



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE
BIOSURFACTE EN REACTOR TANQUE AGITADO, CON
APLICACIÓN POTENCIAL EN LA INDUSTRIA
PETROLERA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA QUÍMICA

P R E S E N T A:

KAREN STEFFANI HERNANDO GARCÍA



CDMX

JUNIO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Trejo Candelas Luis Miguel

VOCAL: Profesor: Lemus Barajas María Guadalupe

SECRETARIO: Profesor: Roldan Carrillo Teresa Guadalupe

1er. SUPLENTE: Profesor: Turcio Ortega David

2° SUPLENTE: Profesor: Sandoval Ibarra Federico Daniel

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio de Biotecnología del Petróleo, Gerencia de Ingeniería de Recuperación Adicional de Hidrocarburos, en las instalaciones del Instituto Mexicano del Petróleo.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Teresa Guadalupe Roldán Carrillo.

SUSTENTANTE (S):

Karen Steffani Hernando García

Este trabajo fue realizado dentro de las actividades de la Línea de Investigación Recuperación Mejorada de Hidrocarburos Vía Microbiana, que pertenece a la Gerencia de Ingeniería de Recuperación Adicional de Hidrocarburos, dentro del Programa de Becas para la Formación y Desarrollo de Capital Humano, en las instalaciones del Instituto Mexicano del Petróleo, bajo la dirección de la Dra. Teresa Guadalupe Roldán Carrillo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	4
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Tecnologías de recuperación de hidrocarburos	6
2.2 Tecnología de recuperación de hidrocarburos vía microbiana (MEOR)....	7
2.3 Surfactantes o Tensoactivos	9
2.3.1 Biosurfactantes o Biotensoactivos	10
2.3.2 Ventajas de los biosurfactantes	12
2.3.3 Aplicaciones de los biosurfactantes	13
2.3.4 Clasificación biosurfactantes	15
2.3.5 Costos de biosurfactantes	17
2.3.6 Microorganismos productores de biosurfactante	18
2.4 Factores que afectan la producción de biosurfactantes	22
2.4.1 Fuente de carbono.....	23
2.4.2 Factores ambientales y condiciones de crecimiento.....	24
2.4.3 Temperatura	27
2.5 Producción de biosurfactantes a nivel reactor	28
3. ANTECEDENTES	30
4. JUSTIFICACIÓN	33
5. HIPÓTESIS	34
6. OBJETIVOS	35
6.1 General	35

6.2	Particulares.....	35
7.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	36
8.	METODOLOGÍA.....	37
8.1	Microorganismo.....	37
8.1.1	Reactivación del microorganismo.....	37
8.1.2	Caracterización macroscópica y microscópica.....	37
8.2	Evaluación preliminar de la producción de BS.....	38
8.3	Cinéticas de crecimiento y producción de biosurfactante.....	39
8.4	Evaluación de diferentes parámetros para la producción de biosurfactante	40
8.4.1	Evaluación del efecto de la concentración de oxígeno sobre el crecimiento y producción de biosurfactante.....	40
8.4.2	Evaluación del efecto de la temperatura sobre el crecimiento y producción de biosurfactante.....	41
8.5	Evaluación del efecto del biosurfactante sobre un aceite crudo.....	42
8.5.1	Evaluación del el efecto de la aireación sobre el crecimiento y la producción de biosurfactante a nivel reactor.....	44
8.6	Separación parcial del biosurfactante y rendimiento.....	46
8.7	Cinética de crecimiento y producción de biosurfactante en reactor.....	48
8.8	Cuantificación del sustrato residual.....	50
8.9	Evaluación de la efectividad del BS después de su almacenamiento.....	51
8.10	Técnicas analíticas.....	51
8.10.1	Cuantificación de biomasa.....	51
8.10.2	Evaluación de la producción de biosurfactante.....	52
9.	REASULTADOS.....	57
9.1	Caracterización de la cepa IMP-K.....	57

9.2	Evaluación preliminar de la producción de biosurfactante	60
9.3	Cinética de crecimiento y producción de biosurfactante con la cepa IMP-K a nivel matraz	66
9.4	Evaluación de diferentes parámetros sobre la producción de biosurfactante	73
9.4.1	Evaluación del efecto de la concentración de oxígeno sobre el crecimiento y producción de biosurfactante	73
9.4.2	Evaluación de la temperatura de incubación sobre el crecimiento y producción de biosurfactante	80
9.4.3	Evaluación del efecto tensoactivo del biosurfactante sobre un aceite crudo	84
9.5	Efecto de la aireación sobre la producción de biosurfactante a nivel reactor con la cepa IMP-K	88
9.5.1	Separación parcial del biosurfactante y rendimiento	97
9.6	Cinética de crecimiento y producción de biosurfactante con la cepa IMP-K en reactor de tipo tanque agitado	98
9.6.1	Rendimiento del proceso	111
9.7	Evaluación de la efectividad del BS después de su almacenamiento...	112
10.	CONCLUSIONES	114
11.	PERSPECTIVAS A FUTURO	117
12.	REFERENCIAS.....	119
13.	ANEXOS.....	134
13.1	Anexo 1. Observación de microorganismos en microscopio.....	134
13.2	Anexo 2. Curva patrón para evaluación de proteínas	136
13.3	Anexo 3. Cálculo del rendimiento.....	137

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Aplicaciones comunes de los biosurfactantes en la industria petrolera (De Cassia <i>et al.</i> , 2014).	14
Tabla 2.2 Clasificación y origen de diferentes biosurfactantes (Raiger <i>et al.</i> , 2009)	15
Tabla 2.3 Costo del biosurfactante por litro de solución (diluido y CMC basado en el cálculo de costos realizado por (Sekhon <i>et al.</i> , 2014).....	18
Tabla 2.4 Microorganismos productores de biosurfactante con diferentes sustratos como fuente de carbono (Banat <i>et al.</i> , 2014).	19
Tabla 3.1 Producción de BS a nivel reactor.....	31
Tabla 8.1 Medio de cultivo para la producción de biosurfactante con la cepa IMP-P.	39
Tabla 8.2 Composición de la solución de elementos traza.	39
Tabla 8.3 Sistemas con diferentes atmósferas para evaluar el efecto del oxígeno sobre el crecimiento y producción de biosurfactante con la cepa IMP-K.	41
Tabla 8.4 Aceite utilizado en la evaluación de la tensión interfacial y sus características.	43
Tabla 8.5 Sistemas donde se evaluó el efecto del biosurfactante producido por la cepa IMP-K sobre un aceite a diferentes condiciones.....	43
Tabla 9.1 Caracterización macroscópica de la cepa IMP-K cultivada en agar nutritivo a 30° C.	58
Tabla 9.2 Evaluación de la tensión superficial con el sobrenadante libre de células del cultivo de la cepa IMP-K a diferentes tiempos de incubación y realizando diluciones.	65
Tabla 9.3 Evaluación de la tensión superficial con el sobrenadante libre de células del cultivo de la cepa IMP-K a diferentes tiempos de incubación y realizando diluciones.	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Representación molecular de mono-ramnolípidos (a) y diramnolípidos (b) producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Lovaglio et al., 2011).	21
Figura 7.1 Diagrama de la estrategia experimental para evaluar la producción de un biosurfactante. AS: aceite nuevo de soya; AGC: aceite gastado de cocina.	36
Figura 8.1 Reactor tanque agitado y controlador para el cultivo de la cepa IMP-K, donde se evaluó su crecimiento y producción de biosurfactante.	46
Figura 8.2 Liofilizadora marca Labconco.	47
Figura 8.3 Liofilizado obtenido de reactor con 1000 mL/min de aireación y aceite de soya como sustrato.	49
Figura 8.4 Reactor con sistema de control y recolección de espuma.	50
Figura 8.5 Dispersión de aceite provocado por efecto del biosurfactante.	53
Figura 8.6 Tensiómetro Krüss, modelo K100.	54
Figura 9.1 Cepa IMP-K cultivada en agar nutritivo a 30 °C.	57
Figura 9.2 Observación microscópica en fresco de la cepa IMP-K, cultivada en caldo nutritivo a las 24 h de incubación, en microscopio de contraste de fases a 100X.	59
Figura 9.3 Observación microscópica de la cepa IMP-K en caldo nutritivo a las 24 h, con Tinción de Gram en microscopio óptico a 100X.	59
Figura 9.4 Cultivos de la cepa IMP-K en medio mineral y aceite de soya como sustrato a diferentes tiempos de incubación.	60
Figura 9.5 Evaluación del crecimiento de la cepa IMP-K, mediante la cuantificación de proteína, cultivada con aceite de soya y aceite gastado de cocina como fuentes de carbono a nivel matraz.	61
Figura 9.6 Evaluación preliminar de la producción de biosurfactante con la cepa IMP-K cultivada con aceite de soya y aceite gastado de cocina como fuentes de carbono, mediante la evaluación de dispersión de aceite a nivel matraz.	63
Figura 9.7 Evaluación preliminar de la producción de biosurfactante con la cepa IMP-K cultivada con aceite de soya y aceite gastado de cocina como fuentes de carbono, mediante la evaluación de tensión superficial a nivel matraz.	64

Figura 9.8 Evaluación de la producción de biosurfactante de la cepa IMP-K, mediante la dispersión de aceite, cultivada con aceite de soya como fuente de carbono a nivel matraz.	66
Figura 9.9 Cinética de la producción de biosurfactante con la cepa IMP-K, mediante la evaluación de dispersión de aceite, cultivada con aceite gastado de cocina como fuente de carbono a nivel matraz.	68
Figura 9.10 Evaluación de la producción de biosurfactante de la cepa IMP-K, mediante la determinación de tensión superficial, cultivada con aceite de soya como fuente de carbono a nivel matraz.	69
Figura 9.11 Evaluación de la producción de biosurfactante de la cepa IMP-K, mediante la determinación de la tensión superficial, cultivada con aceite gastado de cocina como fuente de carbono a nivel matraz.	70
Figura 9.12 Evaluación del crecimiento (proteínas) de la cepa IMP-K cultivada con aceite de soya como fuente de carbono.	72
Figura 9.13 Evaluación del crecimiento (proteínas) de la cepa IMP-K cultivada con aceite gastado de cocina como fuente de carbono.	73
Figura 9.14 Evaluación del crecimiento de la cepa IMP-K a nivel matraz a diferentes concentraciones de oxígeno a 30°C y 150 rpm.	75
Figura 9.15 Sistemas inoculados con la cepa IMP-K y adicionados con aceite de soya como sustrato para la producción de biosurfactante a diferentes porcentajes de O ₂ , a las 24, 48, 72 y 168 h de cultivo a 30° C. A) Control sin inocular, B) 0% aire, C) 25% aire, D) 50% aire y E) 100% aire.	75
Figura 9.16 Evaluación de la producción CO ₂ mediante cromatografía de gases en los sistemas cultivados con la cepa IMP-K a diferentes concentraciones de oxígeno a 30°C y 150 rpm.	76
Figura 9.17 Evaluación del efecto de la concentración de oxígeno sobre la producción de biosurfactante mediante la tensión superficial, con la cepa IMP-K cultivada en aceite de soya como sustrato e incubada a 30° C y 150 rpm.	79
Figura 9.18 Evaluación del efecto de la concentración de oxígeno sobre la producción de biosurfactante mediante la dispersión de aceite, con la cepa IMP-K cultivada en aceite de soya como sustrato e incubada a 30° C y 150 rpm.	80

Figura 9.19 Evaluación del efecto de la temperatura sobre el crecimiento de la cepa IMP-K cultivada en aceite de soya como sustrato y con agitación de 150 rpm.	82
Figura 9.20 Evaluación del efecto de la temperatura de incubación de la cepa IMP-K sobre la producción de biosurfactante mediante la tensión superficial, con aceite de soya como sustrato y a 150 rpm.	83
Figura 9.21 Evaluación del efecto de la temperatura de incubación de la cepa IMP-K sobre la producción de biosurfactante mediante la dispersión de aceite, con aceite de soya como sustrato y a 150 rpm.	84
Figura 9.22 Evaluación de la actividad emulsificante (AE_{24}) con el biosurfactante producido por la cepa IMP-K sobre un aceite pesado, al tiempo 0. A) a 30° C y sin sal, B) a 30° C y 50 g/L NaCl, C) a 60° C y sin sal, D) a 60° C y 50 g/L NaCl.	86
Figura 9.23 Evaluación de la actividad emulsificante (AE_{24}) con el biosurfactante producido por la cepa IMP-K sobre un aceite pesado a las 24 horas, a diferentes condiciones de temperatura y salinidad.	87
Figura 9.24 Evaluación de la TI que produce el biosurfactante de la cepa IMP-K sobre un aceite a diferentes condiciones de temperatura y salinidad.	88
Figura 9.25 Evaluación del crecimiento de la cepa IMP-K a nivel reactor tanque agitado a diferentes aireaciones.	90
Figura 9.26 Seguimiento del oxígeno disuelto en el cultivo de la cepa IMP-K en reactor e diferentes aireaciones.	91
Figura 9.27 Seguimiento del pH en el cultivo de la cepa IMP-K en reactor a diferentes aireaciones.	92
Figura 9.28 Evaluación de la producción de BS por la cepa IMP-K mediante la tensión superficial a diferentes aireaciones a nivel reactor.	93
Figura 9.29 Evaluación de la producción de BS por la cepa IMP-K mediante la dispersión de aceite a diferentes aireaciones a nivel reactor.	94
Figura 9.30 Cultivo de la cepa IMP-K en reactor tanque agitado con aceite de soya como sustrato, con aireación de 1000 mL/min donde hubo formación de espuma.	95

Figura 9.31 Evaluación de la tensión superficial con el sobrenadante libre de células del cultivo de la cepa IMP-K a diferentes tiempos de incubación y realizando diluciones.	96
Figura 9.32 Evaluación de la TS a diferentes concentraciones de BS proveniente de las 48 h de cultivo de la cepa IMP-K a nivel reactor a diferentes aireaciones: A) 400, B) 700, C) 1000 y D) 1500 mL aire/min.	98
Figura 9.33 Cinética de crecimiento de la cepa IMP-K en reactor tanque agitado con dos sustratos aceite de soya nuevo (AS) y aceite gastado de cocina (AGC).	100
Figura 9.34 Observación microscópica en fresco de la cepa IMP-K, cultivada en reactor con aceite de soya nuevo (AS) hasta las 48 h de incubación, con microscopio de contraste de fases a 100X.	101
Figura 9.35 Evolución del cultivo de la cepa IMP-K en reactor con aceite de soya nuevo (AS) durante 0, 8, 24, 48, 76,82 y 92 h.	102
Figura 9.36 Cinética producción de biosurfactante con la cepa IMP-K, mediante la TS en reactor tanque agitado, con aireación de 1000 mL/min con aceite de soya (AS) y aceite gastado de cocina (AGC) como sustratos.	103
Figura 9.37 Cinética producción de biosurfactante con la cepa IMP-K, mediante la evaluación de DA en reactor tanque agitado, con aireación de 1000 mL/min con aceite de soya (AS) y aceite gastado de cocina (AGC) como sustratos.	104
Figura 9.38 Evaluación de la dispersión de aceite con muestras del cultivo de la cepa IMP-K en reactor con aceite de soya como sustrato a diferentes tiempos de incubación.	105
Figura 9.39 <i>Evaluación de la tensión superficial con el sobrenadante libre de células del cultivo de la cepa IMP-K diluido y sin diluir a diferentes tiempos de incubación con dos sustratos: A) aceite de soya, B) aceite gastado de cocina. .</i>	106
Figura 9.40 Evaluación de la Tensión Superficial con el producto parcialmente purificado (biosurfactante) de la cepa IMP-K con dos sustratos (AS y AGC) a diferentes concentraciones.	107
Figura 9.41 Evaluación del sustrato consumido durante el cultivo de la cepa IMP-K con AS y AGC en reactor.	109

Figura 9.42 Evaluación del biosurfactante crudo obtenido por liofilización, proveniente del cultivo en reactor a las 48 h, con dos sustratos aceite de soya (AS) y aceite gastado de cocina (AGC).....	110
Figura 9.43 Evaluación de la actividad tensoactiva del BS producido por la cepa IMP-K con AS como sustrato, contenido en el sobrenadante durante su almacenamiento en refrigeración.	113

Nomenclatura

AGC	Aceite gastado de cocina
AS	Aceite de Soya
BS	Biosurfactante
CMC	Concentración micelar crítica
DA	Dispersión de Aceite
DMC	Dilución micelar crítica
DO	Densidad óptica
TI	Tensión interfacial
TS	Tensión superficial
vvm	Volumen de aire por volumen de medio de cultivo
AE ₂₄	% de actividad emulsificante a las 24 h

RESUMEN

El presente trabajo se refiere al estudio de la producción de un biosurfactante con la cepa IMP-K que corresponde a *Pseudomonas sp.*, utilizando dos tipos de sustratos, un aceite soya (AS) y aceite gastado de cocina (AGC) en matraz y en un reactor tipo tanque agitado de 3 L.

