual de factores ambientales sobre el BS producido cepas de *Bacillus subtilis* (Mani *et al.*, 2016; Bouassida *et al.*, 2018a). En estos estudios se usaron crudos ligeros (20.3°API) (Fernandes *et al.*, 2016), fracciones de petróleo o aceites de motor (Bouassida *et al.*, 2018b) impregnando arena de playa en concentraciones relativamente bajas (entre 50000 y 73000 ppm) y se usaron velocidades de agitación de hasta 150 rpm. En este trabajo la concentración del crudo fue muy elevada (300000 ppm) y las unidades de prueba no fueron agitadas, encontrándose resultados similares en cuanto a liberación (80 y 90%). Por otro lado, en algunos de estos reportes se usó el BS purificado, mientras que en el presente trabajo se propone su utilización en forma de espuma colapsada.

Comparando con sistemas en los cuales se empleó como surfactante un rhamnolípido, Aparna *et al.* (2012), reportaron la liberación de 89% y 92% de un crudo usando concentraciones de 0.01 y 0.05% de éste biosurfactante; no se indicó el tipo de crudo y las unidades

experimentales fueron agitadas a 150 rpm. La agitación modifica el régimen de flujo y mejora el transporte de materia entre fases, además de afectar el estado físico del aceite (Joekar-Niasar y Hassanizadeh, 2012). En este trabajo los sistemas consistieron en un medio poroso en contacto con el BS y no se empleó agitación, por lo que la transferencia de materia estuvo supeditada a la difusión y convección natural, ambos mecanismos influidos por la temperatura. A este respecto los tratamientos con el nivel alto de salinidad tuvieron una densidad de alrededor de 10% mayor a aquellos con el nivel bajo, lo que provocaría diferencias de densidad más extensas, explicando el efecto sinérgico observado entre temperatura y salinidad.

Los resultados de los factores que afectan la liberación del aceite se resumen en la Tabla 23. Con estos resultados se observó que hubo un efecto combinado de los mecanismos de modificación de la mojabilidad (medida como la disminución del ángulo de contacto), la conservación de la actividad tensoactiva en cuanto a disminución de la TS y la TIF y la estabilidad del biosurfactante a la temperatura y la salinidad.

Tabla 23. Resumen de resultados de factores que afectan la actividad del biosurfactante durante la liberación del crudo pesado

Factores/Niveles		Resultados											
Corrida	Tiempo de impregnación (días)	Temperatura (°C)	Salinidad (% NaCl)	SO ₄ ⁻² (mol)	Liberación de aceite ^a (%)	TS (mN·m ⁻¹)		TIF (mN·m ⁻¹)		AC ^b		Diámetro del halo de dispersión de aceite (cm)	
						Tratamiento	Control	Tratamiento	Control	Tratamiento	Control	Tratamiento	Control
1	1	30	0	0.00	7.2 ± 0.8	27.7±0.1	70.9±0.7	1.5±0.2	12.6±0.2	51.9°	112.1°	6.55	0.81
2	1	40	5	0.01	41.3 ± 1.8	28.1±0.2	70.3±0.8	3.4±0.3	16.2±0.4	44.1°	127.1°	5.37	0.89
3	1	50	10	0.02	83.4 ± 4.7	27.2±0.1	69.9±0.5	2.7±0.2	12.3±0.6	46.9°	113.4°	4.30	0.80
4	4	30	5	0.02	30.7 ± 1.8	29.4±0.2	70.5±1.7	2.1±0.1	13.4±0.2	37.6°	127.2°	5.37	0.89
5	4	40	10	0.00	47.3 ± 2.8	28.9±0.1	69.9±2.2	3.4±0.1	13.1±0.3	60.1°	122.5°	3.37	0.88
6	4	50	0	0.01	45.3 ± 1.8	26.5±0.1	69.3±0.3	2.3±0.1	18.7±1.9	47.4°	130.2°	6.30	0.88
7	5	30	10	0.01	44.7 ± 2.8	30.3±0.2	71.6±0.8	2.5±0.1	11.4±0.1	43.8°	127.0°	4.65	0.88
8	5	40	0	0.02	30.7 ± 1.8	27.3±0.1	69.1±0.7	2.6±0.2	17.5±1.0	45.3°	127.0°	6.75	0.87
9	5	50	5	0.00	75.1 ± 4.2	27.4±0.1	69.2±0.4	1.2±0.1	13.8±0.9	46.9°	117.0°	5.63	0.89

a. La liberación de aceite no fue cuantificable en los controles ya que prácticamente no se liberó aceite.

b. Ángulos de contacto menores a 90° indican una mojabilidad preferente al agua, mientras que mayores a este valor, indican una mojabilidad de las rocas preferente al aceite

5.6 BIODEGRADACIÓN DEL CRUDO PESADO CONTAMINANDO ARENA DE ROCA CALIZA

5.6.1 PRODUCCIÓN DE CO₂ COMO INDICADOR DE LA BIODEGRADACIÓN MEJORADA DEL CRUDO

La producción de CO₂ es una medida indirecta del crecimiento celular y de la utilización de los hidrocarburos como fuente de carbono hasta su completa mineralización (Castorena-Cortés *et al.*, 2009), una mayor producción de este gas indica mayor biodegradación del crudo. Este parámetro se empleó para evaluar la biodegradación de los ensayos descritos en la sección 4.12.3. La producción acumulada de CO₂ de los tratamientos de biodegradación se graficó en función del tiempo en la Figura 30; no se observó la presencia de fase de adaptación, también llamada fase lag, en ninguno de los tratamientos. Asimismo, el control abiótico (AB) no produjo CO₂.

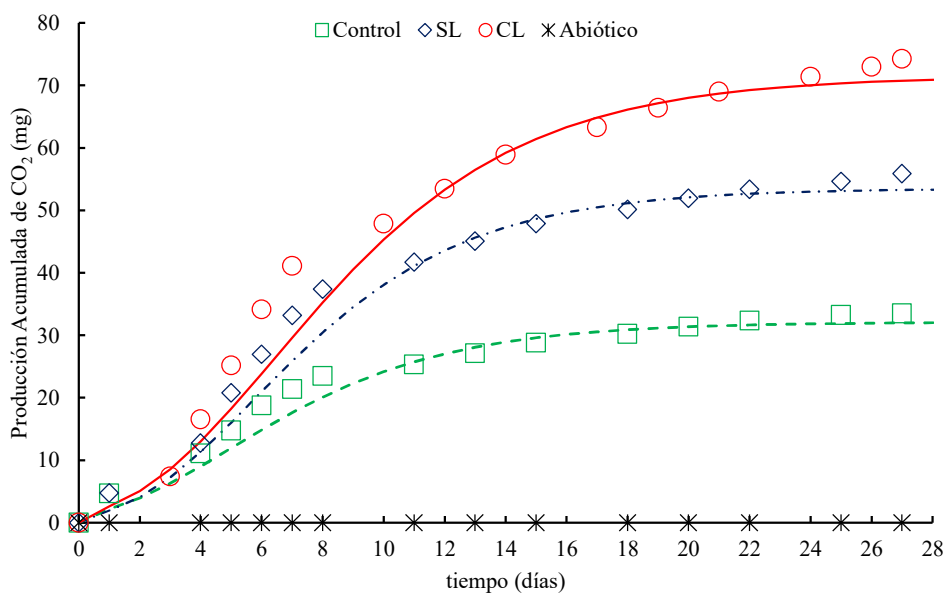


Figura 30. Producción de CO₂ por los tratamientos de biodegradación del crudo pesado impregnado en arena de roca caliza

La producción final de CO₂ del tratamiento SC (control sin crudo) fue de 33.41 mg. Dado que SC no contaba con fuente de carbono, el crecimiento del microorganismo y la producción de CO₂ estuvieron ligados a la utilización de los componentes del medio de cultivo como fuentes de energía y nitrógeno. Los datos obtenidos de este tratamiento fueron restados de los tratamientos SL (tratamiento sin biosurfactante) y CL (tratamiento con biosurfactante) para estimar las velocidades de producción de CO₂ y la producción potencial de CO₂ atribuibles a la degradación del crudo.

El tratamiento con aceite SL, mostró la biodegradación del aceite atribuible a la acción metabólica del microorganismo y se utilizó como referencia del comportamiento del sistema sin mediación del BS. La utilización de los componentes del aceite como fuente de carbono y energía, dio como resultado una producción de CO₂ de 55.88 mg totales al final del experimento. El tratamiento con biosurfactante CL fue utilizado para estudiar el efecto de este en la biodegradación del aceite, la producción final de CO₂ fue de 74.23 mg, que resultó ser 32.84% mayor respecto a SL. Después de restar los datos de producción del control SC y dividirlos por la masa de aceite, la producción neta de CO₂ por gramo de aceite fue de 41.636 mg·g_{aceite}⁻¹ y 78.84 mg·g_{aceite}⁻¹ para SL y CL respectivamente (Figura 31). Los resultados anteriores señalan que el pretratamiento con el biosurfactante mejoró la producción de CO₂ relacionada con la biodegradación del aceite en un 85.94%, respecto al tratamiento SL.