Primero se llevó a cabo una evaluación preliminar de la producción del tensoactivo en matraz con ambas fuentes de carbono (AS y AGC) mediante la determinación de tensión superficial (TS) y la prueba de dispersión de aceite (DA). El BS producido por la cepa IMP-K disminuyó la TS de 72 a 29 mN/m con AS y AGC y produjo halos de dispersión de aceite de 10 cm desde las 24 h para AS, mientras que con AGC se alcanzaron 12 cm después de 56 h. Demostrando que la cepa IMP-K, es capaz de utilizar ambos sustratos para su crecimiento y producción del tensoactivo.

Posteriormente se realizó una cinética de crecimiento del microorganismo con las dos fuentes de carbono; mostrando que los mejores tiempos de producción fueron 24 h cuando se utiliza aceite de soya y 48 h con aceite gastado de cocina, donde se obtuvo una dilución micelar crítica (DMC) de 1:16 para ambos sustratos, manteniendo la TS en valores de 29-31 mN/m sin diferencia significativa.

En este estudio también se evaluó el efecto de la concentración de oxígeno (aire) y la temperatura en los sistemas para el crecimiento y producción de BS con la cepa IMP-K a nivel microcosmos y matraz, respectivamente. Las concentraciones de aire fueron 0, 25, 50 y 100% y las temperaturas de cultivo evaluadas fueron 30, 40 y 50°C. Los resultados indicaron que la presencia o ausencia de oxígeno afecta el crecimiento de la cepa y por lo tanto la producción del BS, que se favorece con las mayores concentraciones de aire, con preferencia por la más alta concentración (100%) y disminuye en condiciones anaerobias. En cuanto a las diferentes temperaturas de cultivo evaluadas la cepa IMP-K fue capaz de producir

biosurfactante cuando se incubaba a 30 y 40° C, pero es mejor la producción a 30° C. En cambio la temperatura de 50° C inhibe el crecimiento y la producción de este metabolito.

Otro parámetro evaluado fue el efecto del tensoactivo producido por la cepa IMP-K sobre un aceite pesado de 14.8° API, mediante la determinación de la tensión interfacial (TI) y actividad emulsificante (AE_{24}) a diferentes condiciones de temperatura (30 y 60° C) y salinidades (sin sal y 50 g/L de NaCl). Los resultados mostraron que el BS es capaz de reducir la TI del aceite crudo hasta 0.8 mN/m, que corresponde a una disminución del 90% con los tratamientos a 30° C con salinidad (50 g/L NaCl) y 60° C sin sal. Además, el BS fue capaz de formar emulsiones con este aceite, aunque en un porcentaje bajo (22.8%).

Después se procedió a realizar el escalamiento de la producción de biosurfactante con la cepa IMP-K a nivel reactor. Primero, se evaluó el efecto de la aireación sobre el crecimiento y producción de BS. Las aireaciones evaluadas fueron 400, 700, 1000 y 1500 mL/min, donde se observó que a menores flujos de aireación, la concentración de oxígeno disuelto disminuyó hasta un 5%, por lo cual el crecimiento microbiano se ve afectado negativamente. La mejor aireación evaluada fue de 1000 mL/min, con una CMC de 1380 mg/L y una disminución de la TS hasta 29 mN/m.

Con este resultado se procedió a realizar dos cinéticas, con AS y AGC como sustrato. Los resultados mostraron que el mejor sustrato fue AGC, donde se obtuvo un mayor rendimiento (24 g/L) a las 48 h con una CMC de 749 mg/L y un rendimiento de producto con respecto al consumo de sustrato ($Y_{P/S}$) de 0.7744, en comparación con el AS, donde se obtuvo casi la mitad de rendimiento (12.4 g/L) a las 48 h, una CMC de 1554 mg/L y un valor de $Y_{P/S}$ de 0.4255. Lo anterior demuestra que la cepa IMP-K tiene preferencia por el AGC. Cabe destacar que en ambas cinéticas se tuvo un perfil similar, con una fase exponencial hasta las 24 h y después de este tiempo una fase estacionaria en el cual se produjo el BS.

Por último, al BS producido a nivel reactor contenido en el sobrenadante libre de células, se le evaluó su efectividad tensoactiva después de 8 meses en conservación a 4°C. Este bioproducto tuvo actividad tensoactiva durante todo el tiempo, con una TS de 29 mN/m en promedio. Lo que indica que se mantuvo estable y su almacenamiento a 4° C es un buen método para mantenerlo en condiciones adecuadas para su uso.

Todos estos resultados son promisorios e indicativos del potencial de aplicación de los biosurfactantes producidos por las cepas IMP-K en la recuperación de hidrocarburos.

1. INTRODUCCIÓN

El petróleo es un elemento importante para las actividades humanas, es la principal fuente de energía mundial y materia prima para la producción de diversos compuestos de uso cotidiano. Sin embargo, a medida que las reservas de petróleo disminuyen, la explotación de los recursos petrolíferos en campos maduros o abandonados es necesaria para satisfacer las futuras demandas energéticas. Uno de los grandes problemas que enfrenta la industria petrolera en estos campos es la baja eficiencia en la extracción del petróleo, y la contaminación que de ella misma se genera (Amani *et al.*, 2010); por lo que es necesario que se desarrollen nuevas tecnologías de extracción y movilización de los hidrocarburos para incrementar su recuperación y transporte (Patel *et al.*, 2015; Bryant *et al.*, 1987).

A nivel mundial, durante el 2014 se consumió alrededor de 92,086 millones de barriles de petróleo diarios, que representan 32.6% de la demanda mundial de energía (SENER, 2015). Además, el petróleo es la principal fuente de energía en México, ya que cubre el 90 % de la demanda energética (Centeno *et al.*, 2010).

Actualmente se utilizan hasta tres etapas o procesos de extracción de petróleo, los cuales aumentan el rendimiento final. La etapa de extracción primaria es la más económica y se realiza aprovechando la presión natural del yacimiento. La extracción secundaria depende del uso de bombas y/o inyección de gas, agua o vapor para extraer parte del petróleo residual adherido a las rocas del yacimiento. Después de que se han empleado las técnicas de recuperación primaria y secundaria, queda un remanente de petróleo entre 60 y 70% (PEMEX, 2015) de la cantidad original en el yacimiento debido a la naturaleza hidrofóbica de los hidrocarburos que hace que estos compuestos sean poco accesibles y se adhieran fuertemente a las rocas.

PEMEX reportó que la mayor parte del petróleo que queda en los yacimientos mexicanos es de tipo pesado (alta densidad $>0.92 \text{ g/cm}^3$ y $<1.0 \text{ g/cm}^3$ y gravedades

API entre 10 y 22.3°) (PEMEX, 2015); razón por la cual su extracción no es suficiente con las tecnologías tradicionales (recuperación primaria y secundaria).

Una tercera opción para la extracción de petróleo, son las tecnologías de Recuperación Mejorada de Petróleo (EOR, por sus siglas en inglés), que están dirigidas a incrementar la recuperación de petróleo crudo de los yacimientos (Lazar *et al.*, 2007). Dentro de estas tecnologías, se encuentran los procesos microbianos conocidos como recuperación mejorada del petróleo vía microbiana (MEOR, por sus siglas en inglés). Esta tecnología se basa en la utilización de microorganismos y sus metabolitos, entre ellos gases (CO₂ y CH₄), solventes, ácidos y biosurfactantes (BS) (Raiger *et al.*, 2009; Bryan y Lockhart, 2002). Los BS son utilizados para disminuir la tensión interfacial entre el agua-aceite facilitando la movilización del crudo a través del yacimiento.

La combinación de estrategias eficientes que aumenten la disponibilidad y extracción de los hidrocarburos en los yacimientos, constituyen elementos claves para abordar la solución de la demanda energética y los problemas ecológicos derivados de los mismos, en los cuales las tecnologías biológicas (MEOR) tienen un papel esencial (Patel *et al.*, 2015).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Tecnologías de recuperación de hidrocarburos

Para la extracción o recuperación del petróleo existen tres tipos de tecnologías, denominadas recuperación primaria, secundaria y terciaria. La extracción primaria es la más económica y se realiza al iniciar la producción en un pozo, ya que la presión al interior del yacimiento es suficiente para forzar la salida natural del petróleo a través del pozo. El período de recuperación primaria tiene una duración variable, pero siempre se lleva a cabo, porque permite recoger numerosa información sobre el comportamiento del yacimiento, importante para la planificación de la explotación posterior. El porcentaje de recuperación del aceite crudo original del yacimiento por recuperación primaria es en promedio del orden de 10-25% (Pemex, 2015).

Durante la vida productiva del yacimiento la presión descenderá y es entonces cuando se requiere realizar recuperación secundaria, que es la inyección de agua o de gas para compensar la pérdida de presión y la ayuda mediante bombas para extraer el petróleo. Este tipo de tecnología permite elevar la recuperación del aceite hasta un promedio de 25-35% (Pemex 2015). Al paso del tiempo por más agua o gas que se inyecte y aunque se usen sistemas avanzados de bombeo, ya no se recupera más petróleo, atribuido a dos factores: a) a escala de los poros, el crudo alcanza una saturación residual suficientemente baja para encontrarse en forma de glóbulos discontinuos, atrapados por las fuerzas capilares; y b) a escala del yacimiento existen ciertas zonas en las cuales el fluido inyectado durante la recuperación secundaria no penetra, por la baja permeabilidad de estas zonas, porque siguen caminos preferenciales, o porque la geometría de implantación de los pozos no es favorable y la declinación comienza (Salas, 2012). Debido a lo anterior deben aplicarse tecnologías de recuperación terciaria o mejorada de Petróleo (EOR, enhanced oil recovery) (Sen, 2008). Estas tecnologías consisten principalmente en procesos fisicoquímicos, entre las cuales se encuentran los

procesos térmicos que mejoran la eficiencia de barrido reduciendo la viscosidad del crudo mediante calentamiento (estimulación con vapor y combustión en sitio), los procesos químicos que incluyen el taponamiento de caminos preferenciales con espumas, o el uso de polímeros y surfactantes, entre otros provocando la disminución de la tensión interfacial (Sen, 2008).

Actualmente hay varios países que ya usan o han utilizado técnicas de EOR con muy buenos resultados cumpliendo con el objetivo de recuperar más petróleo con altos retornos de inversión. A nivel mundial la producción de petróleo por procesos EOR es de 2.5 millones de barriles por día y la mayoría proviene de Estados Unidos, México, Venezuela, Canadá, Indonesia y China (Thomas, 2008). Sin embargo estas tecnologías tienen grandes costos energéticos como son la térmica o repercusiones ambientales en los yacimientos como son la química. Es entonces cuando la aplicación de procesos biológicos puede ser una opción amigable con el ambiente y económicamente factible (Volk y Liu, 2010).

2.2 Tecnología de recuperación de hidrocarburos vía microbiana (MEOR)

La tecnología de recuperación de hidrocarburos por procesos biológicos (MEOR), consiste en inyectar o estimular los microorganismos del yacimiento que son capaces de producir metabolitos como gases (CO_2 , CH_4 , H_2), ácidos, disolventes, biopolímeros y biosurfactantes (Lazar *et al.*, 2007). Dependiendo de la naturaleza y características del yacimiento y de los fluidos, se pueden proponer diferentes estrategias para el uso de estos metabolitos como son (Sen, 2008):

- Adición de biomasa, la cual puede modificar la mojabilidad de la roca, alterar la viscosidad del aceite o degradar selectivamente los componentes del petróleo.
- Los biosurfactantes pueden favorecer la emulsificación y disminuir la tensión superficial e interfacial.

- Los biopolímeros modifican la viscosidad y pueden taponear caminos preferenciales permitiendo un desplazamiento selectivo.
- Los solventes y ácidos pueden modificar la permeabilidad por disolución de la roca o bien pueden reducir la viscosidad del crudo.
- Los gases pueden incrementar la presión o permear en el crudo y reducir su viscosidad.

La producción de dichos metabolitos puede hacerse dentro o fuera del yacimiento. En el primero caso se utilizan técnicas de estimulación, es decir, agregando nutrientes específicos estimulando el desarrollo de los microorganismos introducidos o bien autóctonos del yacimiento, los cuales pueden sintetizar biosurfactantes dentro del pozo (recuperación *in situ*). En el segundo caso, una vez producidos, los bioproductos se pueden inyectar en el yacimiento (recuperación *ex situ*) (Kosaric, 1992). Sin embargo la recuperación *in situ* tiene factores limitantes para el desarrollo de los microorganismos, ya que la temperatura de los pozos puede variar en un intervalo amplio y la ausencia de oxígeno dentro de los yacimientos es escasa o nula (Magot *et al.*, 2000). Otros factores que también afectan la tecnología MEOR son el pH y la salinidad (hasta 20% de NaCl) que constituye cerca del 90% de los sólidos en las salmueras y nutrientes dentro del mismo yacimiento (Premuzic y Lin, 1991). Por lo que la selección del microorganismo debe ser cuidadosamente evaluada antes de introducirlo al yacimiento o bien estimular los microorganismos autóctonos que son lo que soportan las condiciones del yacimiento.

El éxito de la aplicación de MEOR por diferentes empresas petroleras, la apuntan como una tecnología fácil, económica y amigable para el medioambiente (Sen, 2008). Los estudios de esta tecnología contribuyen también a una mejor comprensión de las capacidades metabólicas de los microorganismos que alteran la calidad de los hidrocarburos (Volk y Liu, 2010). Cabe mencionar que MEOR es un proceso que puede ser muy eficiente en la recuperación de crudos pesados y extra pesados como los crudos mexicanos (Roldán *et al.*, 2014; Olguín *et al.*, 2014).

Los biosurfactantes son uno de los metabolitos producidos por los microorganismos en la tecnología de MEOR, y estos bioproductos pueden tener gran potencial de aplicación en campo, ya que se ha observado que son estables a condiciones altas de temperatura y de salinidad, con buena actividad tensoactiva, útil para la recuperación de hidrocarburos. Sin embargo para hacerlos competitivos frente a los surfactantes químicos, se tiene que optimizar y disminuir los costos de su producción, lo cual se puede lograr utilizando sustratos económicos o bien residuales (Patel *et al.*, 2015).

2.3 Surfactantes o Tensoactivos

Los surfactantes o tensoactivos son moléculas anfifílicas, con un extremo hidrofílico y otro hidrofóbico, que le permiten interactuar en las interfases de fluidos con diferentes grados de polaridad como son los sistemas de aceite-agua, agua-aire (Stoyanov *et al.*, 2003). Sus efectos en estos sistemas provocan la reducción de la tensión superficial en agua desde 72 mN/m hasta 26 mN/m (Gautam *et al.*, 2006). Los surfactantes también pueden tener efecto emulsificante, humectante, entre otros. Estas actividades tensoactivas dependen de la estructura química de estos compuestos (Singh *et al.*, 2007; Gautam K. *et al.*, 2006) los cuales pueden ser de origen sintético o biológico, estos últimos denominados biosurfactantes.

Dentro de la clasificación de los surfactantes están los aniónicos, catiónicos y no iónicos. De los surfactantes aniónicos, los más importantes por su aplicación a nivel industrial son el lauril sulfato de sodio y el dodecil bencen sulfonato de sodio; entre los catiónicos, los más importantes son los derivados de las sales de alquil trimetil amonio. Los alquil fenol etoxilatos son los tensoactivos no iónicos más ampliamente usados, destacando las series del tritón y el tergitol (Evans y Furlong, 2003).

En lo concerniente a los biosurfactantes, la parte hidrofílica consiste generalmente de alguna de las estructuras siguientes: aminoácidos, péptidos aniónicos o catiónicos y carbohidratos; la parte hidrofóbica regularmente está constituida de ácidos grasos saturados o insaturados.

2.3.1 Biosurfactantes o Biotensoactivos

Los biosurfactantes o biotensoactivos son compuestos anfifílicos producidos por diversos microorganismos, entre ellos bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Estos compuestos comprenden una gran variedad de estructuras químicas como son los glicolípidos, lipopéptidos, ácidos grasos, complejos de proteína-polisacárido, péptidos, glicopéptidos, fosfolípidos y lípidos naturales (Singh *et al.*, 2007; Ron *et al.*, 2001; Mulligan, 2005).

Los microorganismos sintetizan a los biosurfactantes por varias razones entre ellas:

- Cuando la fuente de carbono es parcialmente soluble o insoluble en agua como hidrocarburos, lípidos, aceites, fármacos, están obligados a sintetizar moléculas con propiedades tensoactivas que favorezcan la solubilización de los sustratos insolubles facilitando su disponibilidad para el crecimiento, mantenimiento y actividad de los microorganismos (Francy *et al.*, 1991; Morikawa *et al.*, 1993, Zeng *et al.*, 2005).
- Adherencia y liberación de células en superficies. Esta es una de las más importantes estrategias de supervivencia de los microorganismos, debido a la presencia de biosurfactantes en la parte externa de la membrana o pared celular. Los biosurfactantes son responsables de regular las propiedades de la superficie celular, promoviendo la adherencia o liberación de las células de sitios específicos de acuerdo a sus necesidades nutricionales o para evadir ambientes desfavorables (Rosenberg *et al.*, 1999; Kearns y Losick, 2003; Lang y Wullbrandt, 1999).

- Movilidad microbiana. También se ha mencionado que pueden estar involucrados en la movilidad microbiana, ya que si el microorganismo productor se encuentra en la interfase, estos compuestos pueden reducir la tensión interfacial y favorecer el movimiento en la búsqueda de ambientes nuevos para el crecimiento, reproducción y colonización (Lang y Wullbrandt, 1999).
- Facilitar el transporte de hidrocarburos a nivel de membrana, función atribuida a los biosurfactantes del tipo glicolípido ligados a membrana celular.
- Actividad antibiótica, que les brinda una mayor oportunidad de supervivencia en nichos con una alta competitividad por nutrientes (Lin y Lin, 1998) y que ha sido demostrada para varios biosurfactantes, principalmente los lipopéptidos y glicolípidos. Ejemplos de éstos biosurfactantes son los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* y la surfactina de *Bacillus subtilis*, los cuales presentan actividad como antibióticos, lo que les permite solubilizar los principales componentes de las membranas celulares de otros microorganismos y les brinda una mayor oportunidad de supervivencia en nichos con una alta competitividad por nutrientes; así como de la inhibición de la unión de otros microorganismos a las interfases donde se encuentran colonias productoras ya establecidas (Ron y Rosenberg, 2001; Supaphol et al., 2011).

Debido a las características y funciones descritas para los BS, estas moléculas son atractivas para la industria de extracción de petróleo, ya que pueden reducir la tensión superficial e interfacial, aumentar la solubilidad y movilidad de compuestos orgánicos hidrofóbicos o insolubles, como los hidrocarburos del petróleo (Lazar *et al.*, 2007; Youssef *et al.*, 2007). Aunque su utilización futura puede depender de su costo de producción (Jiménez *et al.*, 2010). Algunos estudios demuestran que pueden ser producidos a partir de la fermentación de sustratos renovables baratos

o de tipo residual, proporcionando una tecnología competitiva técnica y económicamente factible (Nitschke *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2012).

La mayoría de los microorganismos producen biosurfactantes aniónicos, como los ramnolípidos, o neutrales (Madsen *et al.*, 2015), solo unos pocos son catiónicos, como aquellos que tienen grupos amino (Mulligan *et al.*, 2001).

2.3.2 Ventajas de los biosurfactantes

Comparados con los surfactantes sintéticos, los biosurfactantes presentan muchas ventajas, entre ellas su alta actividad de superficie, baja toxicidad, biodegradabilidad, tolerancia a condiciones extremas de pH, temperatura y condiciones salinas, entre otras (Banat *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2007). Las principales ventajas de los biosurfactantes son:

- Tienen amplia variedad de estructuras químicas con diferentes grupos funcionales que le confieren mecanismos de acción específicos (Kosaric, 1992).
- Son eficientes solubilizando compuestos hidrofóbicos y disminuyendo su tensión superficial e interfacial (Jiménez *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2008).
- Algunos de los biosurfactantes han mostrado que son estables a condiciones extremas por lo que se pueden utilizar a temperaturas, salinidades y presiones altas que se tienen en los yacimientos petroleros (Ibrahim *et al.*, 2013).
- Los BS no solamente tienen aplicación en la industria petrolera, sino que también son de gran utilidad en las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentos, entre otras (Abalos *et al.*, 2001).

- Los biosurfactantes pueden ser producidos a partir de fuentes de carbono económicas y residuales, lo que hace más rentable su producción y por lo tanto su aplicación dentro de la tecnología de MEOR (Makkar y Cameotra, 2011).
- Los biosurfactantes tienen alta biodegradabilidad, que los hace más amigables con el ambiente, por lo que también son utilizados en biorremediación de suelos (Urum *et al.*, 2006).
- Muchos de los biosurfactantes en comparación con los sintéticos presentan baja toxicidad o nula toxicidad (Christofi e Ivshina, 2002).
- Los BS han demostrado eficacia similar a la de los tensoactivos sintéticos pero a más baja concentración, ya que tienen concentraciones micelares críticas (CMC) de 1-2000 mg/L (Santos *et al.*, 2016).

Estas ventajas hacen que los BS sean candidatos potenciales para remplazar a los tensoactivos químicos en el futuro en diversas aplicaciones (Banat *et al.*, 2010; Nitschke *et al.*, 2005; Gautam y Tiagy 2006).

2.3.3 Aplicaciones de los biosurfactantes

Los biotensoactivos o biosurfactantes tienen aplicaciones potenciales en una gran variedad de sectores (ambiental, medicinal, etc.), así como en la industria petrolera, alimentaria, cosmética, farmacéutica, agrícola, textil, de plásticos pinturas y papelera (Rahman y Gakpe, 2008). Lo anterior debido a las múltiples propiedades de los BS, ya que pueden actuar como agentes humectantes (adsorción en la interfase líquido-sólido), espumantes (interfase líquido-gas), estabilizadores de emulsiones o micro emulsiones (interfase líquido-líquido), dispersantes,

impermeabilizantes, en detergencia, germicidas, insecticidas, engrasantes o desengrasantes, en el teñido, suavizantes o lubricantes, entre otros (Singh *et al.*, 2007).

Dentro de la industria petrolera, podemos encontrar aplicaciones potenciales de los BS, como es la tecnología de recuperación de hidrocarburos vía microbiana que provocan un descenso significativo en la tensión superficial e interfacial (De Lima *et al.*, 2009). Además, los BS han sido aplicados en procesos de biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos, ya que incrementan su biodisponibilidad y biodegradabilidad (Banat *et al.*, 2008; Ivshina *et al.*, 1998). Otras aplicaciones relacionadas incluyen movilización y limpieza de aceites en tanques de almacenamiento (Banat *et al.*, 2010; Sen, 2008). En la tabla 2.1 se muestra algunas aplicaciones de los biosurfactantes en la industria petrolera.

Tabla 2.1 Aplicaciones comunes de los biosurfactantes en la industria petrolera.

Proceso	Aplicación
Extracción	Cambios de mojabilidad de la roca de yacimiento Reducción de la viscosidad del aceite Emulsificación de lodos aceitosos en perforación de pozos Dispersión de hidrocarburos con desplazamiento fácil del aceite
Transportación	Reducción de la viscosidad del aceite Estabilización de emulsiones de aceite Control en el depósito de parafinas y asfaltenos Desemulsificación de emulsiones de aceite/agua
Tanques de Aceite/ Limpieza de contenedores	Reducción de la viscosidad del aceite Emulsificación de lodos aceitosos en perforación de pozos Dispersión de hidrocarburos con desplazamiento fácil del aceite

(Modificado de Silva *et al.*, 2014).

2.3.4 Clasificación biosurfactantes

Los biosurfactantes son moléculas que tienen diversas estructuras químicas (Tabla 2.2) y pueden ser de bajo y alto peso molecular. Los compuestos de bajo peso molecular son generalmente lipopéptidos, glicolípidos, aminoácidos modificados y ácidos grasos, mientras que los de alto peso molecular son polímeros extracelulares compuestos por polisacáridos, lipopolisacáridos, proteínas, lipoproteínas o una mezcla compleja de estos biopolímeros (Rosenberg y Ron, 1999; Singh *et al.*, 2007).

Tabla 2.2 Clasificación y origen de diferentes biosurfactantes (Raiger *et al.*, 2009)

Tipo de biosurfactante	Organismos que lo producen	Parte hidrofóbica	Parte hidrofílica
Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. sp.</i> , <i>Serratia rubidea</i>	Ácido 3-b-hidroxidecanóico	1 o 2 moléculas de ramnosa
Trehalolípidos	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Nocardia sp.</i>	Ácido C6-C6' micólico	Trehalosa
Soforolípidos	<i>Candida apicola</i> , <i>C. bombicola</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. bogoriensis</i>	Ácido3-hidroxiácido	Soforosa
Celobiolípidos	<i>Ustilago maydis</i>	Ácido graso	Celobiosa
Lípidos polioles	<i>Rhodotorula glutinus</i> , <i>Rhodotorula graminus</i>	Ácido graso	Polioxipropilenglicol
Diglicosil-diglicéridos	<i>Lactobacillus fermentii</i>	2 ácidos grasos	di-hidrato de carbono+ glicerol

Tabla 2.2. Continuación... Clasificación y origen de diferentes biosurfactantes.

Tipo de biosurfactante	Organismos que lo producen	Parte hidrofóbica	Parte hidrofílica
Lipopolisacáridos	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (RAG1), <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Candida lipolytica</i>	Compuesto alifático de cadena larga	Oligosacárido+ péptido
Artrofactina	<i>Arthrobacter sp.</i>	Hidroxiácido	Péptido cíclico
Liquenisina A, Liquenisina B	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hidroxiácido	Péptido cíclico
Surfactina	<i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i>	Hidroxiácido	Péptido cíclico
Viscosina	<i>P. fluorescens</i>	Hidroxiácido	Péptido cíclico
Ornitina, lisina	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>Streptomyces sioyaensis</i> , <i>Gluconobacter cerinus</i>	Compuesto alifático de cadena larga	Grupos amino y grupos ácido
Fosfolípidos Sulfonilípidos	<i>Acinetobacter sp.</i> <i>T. thiooxidans</i> , <i>Corynebacterium alkanolyticum</i>	Ácido graso Ácido graso	Grupo fosfato Grupo sulfonilo
Ácidos grasos (ác. corinomicólico, espiculisporico, etc.)	<i>Capnocytophaga sp.</i> , <i>Penicillium spiculisporum</i> , <i>Corynebacterium lepus</i> , <i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Talaromyces trachyspermus</i> , <i>Nocardia erythropolis</i>	Ácido graso	
Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Complejo de proteínas y polisacáridos aniónicos de PM aprox. 1×10^6	
Estreptofactina	<i>Streptomyces tendae</i>	Proteína hidrofóbica de alto peso molecular	

Tabla 2.2. Continuación... Clasificación y origen de diferentes biosurfactantes.

Tipo de biosurfactante	Organismos que lo producen	Parte hidrofóbica	Parte hidrofílica
Surfactantes particulados	<i>Acinetobacter</i> sp. HO1-N.	Vesículas extracelulares	
	<i>P. marginalis</i>	Células bacterianas completas	
	<i>P. maltophilia</i>	Hidrofobicidad en su superficie	
Biosur PM		Complejo de proteínas (50%) y polisacáridos (12 a 15%)	

2.3.5 Costos de biosurfactantes

Los biosurfactantes tienen propiedades para diversas aplicaciones y por criterios ecológicos pueden ser los principales productos en su campo; sin embargo, todavía se está trabajando para que sean líderes en el mercado, ya que el costo de producción de BS es un factor limitante para su elaboración a gran escala (Sekhon *et al.*, 2014). Actualmente son pocas las compañías en el mundo que producen biosurfactantes a gran escala (Tabla 2.3).

Con el fin de obtener mayores beneficios a escala comercial se requiere contar con materias primas baratas, además se debe considerar parámetros claves para hacer cualquier producto económicamente factible. La optimización de procesos, se encuentran entre los principales impulsores. El tiempo de cultivo y la reducción del costo del sustrato para la fermentación son opciones viables para producir BS económicamente rentables.

Tabla 2.3 Costo del biosurfactante por litro de solución (diluido a la CMC) basado en el cálculo de costos realizado por Connolly *et al.* (2010).

Biosurfactante	Origen	Compañía	TS (mN/m)	CMC (mg/L)	Costo (US\$/L)
BioFuture	Ramrólípido bacteriano	BioFuture Ltd. Dublín	28	800	0.03
Citrasolv	Cascara de naranja	Cleveland Biotech Ltd., Teesside	30	9000	0.01
EC601	Bacteria ramrólípida	Ecochem Ltd., Canada	29	2000	0.30
EC1800	Consorcio de bacterias	Ecochem Ltd. Canada	28	400	0.01
Petrosolv	Bacteria desconocida	Enzyme Technologies Inc., USA	34	2000	0.01
Saponin	Corteza de la planta	Sigma UK	45	1000	0.64

En el caso de los ramrólípidos, existe una presentación comercial de Sigma-Aldrich, cuyo precio de mercado es de US\$227/10 mg y otra de la compañía AGAE Technology con costo de US\$200/10 mg. Los ramrólípidos tienen aplicaciones favorables en diversos sectores y si se logra hacerlos económicamente factibles pueden ser una opción viable para el mercado de compuestos tensoactivos.

2.3.6 Microorganismos productores de biosurfactante

Existen numerosos microorganismos capaces de producir biosurfactantes utilizando diversos componentes del petróleo, así como otros compuestos más simples como única fuente de carbono o de tipo aceitoso, muchos de estos microorganismos han

sido reportados utilizando una amplia variedad de sustratos para su crecimiento y producción del BS (Tabla 2.4).

Tabla 2.4 Microorganismos productores de biosurfactante con diferentes sustratos como fuente de carbono (Banat *et al.*, 2014).

Microorganismo	Sustrato renovable utilizado	Tipo de biosurfactante
<i>Acinetobacter</i>	Fuentes renovables	Polímeros con actividad superficial
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Aceites de jabón	Expolisacárido
<i>Bacillus subtilis</i>	Melaza	Surfactina
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332; <i>B. subtilis</i> LB5	Agua del proceso de la harina de yuca	Lipopéptido
<i>B. subtilis</i>	Papa de yuca	Surfactina
<i>B. subtilis</i>	Desechos de papa	Surfactina
<i>Bacillus sp.</i>	Aceite lubricante	Lipopéptido
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	Desechos de papa	Surfactina
<i>B. subtilis</i>	Hidrolizado de turba	Surfactina
<i>B. subtilis</i> NB22	Fermentación en estado sólido	Péptido antibiótico de iturina
<i>B. subtilis</i> (bacteria recombinante)	Residuos de sólidos	Surfactina antibiótico lipopéptido
<i>B. subtilis</i> NB22 (recombinante)	Salvado de trigo	Lipopéptido-surfactina
<i>Candida antarctica</i> , <i>C. apicola</i>	Desechos de refinera de petróleo	Glicolípidos
<i>C. bombicola</i>	Grasa animal	Soforolípido
<i>C. bombicola</i> ATCC 22214	Aceite de maíz turco y miel	Soforolípidos
<i>C. lipolytica</i> 1055 and 1120	Aceite de babasú	Bioemulsificador
<i>C. bombicola</i>	Medio a base de melaza de soya	Soforolípidos
<i>C. bombicola</i> ATCC 22214	Aceite de suero y colza	Soforolípido
<i>C. bombicola</i>	Aceite de canola	Biosurfactante
<i>C. lipolytica</i>	Residuo industrial	Biosurfactante

...Continuación Tabla 2.4 Microorganismos productores de biosurfactante con diferentes sustratos como fuente de carbono.

Microorganismo	Sustrato renovable utilizado	Tipo de biosurfactante
<i>Candida sp. SY16 95 45</i>	Aceite de soya	Lípido de manosileritritol
<i>Levadura</i>	Desechos de refinería de petróleo	Glicolípidos

Entre los microorganismos más estudiados y utilizados para la producción de biosurfactantes se encuentra *Pseudomonas aeruginosa* (Mulligan, 2005; Desai y Banat 1997). En la literatura se reporta que *Pseudomonas* es una bacteria Gram-negativa, que ha cobrado un gran interés debido a que posee la capacidad de degradar eficazmente una gran cantidad de diferentes hidrocarburos, además de excretar una mezcla de biosurfactantes de tipo glicolípidos, específicamente ramnolípidos (Pacwa-Ptocińczak *et al.*, 2011; Palleroni, 1981). Este microorganismo ha sido ampliamente estudiado bajo condiciones de laboratorio. Esta bacteria produce dos formas de glicolípidos, una contiene una molécula del azúcar ramnosa (monoramnolípidos) y la otra tiene dos moléculas (diramnolípidos) (Figura 2.1), estos azúcares están ligados por un enlace glicosídico a una molécula de β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato unida a un ácido graso (ácido α -hidroxidecanoico) (Abbasi *et al.*, 2013). La molécula anfipática del ramnolípido está compuesta por dos regiones, la región hidrofílica o polar compuesta del carbohidrato (ramnosa) y la región hidrofóbica o no polar constituida de la cadena hidrocarbonada de longitud variable (ácidos grasos saturados e insaturados) (Desai & Banat, 1997).