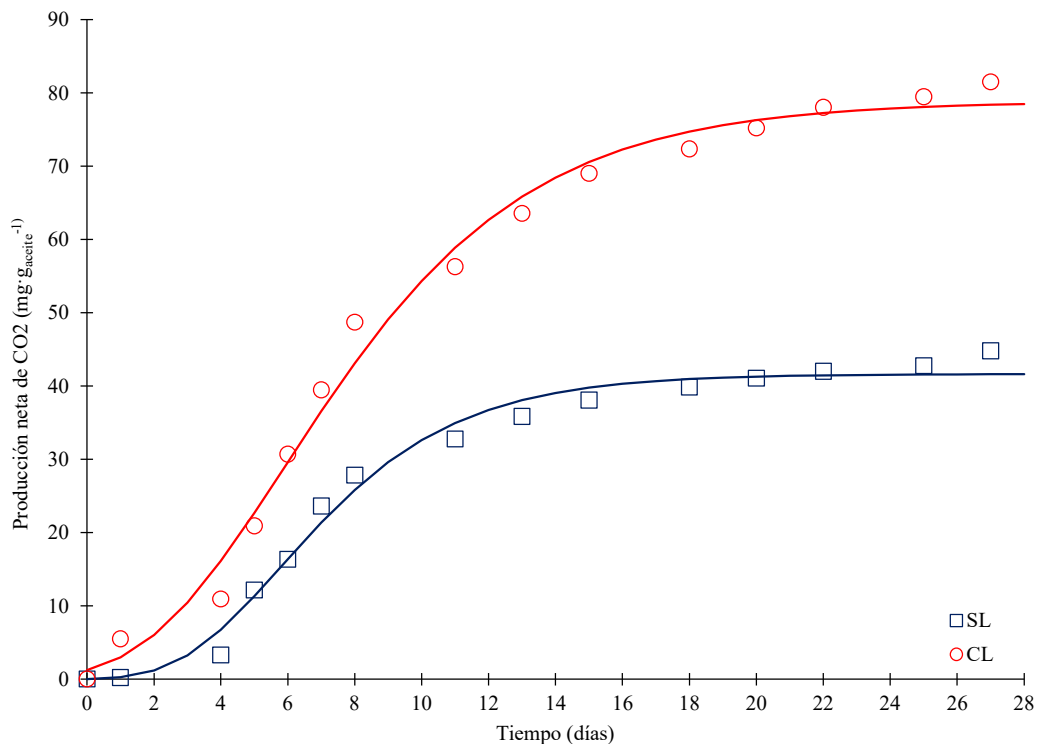


Figura 31. Producción neta de CO₂ debida a la biodegradación del crudo. Tratamientos sin biosurfactante SL y con biosurfactante CL

La producción de CO₂ estuvo relacionada con la degradación del aceite, una mayor velocidad de producción de CO₂ indica una mayor velocidad de biodegradación. La velocidad máxima de producción de CO₂ del tratamiento CL fue de $6.29 \text{ mg} \cdot \text{g}_{\text{aceite}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ siendo esta mayor en un 70.11% respecto a la de SL, que fue de $3.78 \text{ mg} \cdot \text{g}_{\text{aceite}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (Figura 32); estos resultados mostraron que el pretratamiento con el biosurfactante tuvo un efecto positivo en la utilización y mineralización del crudo, aumentó su biodisponibilidad, mejoró el proceso de biodegradación en CL y promovió que la velocidad máxima de producción de CO₂ se alcanzara en menor tiempo. Las diferencias observadas en la producción de CO₂ de SL y CL y sus velocidades máximas de producción fueron atribuidas al pretratamiento con el biosurfactante.

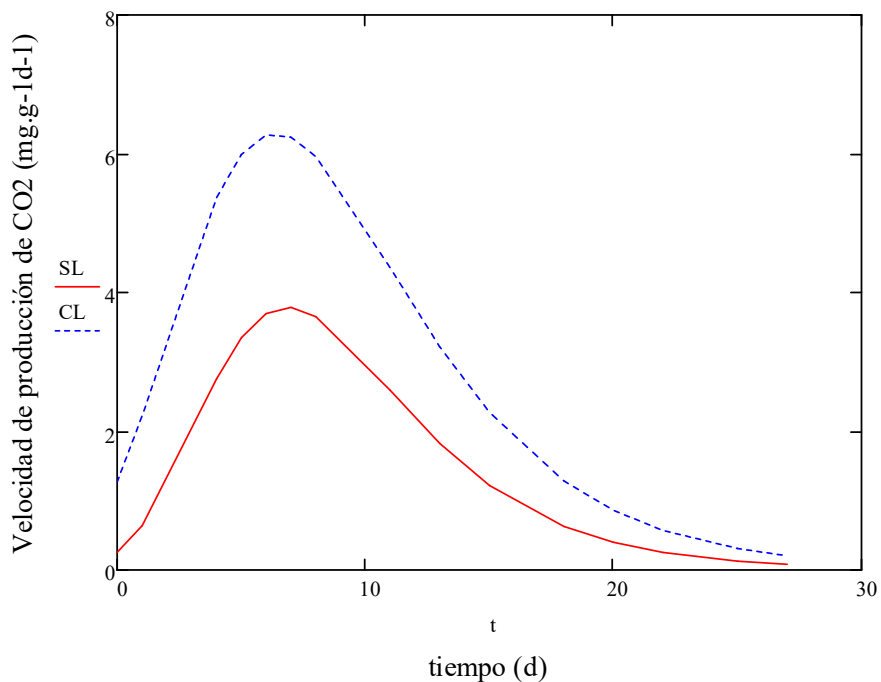


Figura 32. Velocidades de producción de CO₂ en los tratamientos de biodegradación de crudo pesado impregnado en arena de caliza. CL, con biosurfactante y SL, sin biosurfactante.

Existen diferencias significativas entre las velocidades de producción de CO₂ SL y CL ($p < 0.05$), debidas básicamente al tratamiento con el BS. Estos resultados confirman que el BS aumentaría la biodisponibilidad de los componentes del crudo (Borah y Yadav, 2017).

5.6.2 BIODEGRADACIÓN DE LAS DIFERENTES FRACCIONES DEL CRUDO POR MEDIACIÓN DEL BIOSURFACTANTE

La biodegradación de un crudo está relacionado directamente con su peso, expresado en grados API, su composición y la concentración de cada una de las fracciones que lo componen (Pi *et al.*, 2017). Debido al elevado contenido de resinas y asfaltenos, la biodegradación de un aceite como el empleado en este trabajo resulta difícil dado que estas fracciones contienen compuestos viscosos de alto peso molecular, entre ellos policíclicos con sustituciones de grupos alquilo, lo que contribuye a su resistencia a la biodegradación (Varjani, 2017; Sharma y Padey, 2020). Para conocer las fracciones del crudo que fueron

degradadas en presencia del biosurfactante, se realizó el análisis SARA de los aceites residuales de los tratamientos.

El análisis SARA de los aceites recuperados mostró que el tratamiento con biosurfactante CL, tuvo mayor degradación de compuestos saturados, aromáticos y resinas. El tratamiento con biosurfactante disminuyó el contenido de compuestos saturados en un 17.66% respecto al contenido inicial, mientras que SL, sin biosurfactante, lo hizo en un 11.08%; las fracciones de aromáticos y resinas prácticamente no fueron disminuidas por SL, mientras que CL las redujo en un 12.54% y 2.62% respectivamente. La reducción total de fracciones SARA fue de 32.83% en los tratamientos con biosurfactante CL y de 11.08 % en los tratamientos sin el biosurfactante SL, Tabla 24.

Tabla 24. Biodegradación de las diferentes fracciones del crudo de acuerdo con el análisis SARA

Fracción	Contenido inicial g por 100g _{crudo}	Degradación %	
		CL Tratamiento con biosurfactante	SL Tratamiento sin biosurfactante
Saturados	16	17.66	11.08
Aromáticos	31	12.54	0
Resinas	36	2.62	0

El género *Rhodococcus* ha recibido atención en los últimos años debido a su capacidad de degradar una amplia variedad de contaminantes, entre ellos hidrocarburos alifáticos de cadena media y larga, aromáticos y poliaromáticos (Pi *et al.*, 2017); este género se caracteriza por poseer el gen alcanohidroxilasa (alkB), involucrado en la oxidación de los compuestos citados (Hamzah *et al.*, 2013). Dada la naturaleza y características del aceite empleado en este trabajo, se observó que la acción metabólica del *Rhodococcus* no fue suficiente por sí sola para hacer biodisponible las fracciones de aromáticos y resinas, por lo que la disminución de éstas en el tratamiento CL, se atribuyó a la acción del biosurfactante el cual libero el aceite. La adición del BS exógeno producido por la cepa de *B. subtilis* promovió la utilización de las fracciones mencionadas.

Estos resultados también fueron corroborados por cromatografía de gases en los aceites residuales (Figura 33), se observó que el tratamiento con CL no presentó las señales entre C_6 y C_{15} , mientras que en el intervalo de C_{16} a C_{24} la intensidad de las señales fue menor que en el cromatograma de SL.

La Figura 34 muestra la distribución de hidrocarburos (por ciento en masa de destilación) del control y los tratamientos. Se detectó una redistribución de hidrocarburos en las diferentes fracciones analizadas. La biodegradación provocó una disminución en las fracciones $<C_{20}$, lo que demostró que el microorganismo fue capaz de degradar diferentes tipos de hidrocarburos, pero preferentemente utilizando las fracciones ligera y media. El sistema con biosurfactante mostró una degradación notablemente mayor en las fracciones $C_7 - C_{20}$. Al menos el 67% de las fracciones $> C_{20}$ se degradaron en los sistemas CL, mientras que en los sistemas sin biosurfactante solo se eliminó el 37% de la misma fracción. El aumento de la fracción de C_6 en los sistemas con biosurfactante se atribuye a la biodegradación de fragmentos más pesados, como alcanos pesados, aromáticos y resinas. Estas modificaciones, a su vez, pueden provocar cambios en la viscosidad del aceite. Estudios de degradación de aceites encontraron que los n-alcanos son la fracción más susceptible a la biodegradación, seguida de la fracción aromática, mientras que las fracciones de alquenos ramificados, cicloalquenos y poliaromáticos son las más resistentes, presentando bajas tasas de degradación (Head *et al.*, 2010; Sharma y Padey, 2020). Los resultados encontrados en este trabajo muestran que la biodegradación fue favorecida por la presencia del biosurfactante incluso en fracciones complejas.

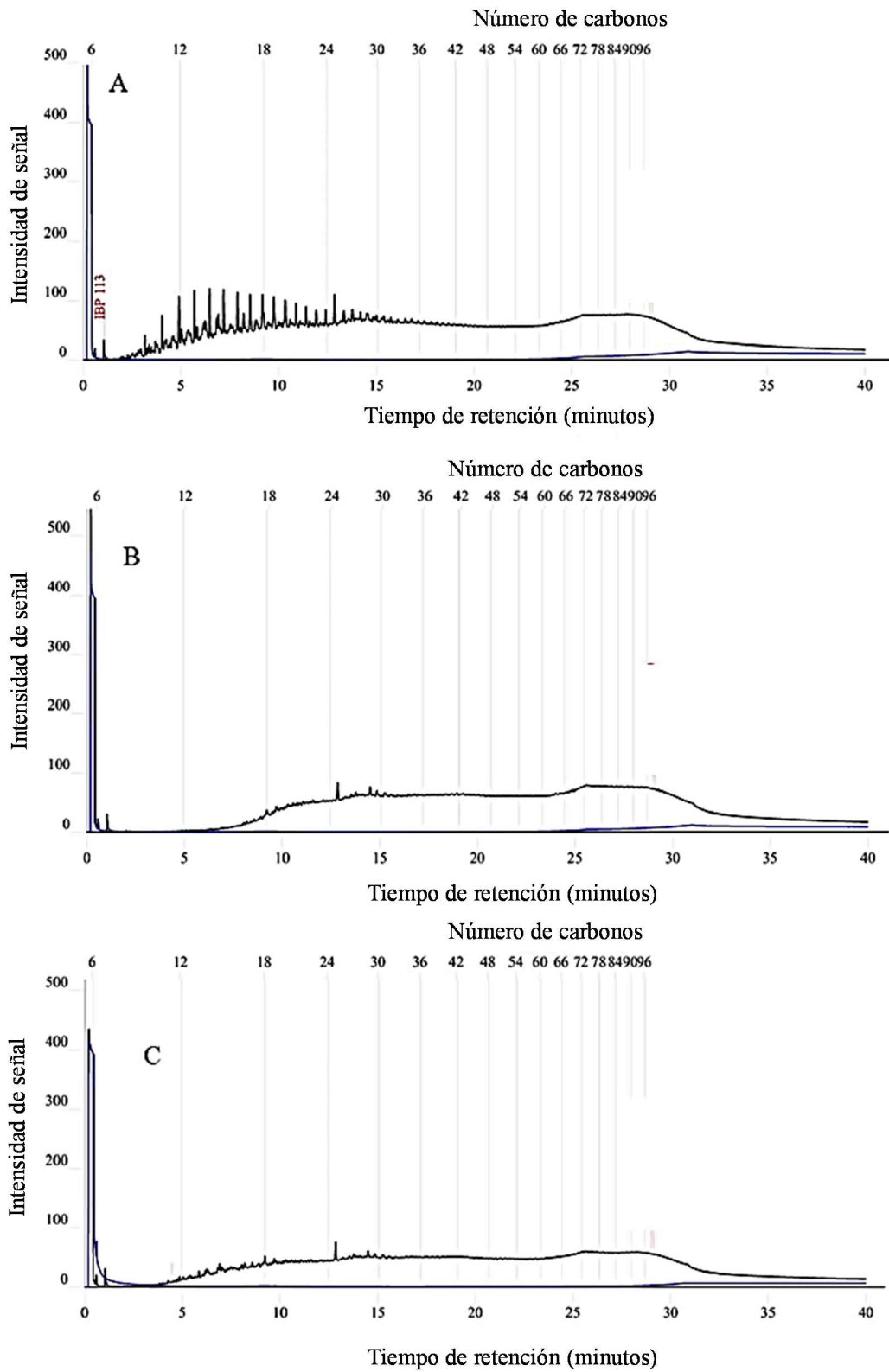


Figura 33. Cromatografía de gases que muestra la distribución de carbonos A) crudo B) aceite residual del tratamiento CL y C) aceite residual del tratamiento SL

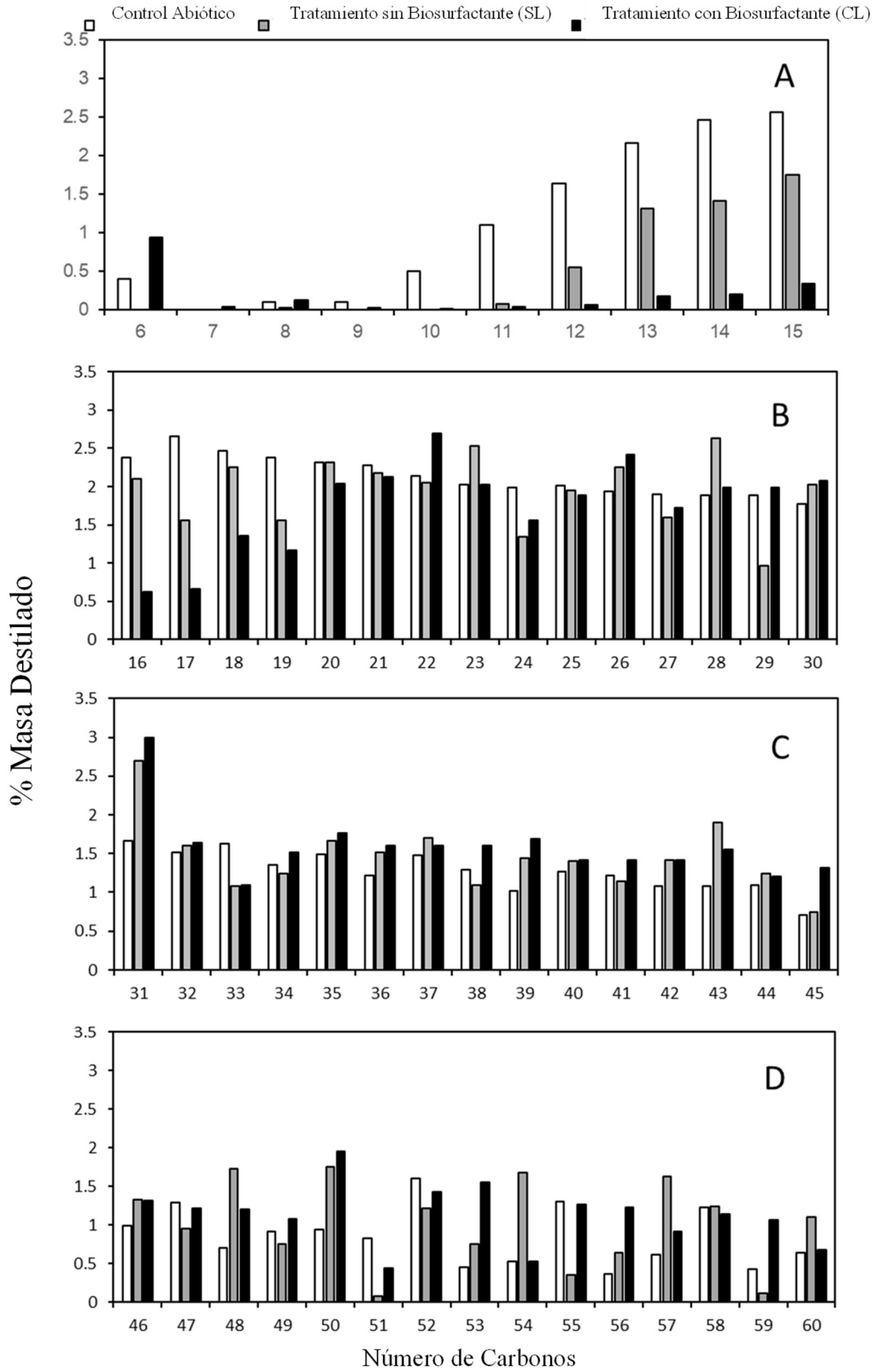


Figura 34. Distribución de compuesto carbonados de los aceites residuales del control y los tratamientos [A] C₆-C₁₅, [B] C₁₆-C₃₀, [C] C₃₁-C₄₅ y [D] C₄₆-C₆₀

El género *Rhodococcus* está reportado como un microorganismo degradador de compuestos alifáticos y monoaromáticos (Varjani, 2017). Las cepas de este género tienen la capacidad de metabolizar diferentes hidrocarburos, incluidos los aromáticos (Kumar *et al.*, 2020). Sin embargo, en el presente estudio, el análisis SARA de los sistemas SL no detectó degradación en las fracciones aromáticas, mientras que en CL la reducción de esta fracción fue del 12.54%, por lo que la biodegradación de dicha fracción está directamente relacionada a la acción del biosurfactante al incrementar la movilidad del aceite. Los diferentes grados de degradación de los compuestos saturados, aromáticos y resinosos indicaron que el pretratamiento con biosurfactante modificó la biodisponibilidad y por tanto facilitó su biodegradación.