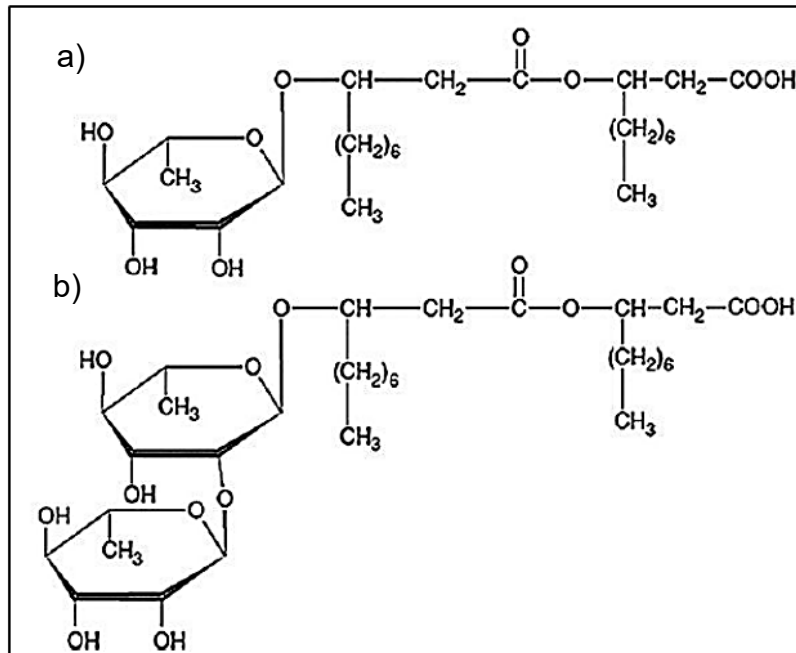


Figura 2.1 Representación molecular de mono-ramnolípidos (a) y diramnolípidos (b) producidos por *Pseudomonas aeruginosa* (Lovaglio *et al.*, 2011).

El papel de los ramnolípidos sobre *P. aeruginosa* no es claro, sin embargo, se ha mencionado, que esta bacteria usa estos biosurfactantes para solubilizar sustratos hidrofóbicos como los hidrocarburos y aceites vegetales. Otra de sus funciones es que estos biosurfactantes pueden participar en la motilidad celular y en la resistencia natural de la bacteria a metales (Ochsner *et al.*, 1994).

Por otro lado la producción de ramnolípidos se ve afectada por una gran cantidad de factores nutricionales y de cultivo (Sonali *et al.*, 2011), entre las que además destacan la fuente de nitrógeno, la relación C/N, la concentración de Fe y Mg y la temperatura de incubación (Robert *et al.*, 1991). En algunos trabajos se ha observado que la producción de ramnolípidos es estimulada bajo condiciones limitadas de nitrógeno, lo cual induce estrés celular y conlleva a una perturbación de la estructura de la membrana, con la liberación extracelular de ramnolípidos (Abbasi *et al.*, 2013). También puede inducir a la producción de BS un exceso en la

fuentes de carbono (Guerra-Santos *et al.*, 1984). Debido a esto existen estudios que se han enfocado en la optimización de medios de cultivo evaluando diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, así como niveles de concentración, con el propósito de mejorar la producción de biotensoactivos (Santa Anna *et al.*, 2002, Rashedi *et al.*, 2005). En estos trabajos se ha encontrado que la fuente de nitrógeno para incrementar la producción de BS son los nitratos. En lo referente a la fuente de carbono, se ha reportado que la producción de ramnolípidos por el género *Pseudomonas* es estimulada por diferentes tipos de sustratos insolubles, los cuales van desde hidrocarburos alifáticos y aromáticos hasta aceites de origen vegetal (Rashedi *et al.*, 2005).

Los ramnolípidos han ido ganando cada vez más popularidad como alternativas ambientales más amigables y eficientes respecto a los tensoactivos sintéticos, ya que poseen excelentes propiedades físico-químicas como son reducción de la tensión superficial del agua de 72 mN/m hasta valores dentro del rango de los 30 a 25 mN/m, la disminución de la tensión interfacial de agua/aceite que va desde los 43 mN/m hasta valores cercanos o inferiores a 1 mN/m (Nitschke *et al.*, 2005; Amani *et al.*, 2013; Abalos *et al.*, 2001). Además, estos BS presentan en estado puro una CMC que va desde 50 a 2000 mg/L, la cual depende de la composición química de las diferentes especies (Sánchez *et al.*, 2006; Mata-Sandoval *et al.*, 2001).

2.4 Factores que afectan la producción de biosurfactantes

Los principales factores que afectan la síntesis del biosurfactante pueden ser los nutricionales (fuente de carbono y nitrógeno, cationes, etc.), así como las condiciones de cultivo (temperatura, pH, agitación y disponibilidad de oxígeno y aireación). Estos parámetros interfieren en el crecimiento y actividad celular, lo cual modifica la cantidad y tipo de biosurfactante producido (Toledo *et al.*, 2008; Desai y Banat, 1997).

2.4.1 Fuente de carbono

La fuente de carbono influencia las rutas de síntesis de BS, en la mayoría de los casos, la adición de sustratos inmiscibles en agua, como alcanos y otros tipos de hidrocarburos, promueve la producción del biotensoactivo. Un efecto de la fuente de carbono en el biosurfactante producido fue observado por Robert *et al.* (1989) utilizando como fuentes de carbono glicerol, manitol, aceite de oliva, fructosa, succinato y piruvato con *P. aeruginosa* 44T1 produciendo ramnolípidos con reducciones de la tensión superficial del medio de 72 mN/m hasta 28.4 a 32.9 N/m, donde observó que el mejor sustrato fue aceite de oliva con una producción de ramnolípidos de 7.65 g/L. Otras fuentes de carbono utilizadas para la producción de biotensoactivos por *P. aeruginosa* han sido aceite de soya, n-hexadecano, aceite de maíz, efluentes de la producción de aceite de girasol y etanol entre otras (Haba *et al.*, 2000, Nitschke *et al.*, 2005). Kim *et al.* (2006) con *Candida sp.* SY16 produjo glicolípidos que reducen la tensión superficial hasta 30 mN/m al cultivarse con aceite de soya.

De las fuentes de desecho que se han utilizado para la producción de biotensoactivos destacan los que provienen de residuos agrícolas y/o industriales como desechos de procesos de destilación, sueros de la industria láctica, cáscaras de cítricos, aceites gastados de cocina, entre otros (Pacwa-Ptocińczak *et al.*, 2011). La reutilización de desechos como fuente de carbono para la producción de BS favorece un costo de producción más bajo y representa una alternativa a la problemática ambiental generada por la disposición de los mismos (Makkar y Cameotra, 2011).

Existen varios microorganismos que utilizan una amplia variedad de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía. El microorganismo *Pseudomonas* es un ejemplo de éstos, ya que tiene una gran versatilidad nutricional, por lo que es capaz de degradar una gran cantidad de compuestos orgánicos simples y complejos (Abirami *et al.*, 2015). Esta bacteria basa gran parte de su alimentación en carbono, siendo capaz de degradar rápidamente compuestos que contengan carbono, como

el aceite gastado de cocina, al someterse a un medio donde éste último sea la fuente principal de carbono (Rahman *et al.*, 2002).

2.4.1.1 Aceite gastado de cocina

Los aceites gastados de cocina (AGC) en la actualidad son una de las causas de contaminación de las aguas residuales urbanas, ya que por lo general una vez utilizados, se vierten por el drenaje, contaminando el medio ambiente, produciendo atascos y malos olores en las cañerías y una gran cantidad de problemas ambientales (Boatella *et al.*, 2000). Estos residuos hacen que la depuración de las aguas sea más costosa, además de dificultar el normal funcionamiento de las depuradoras o plantas de tratamiento. En el caso de no haber una total depuración o eliminación de estos aceites residuales, se contaminan las cuencas internas, el mar y los acuíferos, interfiriendo en la vida natural y degradando el entorno. Además, el aceite en el agua facilita la proliferación de microorganismos perjudiciales para la salud (REOIL, 2014).

Por otro lado la producción de biosurfactantes está limitada, por el costo de las fuentes de carbono que se usan como materia prima. Por lo que el uso de aceites residuales como fuente de carbono para la producción de biosurfactantes puede ser una alternativa viable, eliminando un problema ambiental y aportando un producto con valor agregado (Makkar y Banat, 2011).

2.4.2 Factores ambientales y condiciones de crecimiento.

Los factores ambientales y condiciones de crecimiento que afectan la síntesis de los biosurfactantes son temperatura, pH, agitación, disponibilidad de oxígeno y aireación. De todos estos factores, es de importancia para este estudio la evaluación de la temperatura y la cantidad de oxígeno en los sistemas de cultivo para el

desarrollo de los microorganismos. Debido a que como se mencionó anteriormente la aplicación de este tipo de tecnología va dirigida a yacimientos petroleros donde generalmente se tienen altas temperaturas y la presencia y disponibilidad de oxígeno es casi nula.

La mayoría de las investigaciones describen la producción de biosurfactantes por microorganismos en ambientes moderados, sin embargo pocos son los que estudian la producción de éstos en condiciones extremas, especialmente ambientes termofílicos, psicofílicos y halofílicos (Cameotra y Makkar, 2004). Los microorganismos extremófilos y sus metabolitos son de interés porque tienen numerosas aplicaciones industriales, médicas y ambientales.

De aquí que surja la necesidad de contar con microorganismos que sean capaces de funcionar en condiciones extremas. Sin embargo también se ha demostrado que los biosurfactantes producidos a condiciones moderadas o mesofílicas, tienen estabilidad a condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Darvishi *et al.*, 2011)

2.4.2.1 Oxígeno

El oxígeno es un requisito nutricional esencial para la mayoría de los seres vivos entre ellos los microorganismos aerobios, dada su dependencia con el proceso de respiración aeróbica para la generación de energía y para la movilización de carbono en la célula (Madigan *et al.*, 2008). Se considera que parte del sustrato consumido por el microorganismo es oxidado y convertido en CO₂, utilizando el O₂ como aceptor de electrones en la cadena respiratoria, pero también se producen otros metabolitos (Youssef *et al.*, 2007). Por lo tanto la medición del CO₂ se puede utilizar como una medida indirecta del crecimiento y de la actividad microbiana.

En algunos trabajos se ha evaluado el efecto de la aireación o anaerobiosis sobre la producción de biosurfactantes. Yakimov *et al.* (1995) analizaron la producción de biosurfactante por *Bacillus licheniformis* cultivado en condiciones aerobias y anaerobias. En comparación con el cultivo anaerobio, el cultivo aerobio se caracterizó por un mayor crecimiento del microorganismo y la tensión superficial disminuyó, alcanzando un mínimo de 28.3 mN/m. Durante las diferentes fases del crecimiento, la tensión superficial del cultivo anaerobio tuvo un comportamiento similar a la de los cultivos aerobios, pero sus valores mínimos de tensión superficial fueron de aproximadamente 35 mN/m. En otros trabajos se ha demostrado que la agitación y la aireación son parámetros importantes para el crecimiento celular y la producción de biosurfactante para la levadura *Yarrowia lipolytica*, microorganismo aerobio estricto (Cardoso *et al.*, 2010). Lo que implica que la presencia o ausencia de oxígeno en los sistemas afecta la producción de biosurfactantes dependiendo del microorganismo productor. Además, Chayabutra *et al.* (2001) determinaron que la producción de ramnolípidos a partir de *Pseudomonas aeruginosa* es mayor en condiciones aerobias que desnitrificantes, pero la biosíntesis mediante desnitrificación podría ser una ruta factible debido a la menor generación de espuma en el cultivo.

La agitación y aireación influyen en la producción de biosurfactantes (Abushady *et al.*, 2005), ya que facilitan la transferencia de oxígeno de la fase gas a la fase acuosa, para el crecimiento, la actividad celular y la producción de biosurfactantes. Esto último, también puede estar relacionado con la función fisiológica del emulsionante microbiano, ya que se ha sugerido que la producción de bioemulsionantes puede mejorar la solubilización de sustratos insolubles en agua y en consecuencia, facilitar el transporte de nutrientes para los microorganismos (Okoliegbe y Agarry, 2012).

Adamczak y Bednarski (2000) utilizando *Candida antártica* en un reactor tipo tanque agitado probaron 3 flujos de aire de 1, 2 y 4 vvm (volumen de aire por volumen de líquido por minuto) y agitación de 100 a 500 rpm. En este trabajo

observaron que la mejor producción de biosurfactante se obtenía con un flujo de aire fue de 1 vvm y la concentración de oxígeno disuelto se mantenía al 50% de saturación, obteniendo 28 g/L de BS, logrando disminuir la tensión superficial del agua hasta 35 mN/m. Sin embargo, al cambiar la tasa de flujo de aire a 2 vvm, se provocaba la formación de espuma y la producción de biosurfactante disminuía en un 84% demostrando la influencia de la aireación en la producción del BS.

2.4.3 Temperatura

La temperatura de incubación, ha mostrado un efecto importante en todas las investigaciones efectuadas sobre la producción de biosurfactantes en diversas especies bacterianas (Syidatk, 1987). Además, debe considerarse que los sistemas enzimáticos presentan una temperatura óptima en la cual se consigue un máximo rendimiento de los mismos.

La mayoría de las producciones de biosurfactante están reportadas para ser realizadas en un intervalo de temperaturas de 25-30 °C, pero para cepas como la *A. paraffineus* y *Pseudomonas sp. DSM-2874*, este intervalo de temperatura ha causado alteración en la composición del biosurfactante producido (Desai y Banat, 1997). Robert *et al.* (1991) reportaron que *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de crecer en temperaturas que abarcan desde los 26 °C hasta los 42 °C; sin embargo indican que la temperatura donde se produce mejor la formación de biosurfactante es a 37° C, mientras que la temperatura óptima de crecimiento es a 27° C. Por lo tanto, la temperatura óptima para el crecimiento de *Pseudomonas* y producción de algún metabolito de interés, no necesariamente corresponden a la misma.

En otros trabajos con este mismo microorganismo se ha observado que la producción de biosurfactantes es mejor a 30 °C (Benicasa *et al.*, 2008). Yateem *et al.* (2002) reportan que a 35 °C dos especies de *Pseudomonas* alcanzan su máximo

de crecimiento y producción de biosurfactante. En otro estudio utilizando *Pseudomonas putida*, se alcanzó la máxima concentración de biomasa y producción de biotensoactivo a pH entre 6.4 y 7.2 y temperatura entre 30 y 40 °C. Señalando que el rendimiento de BS más alto se presenta en la etapa de estado estacionario, sugiriendo que el biotensoactivo es un metabolito secundario (Pruthi y Cameotra, 2003).

Por todo lo anterior se puede observar que es necesario evaluar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y producción de biosurfactante con cada microorganismo.

2.5 Producción de biosurfactantes a nivel reactor

La producción de BS es atractiva para su aplicación en la tecnología de recuperación de petróleo vía microbiana. Es por ello que en el presente estudio se ha trabajado en llevar a cabo la producción del BS a nivel reactor.

La mayoría de los trabajos reportados sobre producción de biosurfactantes con microorganismos se han realizado en reactores tipo tanque agitado (Mercadé *et al.*, 1993; Benincasa *et al.*, 2008; Guerra-Santos *et al.*, 1984). A pesar de que este modelo de fermentador no es el más económico de instalar ni de operar, sigue siendo el más utilizado desde los últimos treinta años. La razón de su éxito reside en su gran versatilidad para ser usado a cualquier escala de producción y para un gran número de procesos sin modificaciones del diseño.

El biorreactor de tipo tanque agitado consiste en un cilindro vertical que posee varios deflectores para prevenir la formación de turbulencia durante la agitación. El aire estéril penetra por la base del reactor, a través de un distribuidor circular. El eje vertical lleva una o varias hélices en función de la relación altura/diámetro. Este tipo

de reactores permite tener homogeneidad en el sistema, tanto por la agitación como por la aireación, logrando una mezcla adecuada y buena transferencia del oxígeno del aire al microorganismo, además de contar con control de temperatura para mantener las condiciones óptimas de crecimiento.

3. ANTECEDENTES

Los biosurfactantes por sus propiedades han adquirido gran importancia y alta demanda para su aplicación en diferentes industrias. Sin embargo, para que puedan competir económicamente con tensoactivos sintéticos se necesita producirlos a bajo costo, ya sea utilizando fuentes de carbono baratas o residuales o desarrollando procesos económicos para obtener un mayor rendimiento. La optimización de las condiciones de cultivo es una tarea que debería ser investigada para lograr la máxima producción de biosurfactantes (Makar y Cameotra, 2011).