Parthipan *et al.* (2017), reportaron la biodegradación de un crudo por *B. subtilis* A1 y encontraron que los compuestos de bajo peso molecular, C₁₀ a C₁₄, fueron completamente degradados, mientras los compuestos entre C₁₅ y C₁₉ lo fueron en un 97%, con tiempos de siete días para una eficiencia de remoción del 87% del total de hidrocarburos presentes. En este sentido, es difícil realizar una comparación con los resultados de este trabajo debido a que los autores no indicaron el tipo de crudo, no obstante, los resultados del reporte citado si permiten estimar en que intervalo podríamos esperar la biodegradación en los sistemas sin biosurfactante y, por tanto, poder atribuir la biodegradación de las fracciones > C₂₀ al pretratamiento con la espuma, en los sistemas CL.

Otros estudios han demostrado que los alcanos en el intervalo C₁₄ – C₂₀ son fácilmente utilizados como fuente de carbono y energía por la mayoría de las bacterias degradadoras de hidrocarburos (Das y Mukherjee, 2007). En este trabajo, en los sistemas SL sin el biosurfactante, se observó degradación de las fracciones < C₂₀ concordando con lo reportado. La mayor degradación de esta fracción en los tratamientos CL y de las fracciones > C₂₀ fue atribuible a la acción del biosurfactante.

Sajna *et al.* (2015), utilizaron el biosurfactante producido por *Pseudozyma sp.* En la biodegradación mejorada de un crudo usando *Pseudomonas putida* y obtuvieron una mejora del 46% en la degradación de compuestos entre C₁₀-C₂₄. Los sofrolípidos producidos por

Candida bombicola, son capaces de reducir en un 80% y 72% respectivamente, el contenido de compuestos saturados y aromáticos de un crudo ligero en un periodo de 8 semanas (Kang *et al.*, 2010). En este trabajo, los tiempos de reducción fueron de 4 semanas empleando un crudo pesado altamente viscoso.

5.6.3 DIFERENCIAS EN LA FORMA DE CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO

Se observó que durante los cuatro primeros días de incubación en los sistemas SL sin biosurfactante, el microorganismo *Rhodococcus sp.* Creció en suspensión formando flóculos, mientras que en los sistemas con el biosurfactante CL, el microorganismo creció adherido al crudo, como lo demostró la presencia de agregados de biomasa en contacto directo con éste (Figura 35). Asimismo, la coloración de los agregados fue blanca en CL mientras que los flóculos en SL mostraron el característico color naranja del género *Rhodococcus*.

El crecimiento celular sobre los aceites es un mecanismo de toma de nutrientes por parte de algunos microorganismos biodegradadores (Kapellos, 2017). Este tipo de crecimiento ocurre cuando por acción de biosurfactantes, forma una interfase sobre la superficie de los aceites; la formación de dicha interfase es un modo de acción de los biosurfactantes cuando los hidrocarburos, por sus propiedades físicas y reológicas, no pueden ser solubilizados o emulsionados. La presencia de esta interfase favorece la adhesión de los microorganismos y su crecimiento sobre el aceite. En esta forma de crecimiento la toma de nutrientes del crudo está supeditada a la difusión desde el aceite a la superficie celular. Teóricamente, este mecanismo de toma de nutrientes ocurre a menores velocidades en comparación con el crecimiento en suspensión, en el que la toma de nutrientes se ve favorecida por la agitación, la que aumenta la frecuencia de colisión entre nutrientes y células, cuando los primeros se encuentran solubles y las células suspendidas (Hua y Wang, 2012; Kapellos, 2017).

Cuando el aceite empleado se encuentra en forma insoluble, como el caso del crudo empleado en este trabajo la toma de nutrientes se ve limitada hasta que el *Rhodococcus sp.* Sintetiza su

propio biosurfactante asociado a la membrana celular. La adición del biosurfactante externo favoreció la adhesión del *Rhodococcus sp.* A la superficie del aceite, debido a la formación de la interfase citada. Esto explicaría en parte, porqué la velocidad de producción de CO₂ es mayor en el tratamiento CL.

Una vez que el microorganismo en los tratamientos con biosurfactante CL se implantó sobre el aceite, la interfase citada ayudó a aumentar las tasas de transporte transmembranal aumentando la velocidad de biodegradación y por tanto de producción de CO₂. El contacto inicial entre el microorganismo y la superficie del aceite es de suma importancia ya que se considera que dispara la expresión de funciones celulares que facilitan la toma de nutrientes (Van Hamme *et al.*, 2003). El ataque microbiano a esta interfase como estrategia de consumo de nutrientes a partir de hidrocarburos poco o no solubles, ha sido reportado anteriormente (Kapellos, 2017). El crecimiento del *Rhodococcus* sobre el crudo, su rápida adherencia a este en el tratamiento CL y la mayor velocidad máxima de producción de CO₂, habrían estado relacionados a la formación de esta interfase.

La adhesión a la superficie del aceite como promotora del crecimiento y biodegradación fue reportada también por Rahsepar *et al.* (2017), en dicho informe se trabajó con *Rhodococcus qinshengii* y se observó que cuando se inhibía la adherencia del microorganismo al aceite con el compuesto CorexitEC9500A, se inhibía también la biodegradación del crudo empleado. El primer paso en la biodegradación de hidrocarburos involucra a una oxigenasa ligada a la membrana celular, por lo que el contacto directo con estos sustratos es de esencial importancia (Ron y Rosenberg, 2002).

Las diferencias en la coloración blanca de los agregados creciendo sobre el crudo en CL y la coloración naranja en SL (Figura 35), sugiere que la forma de crecimiento (en suspensión o adherido sobre el aceite) tuvo un efecto sobre la fisiología del microorganismo. Asimismo, las diferencias observadas en las producciones netas de CO₂, las velocidades de producción de CO₂ y las diferencias respecto a la fisiología de crecimiento, sugieren una correlación entre estas, debido al pretratamiento con el biosurfactante.



Figura 35. Crecimiento celular en los tratamientos de biorremediación. SL tratamiento sin biosurfactante. CL tratamiento con biosurfactante.

5.6.4 CAMBIOS DE MOJABILIDAD EN LOS TRATAMIENTOS DE BIODEGRADACIÓN

El ángulo de contacto del aceite sobre rocas de los tratamientos SL y CL fue determinado después de una semana de incubación y este fue de 42.50° y 26.54° respectivamente (Tabla 25); en ambos tratamientos se observó un cambio de mojable al aceite a mojable al agua, sin embargo, el cambio en CL fue más drástico, lo que podría representar otro factor que habría jugado un papel importante en los resultados obtenidos. El control tuvo un cambio de mojabilidad de preferente al aceite a preferente al agua; el control no contaba con otra fuente de carbono y energía, solo el aceite impregnado en la roca, por lo que, para utilizarlo, el microorganismo tuvo que producir biosurfactante asociado a la membrana celular a fin de poder adherirse y metabolizar el aceite impregnado. Esto explicaría porqué el cambio en el ángulo es menor en el mismo periodo de incubación. El aspecto de las rocas después del tratamiento de biodegradación se muestra en la Figura 36.

Tabla 25. Ángulos de contacto en rocas impregnadas con el aceite y después sometidas al proceso de biodegradación. La determinación se realizó a los siete días de cultivo

Roca	Tratamiento	Ángulo de contacto (°)		
		Inicial	Después de 7 días de incubación	TS (mN·m ⁻¹)
1	SL, sin biosurfactante	118.30	42.50	64.077
2	CL con biosurfactante	117.09	26.54	58.540
3	Control	113.93	74.66	64.109

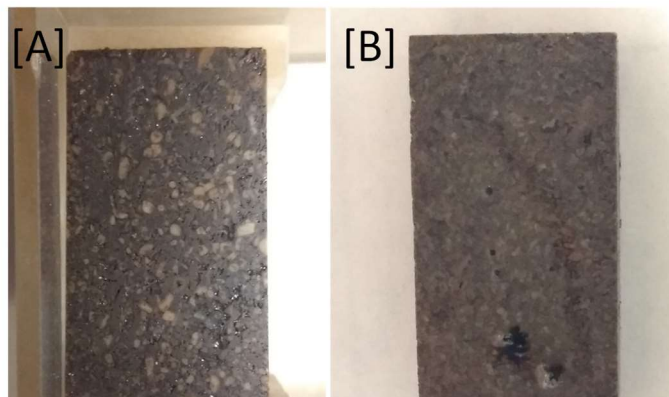


Figura 36. Aspecto de las rocas sometidas al proceso de biodegradación después de siete días de incubación. [A] Roca del tratamiento sin biosurfactante SL y [B] roca del tratamiento con biosurfactante CL

La adición de biosurfactantes exógenos en concentraciones por encima de su CMC ha sido reportada como benéfica en la biodegradación de aceites, no obstante también se ha reportado que en el caso de microorganismos hidrofóbicos como lo es el género *Rhodococcus*, el uso de surfactantes exógenos es detrimental, debido a que la adición de estos modifica la hidrofobicidad de la superficie de los aceites (Kapellos, 2017). En la investigación desarrollada por Pi *et al.* (2017), se evidenció este efecto negativo usando aceites crudos y *Rhodococcus sp.* como microorganismo biodegradador. Este efecto también fue reportado por Hua y Wang (2012) y Rahsepar *et al.* (2016), quienes proponen que además de una dilución inicial de compuestos aromáticos tóxicos, el impedimento de la adhesión del microorganismo a la superficie del aceite jugó un papel muy importante en la baja biodegradación de este. Estos resultados contrastan con los reportados en este trabajo, esto podría deberse a que en los reportes citados se usaron surfactantes químicos (Corexit y Triton-X) y por otro lado el efecto referido se obtuvo cuando se mezcló el surfactante con el medio de crecimiento. En este trabajo el biosurfactante de *B. subtilis* fue retirado antes de agregar el medio de cultivo e inocular el tratamiento CL.

Estos resultados demostraron que la adición del biosurfactante exógeno producido por *B. subtilis* probó ser benéfico para la cepa de *Rhodococcus sp.*, esto representa una ventaja sobre los surfactantes y dispersantes comerciales actualmente en uso, demostrando la factibilidad de emplearlo en derrames de crudos y recuperación de suelos contaminados empleando microorganismos hidrofóbicos.

5.6.5 MECANISMOS DE ACCIÓN DEL BIOSURFACTANTE

Los mecanismos básicos de acción de los biosurfactantes son disminución de la TIF y cambio de mojabilidad, ambos evidenciados durante los ensayos de liberación y de AC. Ferradji et al (2014) y Parthipan *et al.* (2017), propusieron que los residuos catiónicos del biosurfactante atraen los compuestos de la membrana celular cargados negativamente, mientras la porción hidrofóbica en contacto con el crudo permearía la membrana permitiendo el paso de los componentes hidrocarbonados. Otro mecanismo aceptado, es el incremento en el área de contacto microorganismo-sustrato (Parthipan *et al.*, 2017).

Los BS además de disminuir la TIF, promueven la formación de una interfase biosurfactante-agua en la superficie de aceites (Kapellos, 2017). El crecimiento del microorganismo sobre el crudo y su rápida adherencia a este en el tratamiento CL facilitó la adhesión al crudo y promovió que la transferencia de materia se diera alrededor de dicha interfase, donde ocurrió a mayores velocidades traduciéndose en una mayor velocidad de producción de CO₂ y dado que el metabolismo intracelular ocurre a las mismas velocidades (Kapellos, 2017), lo que se vio mejorado fue el transporte transmembranal. En este trabajo, el microorganismo *Rhodococcus sp.* pudo aprovechar el BS en la superficie del crudo para adherirse y degradarlo.

El BS fue capaz de movilizar el crudo, pero no de formar emulsiones con este, por lo que durante el proceso de pretratamiento el crudo no se comportó como una fase dispersa dada su alta viscosidad, impidiendo los fenómenos de emulsificación y de pseudo-solubilización, que son otros dos de los mecanismos de acción de los biosurfactantes y que son aprovechado por los microorganismos. La pseudo-solubilización consiste en la incorporación de aceite al interior de las micelas formadas cuando se trabaja por encima de la CMC (Santos *et al.*,

2017). En este caso, el BS empleado tenía una ST de $27 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, asegurando concentraciones mayores a la CMC, no obstante, este fenómeno no ocurrió por las propiedades del crudo y su extremadamente baja solubilidad. Para los microorganismos que crecen en suspensión tomando componentes del petróleo pseudo-solubilizados o disueltos, es de crucial importancia la síntesis de BS, lo que redundaría en una disminución de las TS y TIF del medio de cultivo.

El AC de rocas sometidas al mismo proceso biológico que SL y CL fue de 42.50 y 26.54° respectivamente, mostrando que, aunque ambos tratamientos cambiaron la mojabilidad, el tratamiento con biosurfactante (CL) disminuyó en mayor medida este parámetro. Al tener una superficie mojabla al agua (hidrofilica) y un microorganismo hidrofóbico, se podría esperar que el proceso de adhesión del microorganismo no se llevara a cabo, sin embargo, la creación de la interfase biosurfactante-aceite fue clave para que esta se llevara a cabo. Los resultados encontrados durante los ensayos de biodegradación mostraron que la mayor disminución del AC del tratamiento CL, se correspondió con una mayor producción acumulada de CO_2 y la mayor velocidad de producción de este gas. Esto indicó que un cambio más rápido en la mojabilidad conlleva a mayores tasas de biodegradación.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman la hipótesis de que el biosurfactante producido a partir de *B. subtilis* aumenta la biodisponibilidad de los componentes del crudo, por efecto combinado de los mecanismos de disminución de la TIF, disminución de la TS y cambio de mojabilidad.

5.7 REFERENCIAS DEL CAPÍTULO

- Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M., y Hassouna, N. A.-H. (2008). Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150(3), 305-325. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8155-x>
- Abioye, O. P., Agamuthu, P., y Abdul Aziz, A. R. (2012). Biodegradation of Used Motor Oil in Soil Using Organic Waste Amendments. *Biotechnology Research International*, 2012, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2012/587041>
- Al-Bahry, S. N., Al-Wahaibi, Y. M., Elshafie, A. E., Al-Bemani, A. S., Joshi, S. J., Al-Makhmari, H. S., y Al-Sulaimani, H. S. (2013). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. *International Biodeterioration y Biodegradation*, 81, 141-146. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.006>
- Al-Sulaimani, H., Al-Wahaibi, Y., Al-Bahry, S., Elshafie, A., Al-Bemani, A., Joshi, S., y Zargari, S. (2011). Optimization and Partial Characterization of Biosurfactants Produced by *Bacillus* Species and Their Potential for Ex-Situ Enhanced Oil Recovery. *SPE Journal*, 16(03), 672-682. <https://doi.org/10.2118/129228-PA>
- Al-Wahaibi, Y., Joshi, S., Al-Bahry, S., Elshafie, A., Al-Bemani, A., y Shibulal, B. (2014). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 324-333. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.022>
- Aoshima, H., Hirase, T., Tada, T., Ichimura, N., Yamaguchi, H., Taguchi, M., y Myoenzono, T. (2006). Improvement of Heavy Oil Degradation by *Rhodococcus erythropolis* C2. *Journal of Environmental Biotechnology*, (5) 2, 107-109.
- Ariza, Y., y Sánchez, MSc., L. (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 10(18), 149. <https://doi.org/10.22490/24629448.1003> ck en este cap.
- Biria, D., Maghsoudi, E., Roostaazad, R., Dadafarin, H., Sahebghadam Lotfi, A., y Amoozegar, M. A. (2010). Purification and characterization of a novel biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* MS3. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(5), 871-878. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0246-5>
- Borah, D., y Yadav, R. N. S. (2017). Bioremediation of petroleum based contaminants with biosurfactant produced by a newly isolated petroleum oil degrading bacterial strain. *Egyptian Journal of Petroleum*, 26(1), 181-188. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2016.02.005>
- Bouassida, M., Ghazala, I., Ellouze-Chaabouni, S., y Ghribi, D. (2018a). Improved Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* SPB1 Mutant Obtained by Random Mutagenesis and Its Application in Enhanced Oil Recovery in a Sand System. *Journal of microbiology and biotechnology*, 28(1), 95-104.
- Bouassida, M., Ghazala, I., Ellouze-Chaabouni, S., y Ghribi, D. (2018b). Improved Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* SPB1 Mutant Obtained by Random Mutagenesis and Its Application in Enhanced Oil Recovery in a Sand System. *Journal of microbiology and biotechnology*, 28(1), 95-104.
- Bravo-Linares, C., Ovando-Fuentealba, L., Mudge, S. M., y Loyola-Sepulveda, R. (2013). Application of response surface methodology to oil spill remediation. *Fuel*, 103, 876-883. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.09.034>
- Castorena-Cortés, G., Roldán-Carrillo, T., Zapata-Peñasco, I., Reyes-Avila, J., Quej-Aké, L., Marín-Cruz, J., y Olguín-Lora, P. (2009a). Microcosm assays and Taguchi experimental design for treatment of oil sludge containing high concentration of hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 100(23), 5671-5677. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.050>