Varios autores han estudiado la producción de biosurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando sustratos comerciales y residuales a nivel reactor. En la Tabla 3.1 se muestran algunos de estos trabajos y las condiciones de cultivo a las cuales fue evaluada la producción de BS con este microorganismo

Tabla 3.1 Producción de BS a nivel reactor.

Microorganismo	Sustrato	Condiciones de crecimiento	Tiempo óptimo de producción	Parámetros evaluados	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR01	Aceite de Soya	30°C, Bioreactor Tanque agitado de 50 L, 250 a 300 rpm, 0.5 a 1 vvm	200 h	C max: 20.9 g/L	Tayebe <i>et al.</i> , 2013
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	Aceite de cacahuate	38 °C, Bioreactor de 3 L, OD 8.0 mg/L	132 h	C max: 8.6 mg/mL	Thavasi <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10-129	Glicerol	30 °C, Microbiorreactor de 1.5 mL, 400 rpm	16 h	TS 27.9 mN/m AE ₂₄ : 71.30%.	Rahaman <i>et al.</i> , 2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Aceite de girasol	37°C, Bioreactor Tanque agitado de 30 L, 150 rpm , OD: mín 5% ,0.1 L/(L min) y 3.3 L/(L min)	90 h	C max: 39 g/L	Muller <i>et al.</i> , 2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> USM-AR2	Diesel	Bioreactor de Lote Alimentado de 2.5 L, OD: 30%	48 h con intervalos de alimentación de 12 h	TS 24.4 mN/m C max: 3.13 g/L	Nur <i>et al.</i> , 2012
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> USMAR-2	Diesel	Bioreactor con sistema fraccionador de espuma de 3 L, 500 rpm, 0.5 vvm	192 h	C max: 2.93 g/L	Salwa <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PACL	Aceite de soya residual Aceite de soya nuevo	30°, Bioreactor Tanque agitado de 6 y 10 L, 550 rpm, 0.5 vvm	54 h	TS 26 mN/m C max: 3.3 g/L AE ₂₄ : 100%	De Lima <i>et al.</i> , 2008

...Continuación Tabla 3.1 Producción de BS a nivel reactor.

Microorganismo	Sustrato	Condiciones de crecimiento	Tiempo óptimo de producción	Parámetros evaluados	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	Glucosa y levadura residual	Bioreactor Tanque agitado de 1.5 L, 600 rpm, 1.2 vvm	48 h	TS 25.6 mN/m C max: 5.37 g/L AE ₂₄ : 100%	Borges et al., 2015
<i>Pseudomonas sp</i>	Efluente de aceite de oliva	30 °C, Biofermentador de 2 L, 1000 rpm, 1 vvm	150 h	C max: 1.4 g/L TS 30 mN/m AE ₂₄ : 75%	Mercadé et al., 1993
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glucosa	37 °C, Biofermentador de 5 L, 2.25 L/min, 1500 rpm	-	C max: 1.5 g/L TS 29 mN/m TI 0.25 mN/m	Guerra-Santos et al., 1984
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	Diesel	30°C, Bioreactor Tanque agitado de 3 L, 3 L aire/min, 200 rpm	54 h	C max: 15.9 g/L TS 32.9 mN/m	Benincasa et al., 2002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glucosa	33 °C, Bioreactor continuo de 50 L, 0.5 vvm a 1000 rpm, OD: 50%	-	C max: 2.25 g/L TS 30 mN/m TI 0.5 mN/m	Reiling et al., 1986
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4	Glucosa	37 °C, Bioreactor Tanque agitado Secuencial de 3 L, 0.5 vvm a 1000 rpm, OD: 50%	42 h	C max: 2.25 g/L CMC: 150mg/L TS 28-30 mN/m TI 0.5 mN/m	Pansipart et al., 2010

OD: % de oxígeno disuelto Cmax: Concentración máxima de BS obtenido TS: tensión superficial, TI: tensión interfacial, DO: oxígeno disuelto, AE₂₄: % de actividad emulsificante a las 24 h, CMC: concentración micelar crítica.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido al aumento en la demanda energética y a la gran cantidad de crudo pesado remanente en los yacimientos, sobre todo en México, es necesario el desarrollo de tecnologías que permitan su máxima recuperación. Es por ello que se ha estudiado alternativas como el uso de microorganismos (MEOR), que producen entre otras, biomoléculas con propiedades tensoactivas que pueden mejorar la recuperación de aceite pesado en los yacimientos. Para ello se requiere tener un proceso de producción de BS económicamente competitivo desarrollando bioprocesos eficientes, incluida la optimización de las condiciones de cultivo y procesos de separación rentables para la máxima producción y recuperación de los mismos.

Además, estas biomoléculas (biosurfactantes) pueden ser generadas utilizando aceites de desecho, disminuyendo costos de la fuente de carbono y generando productos más ecológicos.

En el Instituto Mexicano del Petróleo se ha desarrollado y se sigue trabajando con la línea de investigación referente a microorganismos productores de biosurfactantes (Roldán *et al.*, 2011), donde se ha utilizado a la cepa IMP-K, que corresponde a una *Pseudomonas sp.*

Durante este proyecto se evaluó la producción de un biosurfactante con la cepa IMP-K, a nivel matraz, posteriormente, se escaló su producción a nivel reactor utilizando dos tipos de sustratos, un aceite vegetal nuevo correspondiente a aceite de soya (AS) y otro de tipo residual, aceite gastado de cocina (AGC).

5. HIPÓTESIS

- La cepa IMP-K es capaz de producir biosurfactante utilizando como fuente de carbono aceite de soya nuevo y aceite gastado de cocina.
- La aireación afecta la producción de biosurfactantes a nivel reactor.

6. OBJETIVOS

6.1 General

Evaluar la capacidad de producción de biosurfactante con un microorganismo, utilizando dos tipos de sustratos, uno convencional “aceite nuevo de cocina” que corresponde a “aceite de soya (AS)” y otro residual “aceite gastado de cocina (AGC)” a nivel reactor.

6.2 Particulares

- Evaluar la capacidad productora de biosurfactante con la cepa IMP-K en matraz utilizando dos sustratos (aceite vegetal y aceite residual)
- Evaluar el efecto de la temperatura y nivel de oxígeno en el crecimiento y la capacidad productora de biosurfactante con la cepa IMP-K.
- Evaluar el efecto del biosurfactante producido con la cepa IMP-K sobre un aceite mediante tensión interfacial a diferentes temperaturas y salinidades.
- Determinar el efecto de la aireación para la producción de biosurfactante con el microorganismo a nivel reactor
- Determinar para el mejor tiempo de producción mediante la actividad tensoactiva del biosurfactante producido por la cepa IMP-K a nivel reactor utilizando dos sustratos.
- Determinar la concentración micelar crítica y concentración del biosurfactante producido.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la figura 7.1 se presenta la estrategia experimental para evaluar la producción de biosurfactante con un microorganismo.

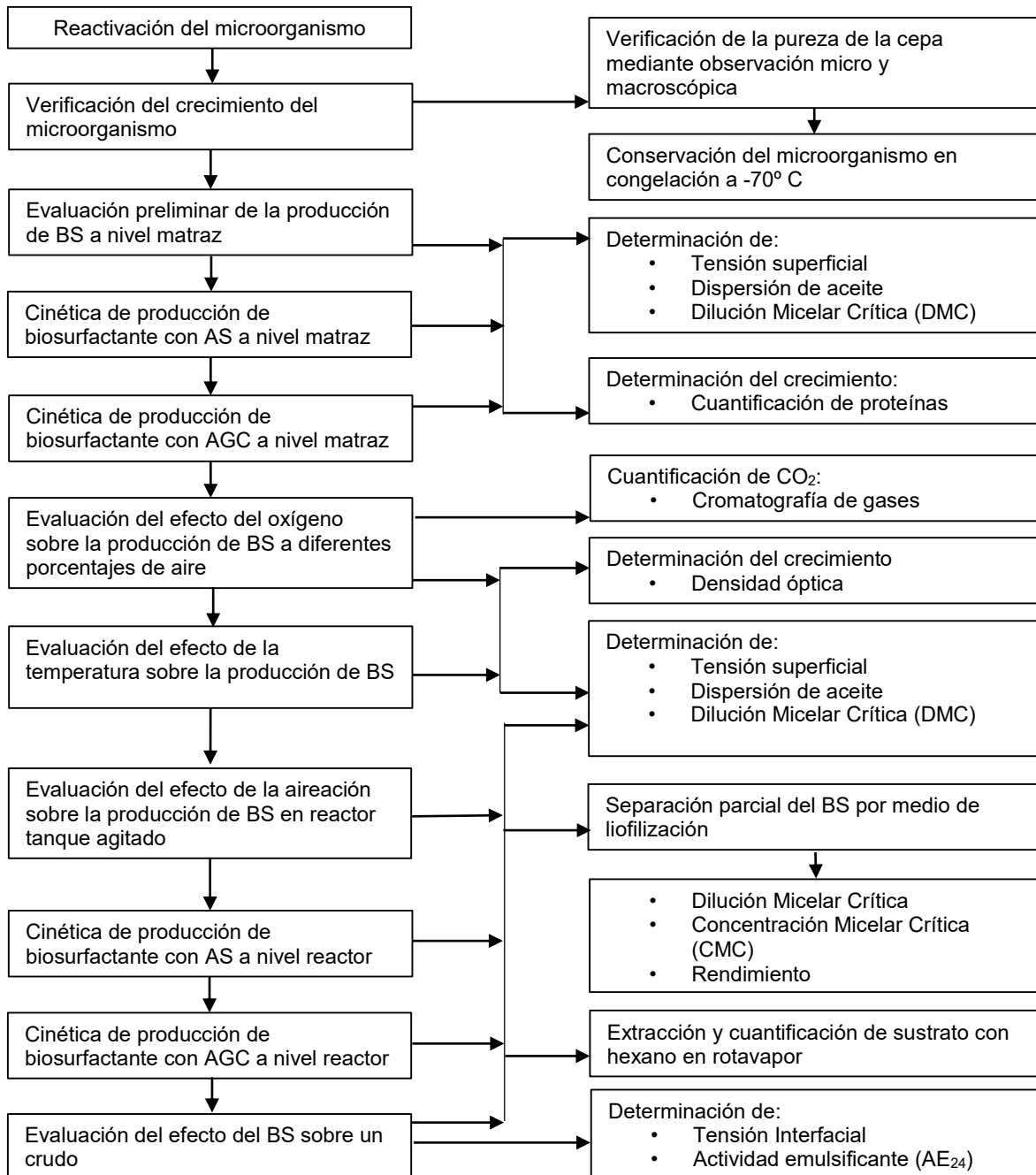


Figura 7.1 Diagrama de la estrategia experimental para evaluar la producción de un biosurfactante. AS: aceite nuevo de soya; AGC: aceite gastado de cocina.

8. METODOLOGÍA

8.1 Microorganismo

El microorganismo que se utilizó en este trabajo fue la cepa IMP-K, que corresponde a una *Pseudomonas sp.*, proveniente de una colección microbiana. Este microorganismo ha sido reportado como potencial productor de biosurfactantes (Abbasi *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2013; Kaskatepe *et al.*, 2016).

8.1.1 Reactivación del microorganismo

La reactivación del microorganismo se realizó en medio líquido con caldo nutritivo (CN). Los sistemas consistieron de matraces de 125 mL que contenían 50 mL de medio de cultivo. Estos sistemas fueron inoculados con la cepa IMP-K.

En la primera siembra, el inóculo fue a partir de la cepa conservada en viales en congelación a -70°C con glicerol. A partir de estos cultivos se realizó una segunda resiembra a las 24 h, en la cual se tomó 1 mL de los cultivos anteriores y se pasó a un matraz con medio fresco. El mismo proceso se repitió a las 24 horas siguientes. Los sistemas fueron incubados a 30°C y 150 rpm.

8.1.2 Caracterización macroscópica y microscópica

Para la evaluación macroscópica el microorganismo seleccionado se creció en cajas Petri con agar nutritivo y a partir de este cultivo se observaron las colonias formadas, evaluando la forma, coloración, elevación y consistencia.

A partir de una colonia del microorganismo se llevó a cabo una evaluación microscópica en fresco y con tinción de Gram (Anexo 1), y de cultivos en medio

líquido, observando las preparaciones en el microscopio óptico Nikon E-800 y de forma directa en contraste de fases, en ambos casos utilizando el objetivo de 100X.

8.2 Evaluación preliminar de la producción de BS

Con la cepa IMP-K se llevó a cabo una evaluación preliminar para conocer el comportamiento del crecimiento y de la producción de biosurfactante en matraz. Con base en la bibliografía y producción en trabajos previos de la línea de investigación MEOR dentro del Instituto Mexicano del Petróleo, se seleccionaron dos fuentes de carbono para evaluar la producción del biosurfactante. Las fuentes de carbono fueron: aceite de soya nuevo (AS) y aceite gastado de cocina (AGC), el cual fue obtenido de un restaurante.

La evaluación preliminar de la producción de biosurfactante con el microorganismo IMP-K se llevó a cabo en matraces de 150 mL con 50 mL de medio mineral (Tabla 8.1 y 8.2) y 15 mL/L de la fuente de carbono (aceite soya nuevo o aceite gastado de cocina), además de 2.5 mL de inóculo. Estos sistemas fueron incubados a 30 °C y 150 rpm durante 72 h. La evaluación de la producción de biosurfactante se realizó a las 0, 24, 48 y 72 h por triplicado, utilizando el sobrenadante libre de células, mediante las técnicas de dispersión de aceite y tensión superficial (Secciones 8.10.2.2 y 8.10.2.3). El crecimiento se evaluó por cuantificación de proteínas (Sección 8.10.1.2). Cada sistema y medición se realizaron por triplicado.

Tabla 8.1 Medio de cultivo para la producción de biosurfactante con la cepa IMP-K.

Componente	Concentración (g/L)
NaNO ₃	4
K ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
KCl	0.1
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01
CaCl ₂	0.01
Extracto de levadura	0.01
Elementos traza en solución	0.05 mL/L

Tabla 8.2 Composición de la solución de elementos traza.

Componente	Concentración (g/L)
H ₃ BO ₃	0.26
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.5
MnSO ₄ .H ₂ O	0.5
MoNa ₂ O ₄ .2H ₂ O	0.06
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.72

8.3 Cinéticas de crecimiento y producción de biosurfactante

Se llevó a cabo dos cinéticas de crecimiento y producción de biosurfactante a nivel matraz utilizando aceite nuevo de soya (AS) para la primera cinética y aceite gastado de cocina (AGC) para la segunda. La producción de BS fue evaluada

mediante las variables de dispersión de aceite, tensión superficial y dilución micelar crítica (DMC) (Sección 8.10.2.2, 8.10.2.3 y 8.10.2.5, respectivamente). El crecimiento del microorganismo se determinó por cuantificación de proteínas (Sección 8.10.1.2).

Para ambas cinéticas, los sistemas consistieron de matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio de cultivo y fueron adicionados con 15 mL/L del sustrato correspondiente. Estos sistemas se inocularon con las condiciones como se describe en la Sección 8.2. El muestreo se realizó desde el tiempo 0 y hasta las 77 horas, a diferentes intervalos de tiempo. En cada muestreo se evaluaron 3 réplicas.

8.4 Evaluación de diferentes parámetros para la producción de biosurfactante

8.4.1 Evaluación del efecto de la concentración de oxígeno sobre el crecimiento y producción de biosurfactante

Una vez verificado el crecimiento y producción de biosurfactante con ambos sustratos, se buscó determinar el efecto de ciertos parámetros que afectan la producción de BS. Para realizar lo anterior primero se evaluó la producción del BS por la cepa IMP-K variando la concentración de aire en sistemas cerrados, donde se realizó el intercambio de atmósfera antes de iniciar su cultivo e incubación, de tal manera que se tuvieran diferentes proporciones de oxígeno.

El experimento estuvo conformado por cuatro tratamientos, los cuales se realizaron en frascos serológicos de 125 mL conteniendo 50 mL del medio mineral descrito en la Tabla 8.1 y con AS como sustrato, tapados y sellados en condiciones estériles y con las 4 concentraciones de aire mostradas en la Tabla 8.3. Para lograr los porcentajes de aire se realizó un intercambio de atmósferas con nitrógeno y posteriormente con la adición de aire estéril. El microorganismo se incubó bajo las

mismas condiciones utilizadas en matraz (30°C y 150 rpm). Los tratamientos se realizaron por triplicado y cada uno con dos respectivos controles sin inocular.