Cayre, M., Vignolo, G., y Garro, O. (2001). Validación y comparación de modelos de crecimiento microbiano. Universidad Nacional Del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Argentina. https://www.researchgate.net/profile/Oscar_Garro/publication/228846660_Validacin_y_comparacin_de_modelos_de_crecimiento_microbiano/links/004635275c9eb2f83f000000.pdf

Das, K., y Mukherjee, A. K. (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 98(7), 1339-1345. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.032>

Deng, M.-C., Li, J., Hong, Y.-H., Xu, X.-M., Chen, W.-X., Yuan, J.-P., Peng, J., Yi, M., y Wang, J.-H. (2016). Characterization of a novel biosurfactant produced by marine hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01. *Journal of Applied Microbiology*, 120(4), 889-899. <https://doi.org/10.1111/jam.13065>

Fernandes, P. L., Rodrigues, E. M., Paiva, F. R., Ayupe, B. A. L., McInerney, M. J., y Tótola, M. R. (2016). Biosurfactant, solvents and polymer production by *Bacillus subtilis* R14914 and their application for enhanced oil recovery. *Fuel*, 180, 551-557. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.04.080> ck en este capítulo

Ghribi, D., y Ellouze-Chaabouni, S. (2011). Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. *Biotechnology Research International*, 2011, 1-6. <https://doi.org/10.4061/2011/653654>

Hamzah, A., Phan, C.-W., Abu Bakar, N. F., y Wong, K.-K. (2013). Biodegradation of Crude Oil by Constructed Bacterial Consortia and the Constituent Single Bacteria Isolated From Malaysia. *Bioremediation Journal*, 17(1), 1-10. <https://doi.org/10.1080/10889868.2012.731447>

Hua, F., y Wang, H. (2012). Uptake modes of octadecane by *Pseudomonas* sp. DG17 and synthesis of biosurfactant: Uptake modes of octadecane by *Pseudomonas* sp. DG17. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), 25-37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05178.x>

Philp, J. C., Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B., Dunbar, S. A., Christofi, N., Lang, S., Wray, V. (2002) Alkanotrophic *Rhodococcus ruber* as a biosurfactant producer. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 59(2-3), 318-24. doi: 10.1007/s00253-002-1018-4.

José de Andrade, C., y Maria Pastore, G. (2016). Comparative study on microbial enhanced oil recovery using mannosylerythritol lipids and surfactin. *International Journal of Scientific World*, 4(2), 69. <https://doi.org/10.14419/ijsw.v4i2.6846>

Kang, S.-W., Kim, Y.-B., Shin, J.-D., y Kim, E.-K. (2010). Enhanced Biodegradation of Hydrocarbons in Soil by Microbial Biosurfactant, Sphorolipid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(3), 780-790. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8580-5>

Kapellos, G. E. (2017). Microbial Strategies for Oil Biodegradation. En *Modeling of Microscale Transport in Biological Processes* (pp. 19-39). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804595-4.00002-X>

Karnanda, W., Benzagouta, M. S., AlQuraishi, A., y Amro, M. M. (2013). Effect of temperature, pressure, salinity, and surfactant concentration on IFT for surfactant flooding optimization. *Arabian Journal of Geosciences*, 6(9), 3535-3544. <https://doi.org/10.1007/s12517-012-0605-7>

Karimi, M., Al-Maamari, R. S., Ayatollahi, S., y Mehranbod, N. (2016). Impact of sulfate ions on wettability alteration of oil-wet calcite in the absence and presence of cationic surfactant. *Energy & Fuels*, 30(2), 819-829.

Kluge, B., Vater, J., Salnikow, J., y Eckart, K. (1988). Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *FEBS Letters*, 231(1), 107-110. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80712-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80712-9)

- Makkar, R. S., Cameotra, S. S., y Banat, I. M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, 1(1), 5. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-5>
- Parthipan, P., Preetham, E., Machuca, L. L., Rahman, P. K. S. M., Murugan, K., y Rajasekar, A. (2017). Biosurfactant and Degradative Enzymes Mediated Crude Oil Degradation by Bacterium *Bacillus subtilis* A1. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00193>
- Pereira, J. F. B., Gudiña, E. J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J. A., Coutinho, J. A. P., y Rodrigues, L. R. (2013a). Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*, 111, 259-268. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.040>
- Pereira, J. F. B., Gudiña, E. J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J. A., Coutinho, J. A. P., y Rodrigues, L. R. (2013b). Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*, 111, 259-268. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.040>
- Pi, Y., Chen, B., Bao, M., Fan, F., Cai, Q., Ze, L., y Zhang, B. (2017a). Microbial degradation of four crude oil by biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp. *Bioresource Technology*, 232, 263-269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.007> ck en este capítulo
- Pi, Y., Chen, B., Bao, M., Fan, F., Cai, Q., Ze, L., y Zhang, B. (2017b). Microbial degradation of four crude oil by biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp. *Bioresource Technology*, 232, 263-269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.007>
- Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., y Banat, I. M. (2003). Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology*, 90(2), 159-168. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00114-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00114-7)
- Rahsepar, S., Langenhoff, A. A. M., Smit, M. P. J., van Eenennaam, J. S., Murk, A. J., y Rijnaarts, H. H. M. (2017). Oil biodegradation: Interactions of artificial marine snow, clay particles, oil and Corexit. *Marine Pollution Bulletin*, 125(1-2), 186-191. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.021>
- Rahsepar, S., Smit, M. P. J., Murk, A. J., Rijnaarts, H. H. M., y Langenhoff, A. A. M. (2016). Chemical dispersants: Oil biodegradation friend or foe? *Marine Pollution Bulletin*, 108(1-2), 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.044>
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 249-252. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00316-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00316-6)
- Sajna, K. V., Sukumaran, R. K., Gottumukkala, L. D., y Pandey, A. (2015). Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 or its culture broth. *Bioresource Technology*, 191, 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.126>
- Santos, D. K., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., y Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 401. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>
- Seydlová, G., Fišer, R., Čabala, R., Kozlík, P., Svobodová, J., y Pátek, M. (2013). Surfactin production enhances the level of cardiolipin in the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828(11), 2370-2378. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.032>
- Shao, C., Liu, L., Gang, H., Yang, S., y Mu, B. (2015). Structural Diversity of the Microbial Surfactin Derivatives from Selective Esterification Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 1855-1872. <https://doi.org/10.3390/ijms16011855>
- Sousa, M., Dantas, I. T., Feitosa, F. X., Alencar, A. E. V., Soares, S. A., Melo, V. M. M., Gonçalves, L. R. B., y Sant'ana, H. B. (2014a). Performance of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LAMI005 on the

formation of oil / biosurfactant / water emulsion: Study of the phase behaviour of emulsified systems. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 31(3), 613-623. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20140313s00002766>

Sousa, M., Dantas, I. T., Feitosa, F. X., Alencar, A. E. V., Soares, S. A., Melo, V. M. M., Gonçalves, L. R. B., y Sant'ana, H. B. (2014b). Performance of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LAMI005 on the formation of oil / biosurfactant / water emulsion: Study of the phase behaviour of emulsified systems. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 31(3), 613-623. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20140313s00002766>

Strand, S., Høgenesen, E. J., y Austad, T. (2006). Wettability alteration of carbonates—Effects of potential determining ions (Ca^{2+} and SO_4^{2-}) and temperature. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 275(1–3), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2005.10.061>

Udoh, T., y Vinogradov, J. (2019). Experimental Investigations of Behaviour of Biosurfactants in Brine Solutions Relevant to Hydrocarbon Reservoirs. Colloids and Interfaces, 3(1), 24. <https://doi.org/10.3390/colloids3010024> ck en este capítulo

Van Hamme, J. D., Singh, A., y Ward, O. P. (2003). Recent Advances in Petroleum Microbiology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67(4), 503-549. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.503-549.2003>

Varadavenkatesan, T., y Murty, V. R. (2013). Production of a Lipopeptide Biosurfactant by a Novel *Bacillus* sp. And Its Applicability to Enhanced Oil Recovery. ISRN Microbiology, 2013, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2013/621519> ck en este capítulo

Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. Bioresource Technology, 223, 277-286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>

Vaz, D. A., Gudiña, E. J., Alameda, E. J., Teixeira, J. A., y Rodrigues, L. R. (2012). Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 89, 167-174. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.009>

Wallin, C. E., DiPietro, M. B., Schwarz, R. W., y Bamforth, C. W. (2010). A comparison of three methods for the assessment of foam stability of beer. Journal of the Institute of Brewing, 116(1), 78-80.