Los tiempos evaluados fueron 0, 24, 48, 72 y 168 h. De la atmosfera de los sistemas se midió la concentración de CO₂ en el cromatógrafo de gases Gow Mac, con detector de conductividad térmica y helio como gas acarreador. De la fase acuosa se midió directamente la densidad óptica (DO) a 620 nm para determinar la biomasa (Sección 8.10.1.1). Para evaluar la producción de BS se utilizó el sobrenadante libre de células, al cual se le midió la dispersión de aceite (DA) y la tensión superficial (TS), como se indica en las secciones Sección 8.10.2.2 y 8.10.2.3, respectivamente. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Tabla 8.3 Sistemas con diferentes atmósferas para evaluar el efecto del oxígeno sobre el crecimiento y producción de biosurfactante con la cepa IMP-K.

Sistema	Aire* (%)	O ₂ (%)	N ₂ * (%)
1	0	0	100
2	25	6.7	93.3
3	50	9.7	90.3
4	100	21	79

*Se debe adicionar con jeringa, pero previo sacar el mismo volumen a adicionar, en condiciones estériles.

8.4.2 Evaluación del efecto de la temperatura sobre el crecimiento y producción de biosurfactante

Los microorganismos pueden crecer y desarrollarse en un intervalo de temperaturas, pero generalmente tienen una temperatura óptima para su crecimiento o bien para la producción de algún metabolito de interés, que no necesariamente corresponden a la misma.

En este experimento se llevó a cabo la evaluación de la influencia de la temperatura sobre el crecimiento y producción de biosurfactante con la cepa IMP-K. Se evaluaron tres temperaturas de incubación, 30, 40 y 50 °C. Los sistemas consistieron de matraces de 250 mL con 100 mL de medio mineral y aceite de soya como fuente de carbono, los cuales se colocaron en una incubadora orbital con agitación de 150 rpm, a la temperatura correspondiente a evaluar.

Cada sistema se realizó por triplicado y con sus respectivos controles sin inocular. Se tomaron muestreos cada 24 horas, desde el tiempo 0 y hasta las 72 h, para evaluar el crecimiento por densidad óptica (Sección 8.10.1.1) y con el sobrenadante del cultivo libre de células (Sección 8.10.2.1) se determinó la dispersión de aceite (Sección 8.10.2.2) y la tensión superficial (Sección 8.10.2.3), las cuales sirvieron para evaluar la producción de biosurfactante.

8.5 Evaluación del efecto del biosurfactante sobre un aceite crudo

Una de las características más relevantes que presentan los biosurfactantes es su capacidad de reducir la tensión que existe entre las interfases agua y aceite (Amani, 2010) que se traduce en la disminución de las fuerzas capilares, promoviendo el aumento de la movilidad y la liberación del petróleo residual de los yacimientos (Bryant y Lockhart, 2002). Esta capacidad se evaluó como disminución de la tensión interfacial (TI) que provoca el biosurfactante producido por la cepa IMP-K sobre un aceite crudo proveniente de un yacimiento. Además, de evaluar la actividad emulsificante (AE_{24}) que provoca el biosurfactante sobre el hidrocarburo.

La determinación de la TI se realizó con la técnica de la gota pendiente en el equipo DSA (Drope Shape Analysis) marca Krüss (Sección 8.10.2.4). El aceite utilizado correspondía a un hidrocarburo pesado (Tabla 8.4). Considerando que la temperatura del yacimiento de donde proviene este aceite es de 60° C y con una

salinidad de 50,000 mg/L (reportada en base a NaCl), la evaluación de la TI y AE₂₄ se realizó a dos temperaturas (30 y 60° C) y dos salinidades (sin sal y 50,000 mg/L de NaCl), combinando estos dos parámetros (Tabla 8.5) Para llevar a cabo estas mediciones de estos parámetros se utilizó el sobrenadante libre de células. El sobrenadante de la cepa IMP-K presenta una alta turbiedad ocasionada por los componentes presentes, entre ellos el biosurfactante, el sustrato residual y probablemente un biopolímero que se forma. Esta turbiedad trató de disminuirse centrifugando varias veces el sobrenadante y filtrándolo para poder medir la tensión interfacial que produce el biosurfactante de la cepa IMP-K. Cada determinación se realizó por triplicado con sus respectivos controles.

Tabla 8.4 Aceite utilizado en la evaluación de la tensión interfacial y sus características.

Parámetro	Valor
Densidad a 30° C (g/cm ³)	0.95
Densidad a 60° C (g/cm ³)	0.93
Viscosidad a 30° C (mPa.s)	1799
Viscosidad a 60° C (mPa.s)	236
Gravedad API	14.85

Tabla 8.5 Sistemas donde se evaluó el efecto del biosurfactante producido por la cepa IMP-K sobre un aceite a diferentes condiciones.

Sistema	Temperatura (°C)		Salinidad (mg/L NaCl)	
	30	60	0	50,000
1	✓		✓	
2		✓	✓	
3	✓			✓
4		✓		✓

La actividad emulsificante (AE_{24}) se llevó a cabo siguiendo la técnica de Pruthi y Cameotra (1997); se agregó en un tubo de ensayo 3 mL del sobrenadante (biosurfactante) y 3 mL del aceite crudo, se agitó en vórtex durante 2 min y se dejó reposar 24 h. Se contó con los mismos sistemas indicados en la Tabla 8.1, los cuales fueron incubados a la temperatura indicada. Después de 24 h de incubación, con una regla se midió el tamaño de la emulsión y se calculó como se indica en la ecuación 8.1. Las mediciones se realizaron a las condiciones descritas en la tabla 8.5 utilizando el biosurfactante (sobrenadante) producido por la cepa IMP-K y un aceite crudo pesado (Tabla 8.4).

$$AE_{24} = \frac{E_f}{H_t} * 100 \quad (\text{Ec. 8.1})$$

Donde:

AE_{24} : Actividad emulsificante a las 24 h en %.

E_f : Altura de la emulsión formada.

H_t : Altura total.

8.5.1 Evaluación del el efecto de la aireación sobre el crecimiento y la producción de biosurfactante a nivel reactor

Después de haber corroborado la capacidad productora de BS de la cepa IMP-K y considerando las mejores condiciones de cultivo para este microorganismo (tipo y concentración de sustrato, fuente de nitrógeno y otros nutrientes, % de inóculo, agitación, % de oxígeno y temperatura, etc.) establecidos en trabajos previos en el mismo proyecto, se llevó a cabo la producción de BS a nivel reactor.

Uno de los parámetros más importantes sobre las condiciones de cultivo de los microorganismos, como ya se mencionó previamente, es el efecto que la aireación tiene sobre éstos, que también influye en la producción del BS (Abushady *et al.*, 2005). Al escalar el sistema en reactor tanque agitado, es diferente a un sistema

matraz, ya que en el reactor la aireación se puede realizar a través de una bomba de aire eléctrica de flujo continuo, por lo que se vuelve necesario determinar el mejor flujo de aire para obtener la mejor producción del BS.

En esta etapa se llevó a cabo la evaluación del crecimiento y la producción de biosurfactante en un reactor de tanque agitado de 3 L (Fig. 8.1) donde se evaluaron 4 flujos de aire (400, 700, 100 y 1500 mL/min) correspondientes a 0.33, 0.58, 0.83 y 1.25 vvm (volumen de aire/ volumen de medio de cultivo/ min)

El volumen de operación del reactor fue de 1.2 L, con una agitación de 150 rpm y temperatura de cultivo de 30 °C. El sustrato utilizado fue aceite de soya a una concentración de 15 mL/L y con el medio mineral reportado anteriormente (Sección 8.2). Los reactores se inocularon con el 5% de inóculo. La temperatura y agitación se mantuvieron controladas durante todo el tiempo de experimentación.

Los cultivos con cada aireación se mantuvieron durante 96 h, periodo en el cual se llevaron a cabo muestreos a las 0, 24, 48, 72 y 96. Con estas muestras se realizó la evaluación del crecimiento microbiano mediante la cuantificación de proteínas (Sección 8.10.1.2) y la producción de biosurfactante con las pruebas de DA, TS y DMC (Sección 8.10.2.2 y 8.10.2.3 y 8.10.2.5). Cada determinación se realizó por triplicado. Además de las técnicas evaluadas se siguió la evaluación de pH y concentración de oxígeno a lo largo del periodo de incubación.

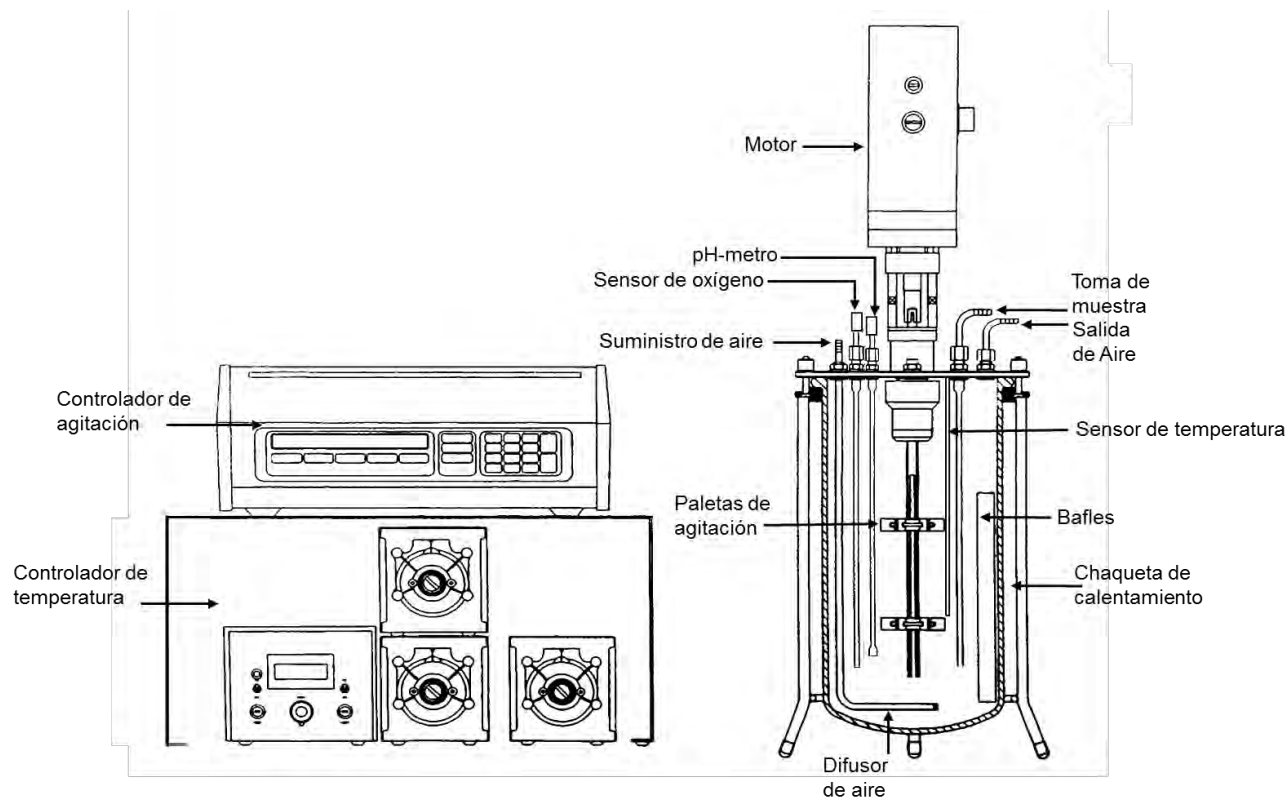


Figura 8.1 Reactor tanque agitado y controlador para el cultivo de la cepa IMP-K, donde se evaluó su crecimiento y producción de biosurfactante.

8.6 Separación parcial del biosurfactante y rendimiento

Finalizado el periodo de incubación, el caldo de cultivo fue procesado para obtener el sobrenadante libre de células, sobre el que se llevó a cabo la separación parcial del biosurfactante por liofilización. Se seleccionaron los mejores tiempos de producción para cada uno de los tratamientos del reactor a diferentes aireaciones. Para la separación se utilizó una liofilizadora marca Labconco. Se depositaron 20 mL de muestra en frascos especiales, estos fueron congelados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posteriormente ser procesados en la liofilizadora (Figura 8.2). Durante la liofilización se eliminó el agua de la muestra por sublimación, mediante la manipulación de la

presión y temperatura. Este proceso duró aproximadamente tres días y una vez recolectado el producto se colocó en una estufa a 40 °C, hasta peso constante, para asegurar que la muestra estuviera completamente libre de agua.



Figura 8.2 Liofilizadora marca Labconco.

El sólido resultante (biosurfactante crudo) fue pesado para obtener el rendimiento como producto crudo. El producto obtenido se resuspendió en agua a diferentes concentraciones y se le evaluó su actividad tensoactiva mediante tensión superficial como se indica en la sección 8.10.2.2 y con este resultado se determinó la concentración micelar crítica (CMC) (sección 8.10.2.5). Cada medición se realizó por triplicado.

8.7 Cinética de crecimiento y producción de biosurfactante en reactor

Con la mejor aireación evaluada, se procedió a realizar una cinética con aceite de soya (AS) como fuente de carbono y después se realizó otra con aceite gastado de cocina (AGC), con la finalidad de determinar el mejor tiempo de producción y rendimiento del biosurfactante producido, así como el efecto del sustrato.

De la misma manera que en los experimentos anteriores, la producción de BS se cuantificó mediante tensión superficial, dispersión de aceite y dilución micelar crítica (DMC). El crecimiento bacteriano fue evaluado mediante cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Sección 8.10.1.2).

Posteriormente el biosurfactante, evaluado como producto crudo, fue separado del sobrenadante por liofilización (Fig. 8.3) como se indicó en la sección 8.6. Las muestras liofilizadas correspondían a los tiempos 0, 24, 48, 56 y 72 h para la cinética con AS; y 0, 24, 48, 69 h para la cinética con AGC. Al producto crudo (polvo) se le determinó su concentración micelar crítica (CMC). Cada medición se realizó por triplicado.

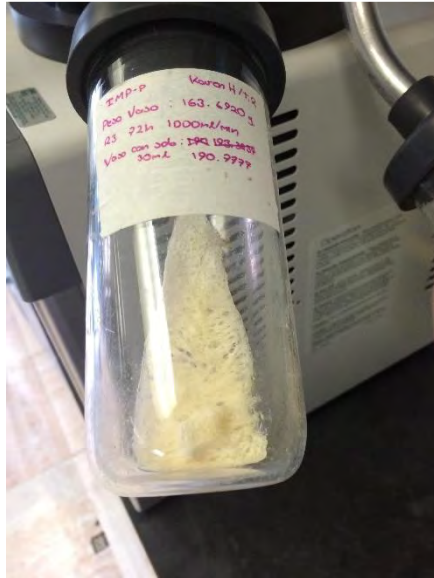


Figura 8.3 Liofilizado obtenido de reactor con 1000 mL/min de aireación y aceite de soya como sustrato.

Durante los cultivos de crecimiento y producción de BS con la cepa IMP-K hubo formación de espuma, por lo que parte de la espuma formada durante el experimento se recolectó mediante una manguera conectada a un envase cerrado a través de la salida de aire del reactor a la cual posteriormente se le midió tensión superficial (Fig. 8.4).

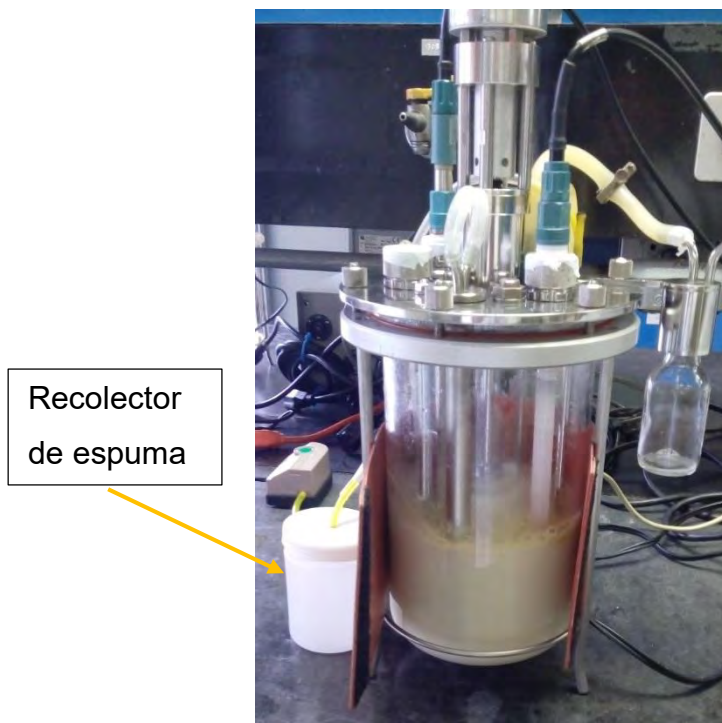


Figura 8.4 Reactor con sistema de control y recolección de espuma

8.8 Cuantificación del sustrato residual

Para cuantificar el sustrato residual en las cinéticas en reactor, se realizó una extracción líquido-líquido con hexano. Se tomó una muestra del cultivo de 15 mL y se lavó 3 veces con un volumen igual de hexano. Posteriormente, la fase orgánica fue colocada en el rotavapor a 220 mmHg y 50°C, para eliminar el solvente y por diferencia de pesos se estimó la cantidad de sustrato residual.

8.9 Evaluación de la efectividad del BS después de su almacenamiento

Al BS producido a nivel reactor contenido en el sobrenadante, se le evaluó su efectividad (actividad tensoactiva) mediante la determinación de tensión superficial, después de 8 meses en conservación a 4°C.

8.10 Técnicas analíticas

8.10.1 Cuantificación de biomasa

El crecimiento microbiano se evaluó mediante dos métodos, midiendo la densidad óptica directamente del cultivo y cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

8.10.1.1 Densidad Óptica

Este análisis se realizó en un espectrofotómetro marca Thermo Modelo Biomate 3S, mediante la densidad óptica a 620 nm evaluada directamente de los cultivos microbianos.

8.10.1.2 Determinación de Proteínas

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford (1976) a partir del botón celular obtenido de los cultivos. El caldo de los cultivo se centrifugó durante 10 minutos y 10,000 rpm, el sobrenadante con el biosurfactante se separó y el botón celular se resuspendió en solución salina al 0.85% para su análisis.

El método de Bradford se basa en la unión de un colorante (Coomassie Azul G-250) a las proteínas. Para cuantificar las proteínas primero se realizó una curva patrón con albúmina de huevo (Anexo 2) y el reactivo de Coomassie, y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro marca Thermo, modelo Biomate 3S. Cada concentración se realizó por triplicado. Con las muestras a evaluar, se realizó previamente una hidrólisis con NaOH y calentamiento a ebullición, posteriormente se adicionó el reactivo de Coomassie y se evaluó igual que en la curva patrón.

8.10.2 Evaluación de la producción de biosurfactante

La evaluación de la producción de BS se llevó a cabo con la determinación de la actividad tensoactiva que produce esta biomolécula (dispersión de aceite, tensión superficial y tensión interfacial) para determinar si un microorganismo es potencial productor de biosurfactante (Plaza *et al.*, 2006). Pero, primero hay que separar el sobrenadante conteniendo el BS de la biomasa (Sección 8.10.2.1).

8.10.2.1 Preparación de la muestra para análisis

De cada cultivo a muestrear se tomaron 25 mL y se colocaron en tubos Falcón de 50 mL, estas muestras se centrifugaron a 10,000 rpm a una temperatura de 4°C durante 10 min. El sobrenadante libre de células se separó y con este se evaluó la producción de BS.

8.10.2.2 Prueba de la dispersión de aceite

Esta prueba es un método rápido y sencillo que consiste en la evaluación del efecto de una sustancia sobre la dispersión de un aceite. Basada en la modificación de la tensión superficial que provoca el biosurfactante aplicado sobre una superficie con

una capa de aceite sobre agua (Anandaraj y Thivakaran, 2010; Cardoso *et al.*, 2010).

La técnica consiste en colocar 70 mL de agua destilada en una caja Petri, adicionando posteriormente una gota del hidrocarburo sobre el agua para formar una capa delgada del aceite. Después se agrega 25 μ L del sobrenadante que contiene biosurfactante y al término de 1 min se mide el diámetro de la zona clara que se produce (Fig. 8.5). Cada medición se realizó por triplicado.

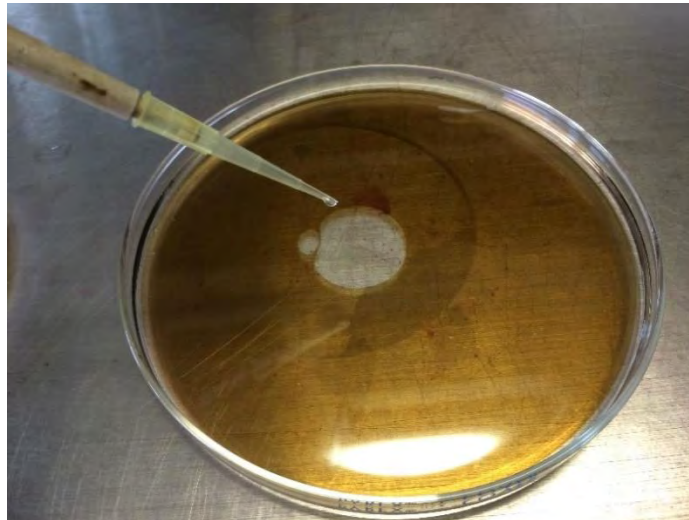


Figura 8.5 Dispersión de aceite provocado por efecto del biosurfactante.

8.10.2.3 Tensión superficial (TS)

Para saber si un microorganismo produce biosurfactante también se puede medir la tensión superficial del medio de cultivo en el cual se espera que se produzca (Batista *et al.*, 2006). Si la tensión superficial del medio disminuye respecto a la tensión del medio sin inocular, es indicativo de que el microorganismo produjo agentes biotensoactivos.

El análisis de tensión superficial se realizó mediante el método de la placa de Wilhelmy, el cual se basa en una placa de geometría rectangular suspendida verticalmente en una balanza de precisión. El lado inferior de la placa se pone en contacto con la superficie de la muestra para que se moje. Después, se ejerce una fuerza vertical sobre la placa para levantarla. La placa es levantada poco a poco, y de cada lado se forma una interfase curva, hasta que se produce la separación de la placa del líquido donde está contenida. En la posición justo antes de la separación se puede calcular el equilibrio de fuerzas entre las fuerzas de tensión que se aplican de parte de la placa y la fuerza de levantamiento (Youssef *et al.*, 2007). La fuerza máxima vertical es directamente proporcional a la tensión superficial y es medida como un peso en una balanza.

Para verificar el buen funcionamiento del tensiómetro se midió la tensión superficial del agua, reportada en 72 mN/m a 20 °C (Shaw, 1992). Todas las muestras fueron medidas en un tensiómetro Krüss modelo K-100 (Fig. 8.6) por triplicado a temperatura de 25 °C.



Figura 8.6 Tensiómetro Krüss, modelo K100.

8.10.2.4 Tensión interfacial (TI)

Otra técnica para evaluar el efecto del biosurfactante producido por un microorganismo sobre un aceite crudo se llevó a cabo mediante la determinación de la tensión interfacial (TI). Esta determinación se realizó con la técnica de la gota pendiente en un equipo DSA (Drope Shape Analysis) marca Krüss, que consiste en un sistema óptico que analiza por imagenología la gota que se forma del aceite en presencia de una fase acuosa que contiene el producto a evaluar, en el cual se sumerge la aguja que dosifica el aceite crudo. Esta determinación está asociada a la densidad de las fases y al tamaño de las gotas de aceite obtenidas según los fluidos utilizados. Durante esta medición se obtienen los valores de las fuerzas que hay entre los fluidos, en este caso la TI. Para la medición se utilizó como fase acuosa el sobrenadante libre de células, conteniendo el biosurfactante de la cepa IMP-K, con su respectivo control sin el biosurfactante.

8.10.2.5 Dilución Micelar Crítica (DMC) y Concentración Micelar Crítica (CMC)

En un ambiente acuoso, los tensoactivos forman estructuras agregadas llamados micelas en la que las colas hidrófobas de las moléculas están protegidas del contacto con agua. Los agregados se forman para minimizar la energía libre de la solución y esto depende de las condiciones físicas como la temperatura. La concentración micelar crítica (CMC) se define como la concentración de surfactante por encima de la cual se forman micelas. Por debajo de la CMC, la tensión superficial en sistemas acuosos cae desde un valor máximo de 72 mN/m para el agua pura a un valor mínimo posible de aproximadamente 29 mN/m para los mejores surfactantes (Santos *et al.*, 2016). Una vez que la CMC se alcanza, la tensión superficial permanece más o menos constante.

La formación de micelas mixtas entre surfactantes y otros compuestos hidrofóbicos como los hidrocarburos favorecen la dispersión del mismo en medio acuoso aumentando la biodisponibilidad y por consiguiente la posibilidad de degradación.

Durante la determinación de la CMC se debe contar con el biosurfactante purificado o separado del sistema donde se produce. Sin embargo, otra forma de evaluar que la concentración de biosurfactante está cambiando en el sistema donde se produce, es determinando la dilución micelar crítica (DMC) sobre el sobrenadante libre de células del cultivo del microorganismo. Para determinar la DMC el sobrenadante (conteniendo el biosurfactante) se evaluó mediante tensión superficial, de manera directa y realizando diluciones sucesivas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, etc.) hasta encontrar la dilución en donde ocurre cambio significativo de la tensión superficial y con esto determinar la dilución máxima donde la TS permanece sin cambios, es decir la DMC. Cada muestra se realizó por triplicado.

9. REASULTADOS

9.1 Caracterización de la cepa IMP-K

La evaluación microscópica y macroscópica de la cepa IMP-K permitió determinar algunas de sus características. La caracterización macroscópica de la cepa IMP-K se realizó sobre agar nutritivo en caja Petri (Fig. 9.1), donde se observó el crecimiento y morfología colonial con consistencia húmeda, de forma circular y color crema. En la Tabla 9.1 se muestran las características macroscópicas de la cepa IMP-K.



Figura 9.1 Cepa IMP-K cultivada en agar nutritivo a 30 °C.

Tabla 9.1 Caracterización macroscópica de la cepa IMP-K cultivada en agar nutritivo a 30° C.

Morfología	Cepa IMP-K
Forma	Circular
Elevación	Elevada
Borde	Entero
Color	Crema
Superficie	Lisa
Aspecto	Húmedo
Consistencia	Suave
Luz reflejada	Brillante

Con la evaluación microscópica de la cepa IMP-K se pudo apreciar que este microorganismo estaba puro, ya que presentó una sola morfología, correspondiente a bacilos, cuando se observó en fresco con microscopio de contraste de fases (Fig. 9.2). Además, con tinción de Gram, la observación microscópica corroboró que se trata de bacilos Gram negativos (Fig. 9.3).

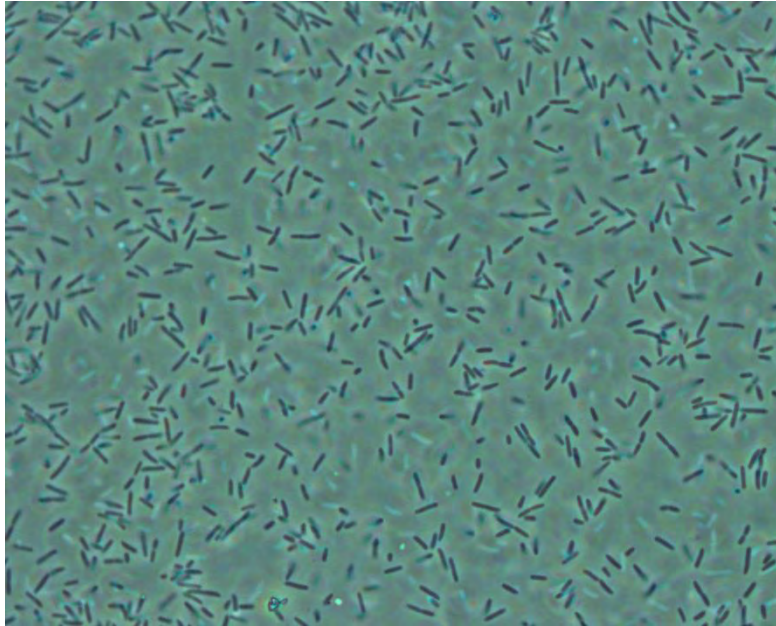


Figura 9.2 Observación microscópica en fresco de la cepa IMP-K, cultivada en caldo nutritivo a las 24 h de incubación, en microscopio de contraste de fases a 100X.

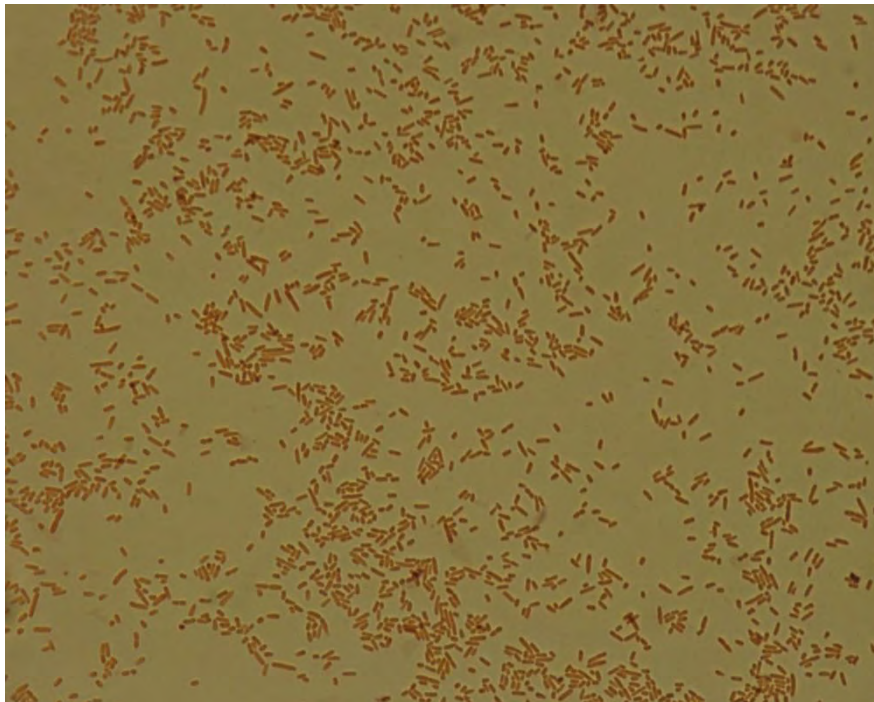


Figura 9.3 Observación microscópica de la cepa IMP-K en caldo nutritivo a las 24 h, con Tinción de Gram en microscopio óptico a 100X.

9.2 Evaluación preliminar de la producción de biosurfactante

Para la evaluación preliminar de la producción de biosurfactantes con la cepa IMP-K se utilizaron aceite de soya y aceite gastado de cocina como sustratos. En la figura 9.4 se observa el crecimiento gradual del microorganismo hasta las 72 h cuando fue cultivado con aceite de soya. La turbiedad del medio de cultivo fue indicativa del crecimiento microbiano.



Figura 9.4 Cultivos de la cepa IMP-K en medio mineral y aceite de soya como sustrato a diferentes tiempos de incubación.

En cuanto al crecimiento microbiano (Fig. 9.5) durante la producción de biosurfactante, se observó que la cepa IMP-K cultivada en aceite de soya, alcanzó un máximo crecimiento a las 48 h y después de este tiempo se presentó la fase estacionaria. Mientras que con el aceite gastado de cocina, el crecimiento de la cepa IMP-K fue mayor, observándose un crecimiento exponencial hasta las 72 h. Los resultados muestran que para el aceite de soya la producción de biomasa fue menor que con el aceite gastado de cocina. En este último sustrato se requiere dejar más tiempo de cultivo, para observar la curva de crecimiento del microorganismo.

Al evaluar las constantes cinéticas de la cepa IMP-K se observó un comportamiento diferente en ambos sustratos. Con aceite de soya el microorganismo presentó una velocidad de crecimiento (μ) de 0.0989 h^{-1} , con un tiempo de duplicación (t_d) de 7 h; mientras que con aceite gastado de cocina tuvo una velocidad de crecimiento de (μ) 0.1521 h^{-1} con un tiempo de duplicación (t_d) de 4.56 h. Lo cual indica que la cepa IMP-K tiene un crecimiento más rápido en aceite gastado de cocina.