Zhang, P., y Austad, T. (2006). Wettability and oil recovery from carbonates: Effects of temperature and potential determining ions. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 279(1–3), 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.01.009>

Zhao, X., Zhou, Z., y Han, Y. (2017). Antifungal Effects of Lipopeptide Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BH072. Advances in Bioscience and Biotechnology, 8, 295–310. <https://doi.org/10.4236/abb.2017.89022>

6.CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

La producción del biosurfactante es resultado del metabolismo primario. La velocidad de aireación tiene un efecto sobre la velocidad de producción del biosurfactante y el rendimiento de este. Se demostró que las velocidades de aireación bajas promueven la producción de un biosurfactante con menores valores de concentración micelar crítica.

El análisis del biosurfactante obtenido reveló la presencia de grupos funcionales propios de un lipopéptido y resultó ser una mezcla de dos variantes de surfactina y de una iturina. El biosurfactante demostró estabilidad y conservación de sus propiedades tensoactivas en intervalos amplios de pH, temperatura y salinidad.

El biosurfactante probó tener la capacidad de liberar el crudo pesado impregnado en la arena de caliza como resultado de la disminución de la tensión superficial, de la tensión interfacial, así como de cambios en la mojabilidad del aceite sobre la arena de caliza. La actividad tensoactiva del biosurfactante fue dependiente de las condiciones ambientales, concretamente de la temperatura y de la salinidad, evidenciándose un efecto sinérgico entre estas.

El tratamiento biológico de la arena impregnada con altas concentraciones del crudo pesado fue mejorado en los sistemas con biosurfactante, como se demostró por las mayores tasas de producción de CO₂, debido a que el biosurfactante promovió la biodisponibilidad de las diferentes fracciones de hidrocarburos del aceite por acción de los mecanismos combinados de cambio de mojabilidad, disminución de la TIF y de la TS.

El pretratamiento con el biosurfactante mejoró la biodegradación de las fracciones de saturados, de resinas y de alifáticos, asimismo, promovió la biodegradación de compuestos carbonados de alto peso molecular al mismo tiempo que se obtuvo una redistribución de estos compuestos en los aceites residuales.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirmaron la hipótesis de que el biosurfactante aumenta la biodisponibilidad de las diferentes fracciones y compuestos carbonados presentes en el crudo, por acción de los mecanismos combinados de reducción de tensión superficial, reducción de tensión interfacial, cambios de mojabilidad y modificar la forma de crecimiento del microorganismo degradador, de hacerlo en suspensión a hacerlo sobre la superficie de la arena impregnada con el aceite.

Los resultados obtenidos demostraron la factibilidad del empleo futuro del biosurfactante en forma de espuma colapsada, en aplicaciones de recuperación de suelos contaminados con petróleo y sus derivados.

7.RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

- Identificar la especie de la cepa de *Rhodococcus* por amplificación por PCR de la porción 16s del gen ARNr. El conocer la especie del microorganismo biodegradador podría proporcionar información más concisa en cuanto a las fracciones de petróleo que es capaz de utilizar y realizar una revisión bibliográfica dirigida a la especie en particular.
- Aunque para las aplicaciones ambientales, quedó demostrado que el empleo del biosurfactante en forma de espuma colapsada es eficiente y se obtienen resultados satisfactorios, se recomienda incluir en trabajos posteriores metodologías para la identificación y confirmación de los compuestos que forman parte del biosurfactante. En los resultados reportados en este trabajo, las bandas del espectrograma FTIR indicaron la presencia de grupos funcionales propios de lipopéptidos, pero no brindaron información acerca de los compuestos presentes.
- En los experimentos de biodegradación se observaron diferencias en la forma de crecimiento del *Rhodococcus*. Resultaría interesante realizar experimentos confirmatorios acerca de este resultado y poder obtener mayor evidencia, ya que no se encontraron reportes en la bibliografía acerca de dichas diferencias. Se ha reportado que las cepas del género *Rhodococcus* producen ácido micólico y algunos otros compuestos asociados a la membrana celular, entre los que se encuentra un biosurfactante, lo que le confiere su típica coloración naranja. En este trabajo se observó que cuando el microorganismo crecía adherido al aceite, no se obtuvo la coloración mencionada, estudios venideros podrían enfocarse en dilucidar las razones. Es muy posible que debido a la temprana adherencia del *Rhodococcus* al aceite, por acción del biosurfactante, este no haya tenido la necesidad de producir el biosurfactante asociado a la membrana celular, necesario para la adherencia al aceite.

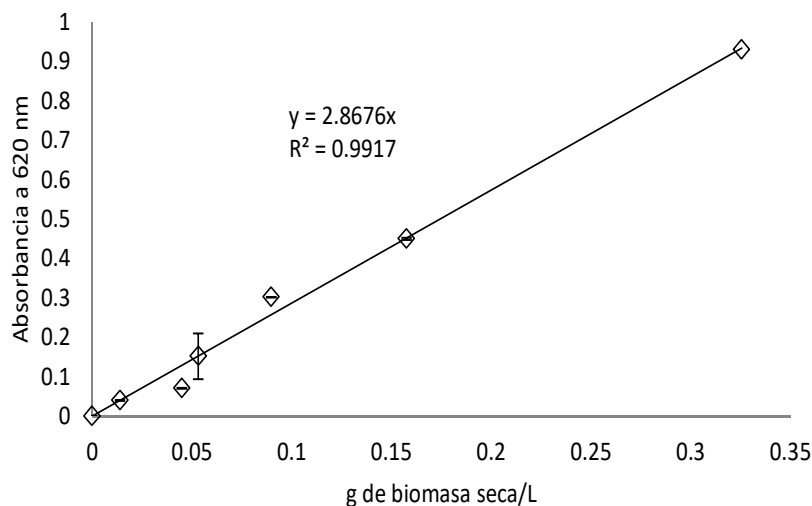
- Reportar los resultados de las cinéticas de producción del biosurfactante en términos de concentración de este respecto al tiempo, $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ vs t , ya que en este trabajo se infirió la producción del biosurfactante por la disminución de la TS respecto al tiempo. Los datos reportados en concentración dan más información acerca de los parámetros cinéticos de producción. La obtención de dichos parámetros podrá utilizarse para la modelación y simulación del proceso de producción, importantes para el escalamiento industrial.
- Los estudios de liberación y de biodegradación de aceite podrían ampliarse incluyendo otros tipos de crudo, de diferentes gravedades API y con diferentes composiciones iniciales. Asimismo, se pueden incluir otros factores ambientales.
- La arena utilizada en este estudio fue seleccionada debido a que la bibliografía revisada indica que en suelos arenosos la absorción de hidrocarburos es mayor que en suelos del tipo por ejemplo arcilloso, dificultando la degradación y remediación. Resultaría interesante ampliar el estudio de biodegradación del aceite impregnado en diferentes tipos de suelos.
- Estos estudios ampliados de biodegradación podrían llevarse a cabo en muestras reales de suelos de sitios contaminados con petróleo e hidrocarburos, como lo son aquellos cercanos a refinerías o pozos petroleros.
- Ampliar el estudio de liberación de aceite en medios consolidados, como la roca caliza en sí, para evaluar la influencia de las fuerzas capilares.
- Una aportación importante para aplicaciones ambientales, sería poder determinar qué cantidad de biomasa celular y de biosurfactante se requerirían para poder limpiar o recuperar una determinada cantidad de arena o suelo.

ANEXOS

I. CURVA TIPO DE BIOMASA

Se desarrolló un cultivo en medio líquido de la cepa de *Bacillus subtilis* y cuando éste alcanzó la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente 24 horas de incubación) se tomaron 10 mL y se determinó la densidad óptica a 620 nm (previamente se realizó un barrido en el espectro ultravioleta-visible). A partir de ésta alícuota, se desarrollaron diluciones y se determinaron sus densidades ópticas. Posteriormente, se filtraron a través de membranas de teflón de 0.45 micras de tamaño de corte que habían sido llevadas previamente a peso constante.

Las membranas con la biomasa retenida se incubaron a 50 °C durante 48 horas a fin de desecar ésta última. Al término de este periodo, se pesaron. Con estos datos, se construyó una curva de calibración y se le practicó una regresión lineal, la que arrojó un valor de conversión de 0.3487 g de biomasa seca/L por cada unidad de densidad óptica. Este valor es muy aproximado a los reportados por Gao *et al.* (2012), estos autores utilizaron una longitud de onda de 600 nm y medios de cultivo minerales suplementados con glucosa y otras fuentes de carbono diferentes a las empleadas en este estudio.



Curva tipo de biomasa. Las barras representan la desviación estándar

Gao, T., Wong, Y., Ng, & Ho, K. (2012) L-lactic acid production by *Bacillus subtilis* MUR1. *Bioresource Technology*, 121, 105-110. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.06.108

II. ALGORITMO PARA EL AJUSTE DE DATOS

$$t := \begin{pmatrix} 0 \\ 2 \\ 4 \\ 6 \\ 17 \\ 20 \\ 22 \\ 24 \\ 28 \\ 30 \\ 48 \end{pmatrix} \quad x := \begin{pmatrix} 0.005 \\ 0.005 \\ 0.004 \\ 0.002 \\ 0.213 \\ 0.279 \\ 0.392 \\ 0.398 \\ 0.476 \\ 0.506 \\ 0.532 \end{pmatrix}$$

Vectores que contienen los datos experimentales, en este caso t es el tiempo en horas y x la concentración de biomasa en g/L

$n := \text{length}(x) - 1 = 10$ Longitud del vector de ajuste de la variable dependiente (biomasa), es decir el número de datos que contendrá.

$j := 0..n$

$\max(x) = 0.532$
 $\min(x) = 2 \times 10^{-3}$ Valores máximo y mínimo de la trayectoria de ajuste, que serán los límites superior e inferior y que corresponden con la concentración máxima y mínima de la variable dependiente

$F(t, \alpha, \beta, \gamma) := \min(x) + \frac{\max(x) - \min(x)}{\left[1 + \alpha \cdot e^{-\beta \cdot (t - \gamma)}\right]^\alpha}$ Función de ajuste, que en este caso es la ecuación logística generalizada, t es la variable independiente. α , β y γ son parámetros de ajuste cuyos valores deseamos encontrar.

$SSE(\alpha, \beta, \gamma) := \sum_j (x_j - F(t_j, \alpha, \beta, \gamma))^2$ Sumatoria de errores al cuadrado entre la función de ajuste y los valores experimentales de la variable dependiente. Esta es la función objetivo, la que deseamos minimizar.

$\alpha := 0.1$ $\beta := .224$ $\gamma := 20$ Valores iniciales de los parámetros de la ecuación de ajuste.

Dado $SSE(\alpha, \beta, \gamma) = 0$ 1 = 1 2 = 2 Queremos que la sumatoria de errores al cuadrado sea lo más cercana a cero posible.

$\begin{pmatrix} \alpha \\ \beta \\ \gamma \end{pmatrix} := \text{Minerr}(x, \alpha, \beta, \gamma)$ Indicamos que el vector de salida que contendrá los parámetros de la función logística debe resultar de minimizar la sumatoria de errores al cuadrado

$$\alpha = 0.465$$

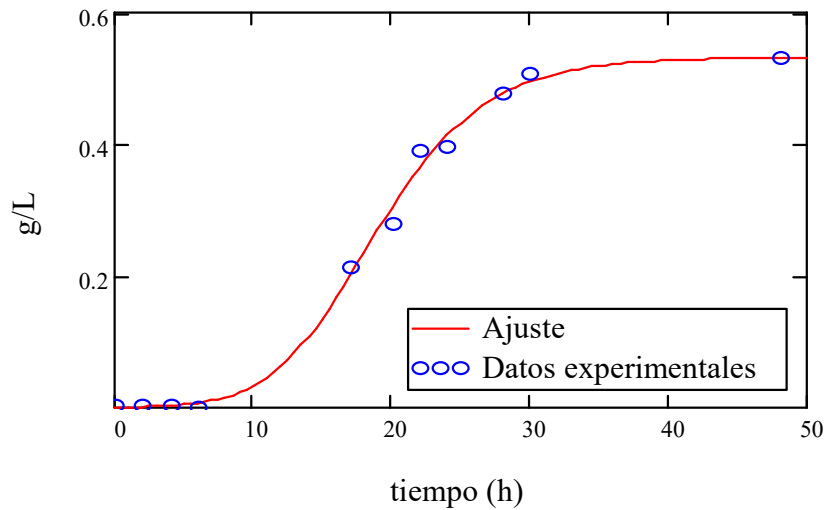
$$\beta = 0.218$$

$$\gamma = 17.96$$

Valores encontrados para los parámetros de la ecuación

Graficamos los valores experimentales junto a la trayectoria de ajuste

$z := 0, 0.5 .. 50$



Comprobamos la sumatoria de errores al cuadrado entre la función de ajuste y los datos experimentales

$$\frac{SSE(\alpha, \beta, \gamma)}{n - 2} = 2.412 \times 10^{-4}$$

Es bastante pequeña, por lo que podemos decir que el ajuste es bueno.

El ajuste de datos se realizó con el software matemático MathCad Prime versión 7.00.

III. CLASIFICACIÓN DE CRUDOS DE PETRÓLEO DE ACUERDO CON EL AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE

Los crudos se clasifican como ligeros, medios o pesados según su gravedad API, de acuerdo con la Tabla 26. Clasificación del crudo de petróleo según el American Petroleum Institute. La gravedad API no tiene unidades propiamente dicho, sin embargo, se ha adoptado la costumbre de expresarla como una graduación. De acuerdo con esta clasificación, el crudo empleado en este trabajo es uno del tipo pesado, ya que su gravedad API fue de 14.85°.

Tabla 26. Clasificación del crudo de petróleo según el American Petroleum Institute

Clasificación	Gravedad API	Densidad absoluta (kg·m ⁻³)
Crudo de petróleo ligero	mayor de 31.1°	menor de 870
Crudo medio o intermedio	entre 22.3° y 31.1°	de 870 a 920
Crudo pesado	entre 22,3° y 10°	de 920 a 1000
Crudo extrapesado	API menor de 10,0°	más de 1000

La gravedad API se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Gravedad\ API = \frac{141.5}{gravedad\ específica\ del\ aceite} - 131.5$$

La gravedad específica del aceite es la relación de su densidad respecto a la del agua. Las determinaciones se realizan a 60 °F que equivalen a 15.56 °C. El instrumento para determinar la gravedad API de un aceite, se conoce como hidrómetro.

IV. ARTÍCULO PUBLICADO

El artículo “**Modification of wettability and reduction of interfacial tension mechanisms involved in the release and enhanced biodegradation of heavy oil by a biosurfactant**”, publicado en *la Revista Mexicana de Ingeniería Química* (2021-07-04), con clave de identificación de objeto digital (DOI) 10.24275/rmiq/IA2427, se encuentra disponible en línea en las siguientes ligas:

<http://www.rmiq.org/ojs311/index.php/rmiq/article/view/2427>

<https://doi.org/10.24275/rmiq/IA2427>



Modification of wettability and reduction of interfacial tension mechanisms involved in the release and enhanced biodegradation of heavy oil by a biosurfactant

Modificación de la mojabilidad y reducción de tensión interfacial involucrados en la liberación y biodegradación mejorada de un crudo pesado por un biosurfactante

E. Castillo-Campos^{1,3}, V. Mugica-Álvarez¹, T.G. Roldán-Carillo², P. Olguín-Lora², G.T. Castorena-Cortés^{2*}

¹Posgrado en Ciencias e Ingeniería, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana - Azcapotzalco, Av. San Pablo 180, Col. Reynosa Tamaulipas, Azcapotzalco, 02200, Ciudad de México, México.

²Instituto Mexicano del Petróleo, Eje Central Lázaro Cárdenas 152, Col. San Bartolo Atepehuacan, Gustavo A. Madero, 07730, Ciudad de México, México.

³Departamento de Bioingeniería, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, Av. Acueducto s/n, Col. Barrio la Laguna Ticomán, 07340, Ciudad de México, México.

Received: April 10, 2021; Accepted: June 22, 2021

Abstract

Bioremediation of hydrocarbon contaminated soils requires releasing the oil from the porous matrix to render it bioavailable. This work aims at evaluating a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain to improve the release and biodegradation of heavy crude oil contaminating limestone sand. The biosurfactant effect on biodegradation of crude oil was elucidated, using a *Rhodococcus sp.* strain. The CO₂ production rate was used as indicator of biological activity that improved by 32.84%. Moreover, at least 67% of the >C₂₀ fraction was degraded in the systems with biosurfactant, reducing aromatic and resin fractions (12.5% and 2%, respectively), whereas without biosurfactant only 37% of the > C₂₀ fraction was removed compared with the null reduction in aromatics and resin. The decrease in surface and interfacial tension, as well as the modification to wettability caused by biosurfactant activity, were the main mechanisms promoting the release of heavy oil, thus making it bioavailable.

Keywords: biosurfactant, heavy oil release, wettability modification, bioavailability, biodegradation.

Resumen

La bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos requiere su liberación de la matriz porosa para hacerlos biodisponibles. Este trabajo tiene como objetivo evaluar un biosurfactante producido por una cepa de *Bacillus subtilis* para mejorar la liberación y biodegradación de crudo pesado contaminando arena caliza. El efecto del biosurfactante sobre la biodegradación del crudo fue dilucidado usando una cepa de *Rhodococcus sp.* La velocidad de producción de CO₂, utilizada como indicador de la actividad biológica, fue mejorada en un 32.84%. Al menos el 67% de la fracción > C₂₀ se degradó en los sistemas con biosurfactante, reduciendo las fracciones aromáticas y de resina (12.5% y 2% respectivamente), mientras que sin biosurfactante solo se eliminó el 37% de la fracción > C₂₀ y la reducción de aromáticos y resinas fue nula. La disminución de la tensión superficial e interfacial, así como la modificación de la mojabilidad causada por la actividad biosurfactante, fueron los principales mecanismos que promueven la liberación de aceite pesado haciéndolo biodisponible.

Palabras clave: biosurfactante, liberación de aceite, modificación de la mojabilidad, biodisponibilidad, biodegradación.

* Corresponding author. E-mail: gcastore@imp.mx
Tel/Fax: +52 33 13785900 ext 27505
<https://doi.org/10.24275/rmiq/IA2427>
ISSN:1665-2738, issn-e: 2395-8472