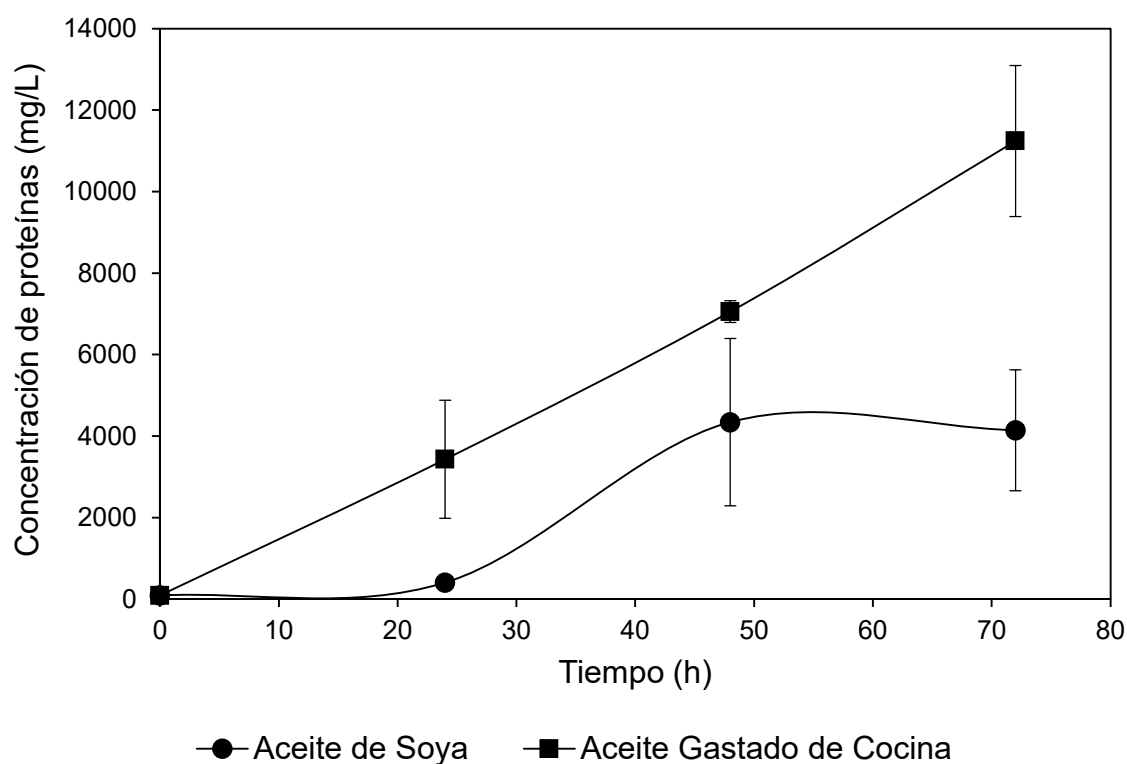


Figura 9.5 Evaluación del crecimiento de la cepa IMP-K, mediante la cuantificación de proteína, cultivada con aceite de soya y aceite gastado de cocina como fuentes de carbono a nivel matraz

La producción de biosurfactante fue evaluada mediante las técnicas de dispersión de aceite y tensión superficial. Estas técnicas además de ser sencillas son

ampliamente utilizadas para evidenciar la actividad tensoactiva de los biosurfactantes por diversos microorganismos (Plaza, *et al.*, 2006).

Los resultados de la prueba de dispersión de aceite se muestran en la figura 9.6 donde se observa que la cepa IMP-K, es un microorganismo potencial productor de biosurfactantes, ya que dio positiva la prueba de dispersión de aceite desde las 24 h, con ambos sustratos, alcanzando un halo de dispersión de 10.5 cm para el aceite de soya y de 12.4 cm para el aceite gastado de cocina. Dicha producción se mantuvo estable de las 24 hasta las 72 horas.

Aunque con ambos sustratos, el incremento de la dispersión de aceite fue positivo, el aceite gastado de cocina incrementó en un 18% más la dispersión. Lo que significa que la cepa IMP-K prefirió este sustrato para la producción de biosurfactante.

En un estudio realizado por Abirami *et al.* (2015), utilizando *Pseudomonas aeruginosa* con diésel como sustrato para la producción de BS, después de 72 h de incubación el BS produjo 5 cm de halo de dispersión utilizando para esta técnica aceite de oliva. Comparando este trabajo con los resultados obtenidos, se puede observar que la cepa IMP.K produce un BS con mejor actividad tensoactiva en cuanto a dispersión (12.4 cm) realizada con un aceite pesado.

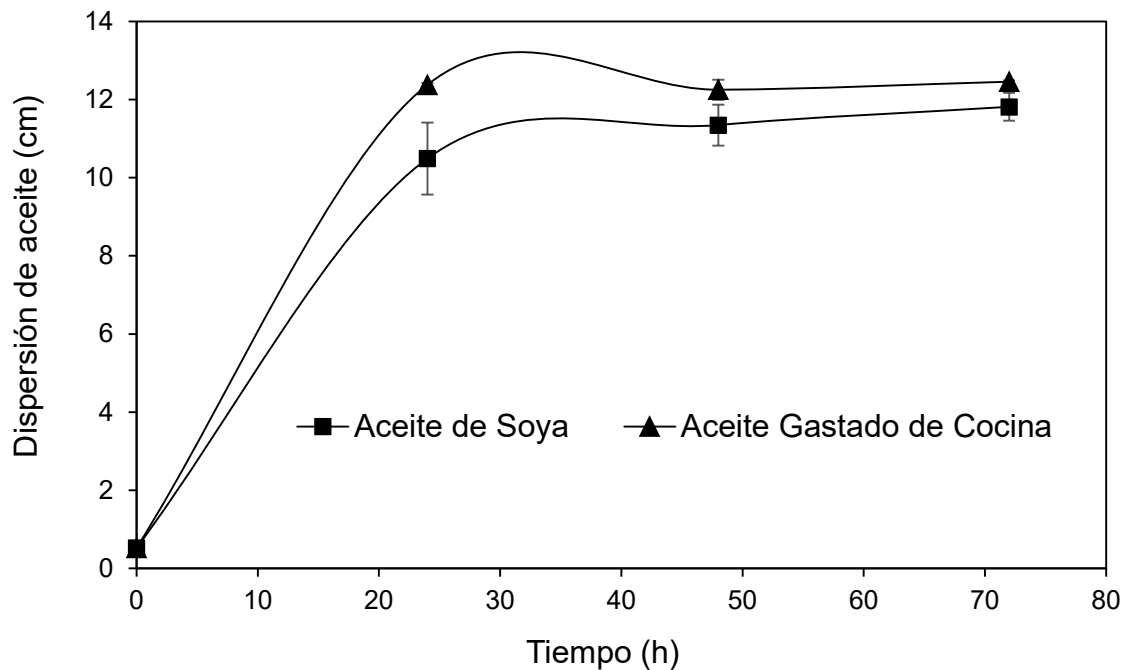


Figura 9.6 Evaluación preliminar de la producción de biosurfactante con la cepa IMP-K cultivada con aceite de soya y aceite gastado de cocina como fuentes de carbono, mediante la evaluación de dispersión de aceite a nivel matraz.

Para *Pseudomonas aeruginosa* en la literatura se reportan numerosos sustratos factibles para la producción de biosurfactantes, los cuales van desde fuentes de carbono de tipo soluble como la glucosa, melaza, fructosa y glicerol entre otros, hasta aquellas de tipo insoluble como son el hexadecano, diésel y una gran variedad de aceites vegetales; además de sustratos residuales de distintas industrias (Abbasi *et al.*, 2012). Sin embargo, en algunos trabajos se ha observado una preferencia hacia ciertas fuentes de carbono por este microorganismo. Como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* EM1, la cual presentó una mayor afinidad a las fuentes de carbono solubles como el glicerol y la glucosa (Wu *et al.*, 2008); mientras que *Pseudomonas aeruginosa* MA01 reportada por Abbasi *et al.* (2012) presentó mejores resultados cuando se utilizan aceites vegetales como sustratos.

En cuanto a la tensión superficial, se observó que con ambos sustratos, la cepa IMP-K disminuye la TS a las 24 h, hasta un valor mínimo de 28.3 mN/m, manteniéndose constante hasta las 72 horas (Fig. 9.7). Con lo anterior se comprueba que la cepa IMP-K es capaz de producir biosurfactantes tanto con aceite de soya como con aceite gastado de cocina. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en otros trabajos, donde alcanzaron reducciones de tensión superficial hasta 29 mN/m (Abalos *et al.*, 2001; Abbasi *et al.*, 2012). También se observó que existe una correlación entre la tensión superficial y la dispersión de aceite, siendo indirectamente proporcionales (Figs.9.6 y 9.7).

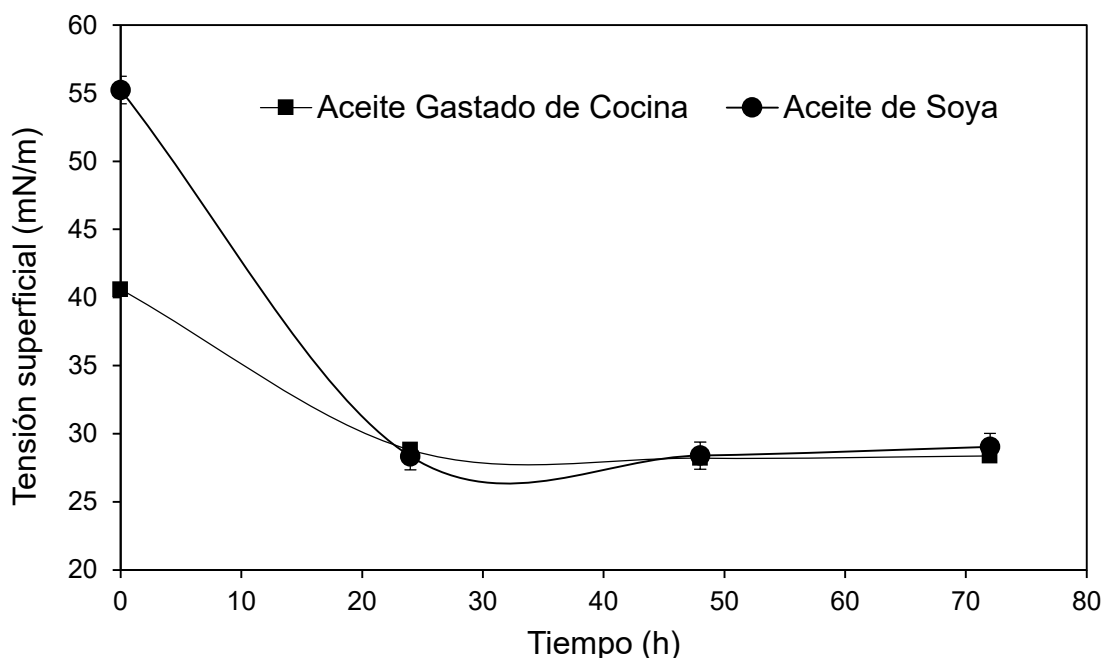


Figura 9.7 Evaluación preliminar de la producción de biosurfactante con la cepa IMP-K cultivada con aceite de soya y aceite gastado de cocina como fuentes de carbono, mediante la evaluación de tensión superficial a nivel matraz.

Para determinar la dilución micelar crítica (DMC) del biosurfactante contenido en el sobrenadante libre de células, se diluyó este último con agua, hasta encontrar la

dilución en la cual la tensión superficial no cambiaba, una antes donde ocurría un cambio o incremento de la TS. En la Tabla 9.2 se muestran estos resultados, donde se observa que con el aceite de soya, el biosurfactante producido a las 48 h alcanzó la mejor DMC con una dilución 1:8, sin afectar significativamente la tensión superficial. En cambio, con el aceite gastado de cocina la mejor DMC se obtuvo tanto a las 24 como a las 48 horas con una dilución de 1:8. En general, las mejores DCM se obtuvieron con el aceite gastado de cocina a 24 y 48 h de incubación, ya que con una dilución 1/16 se seguía teniendo un valor de TS bajo de 31.5 mN/m.

Tabla 9.2 Evaluación de la tensión superficial con el sobrenadante libre de células del cultivo de la cepa IMP-K a diferentes tiempos de incubación y realizando diluciones.

Fuente de carbono	Tiempo de incubación (h)	Tensión Superficial (mN/m)					
		Sin dilución	Dilución				
			1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Aceite de soya	24	29.8	30.2	31	32.7	36.5	Nd
	48	28.2	28.4	29.2	30.9	34.5	Nd
	72	28.9	29.3	30.1	31.7	34.0	Nd
Aceite gastado de cocina	24	28.2	28.7	29.3	30.0	31.6	32.8
	48	28.2	28.8	29.2	30.0	31.4	33.6
	72	28.4	29.1	29.9	31.5	34.4	Nd

Nd: No determinado

9.3 Cinética de crecimiento y producción de biosurfactante con la cepa IMP-K a nivel matraz

Con la cepa IMP-K se llevó a cabo una cinética para conocer el comportamiento del crecimiento y de la producción de biosurfactante. En la figura 9.8 se observa la dispersión de aceite que produce el biosurfactante de la cepa IMP-K cultivada en aceite de soya como sustrato. Desde las 6 h de incubación, se incrementó la dispersión de aceite y se alcanzó un máximo de 10.5-11.8 cm, que se mantuvo de las 20 a las 54 h de incubación. Después de este periodo la dispersión de aceite disminuyó. En comparación con la evaluación preliminar (Sección 9.2), en esta cinética se alcanzaron dispersiones por arriba de 10 cm desde las 20 h, igual que a las 24 h de la evaluación preliminar. Sin embargo la dispersión disminuyó para tiempos posteriores a las 54 horas. El halo máximo de dispersión que se obtuvo fue de 11.1 cm.

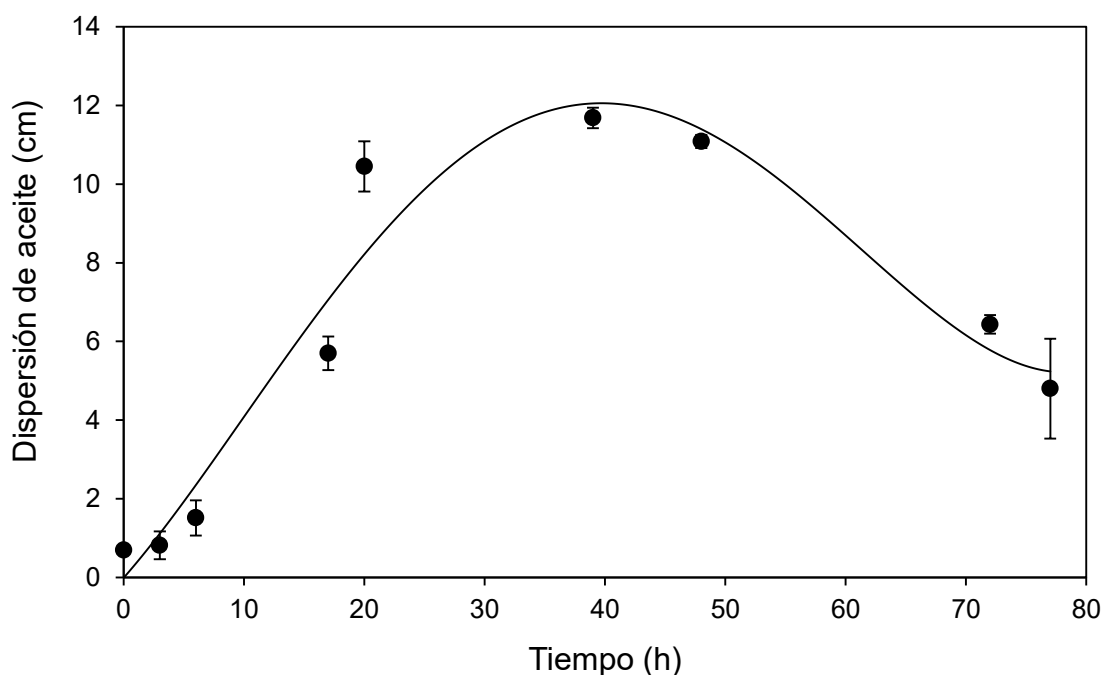


Figura 9.8 Evaluación de la producción de biosurfactante de la cepa IMP-K, mediante la dispersión de aceite, cultivada con aceite de soya como fuente de carbono a nivel matraz.

Los resultados de producción de biosurfactante con aceite gastado de cocina se muestran en la figura 9.9, donde se observa que la dispersión de aceite se fue incrementando desde las 6 h, pero de forma diferente a la evaluación preliminar, alcanzando su máximo (12.8 cm) hasta las 77 horas de incubación. Este valor fue significativamente más alto que el que se obtuvo con aceite de soya en un 8.5%. Lo anterior puede significar que el aceite gastado de cocina modificó mejor la tensión interfacial de los líquidos evaluados, pero en un mayor tiempo. Esto se puede deber a que los residuos agroindustriales como es el caso del aceite gastado de cocina contienen grandes cantidades de hidratos de carbono y lípidos por lo tanto puede ser una rica fuente de carbono para el crecimiento microbiano (Kaskatepe *et al.*, 2016). Además de que entre el aceite de soya y el aceite gastado de cocina posiblemente se encuentren diferencias importantes en la composición de ácidos grasos. Un estudio hecho por Haba *et al.* (2000) comparando aceite de oliva nuevo con aceite de oliva usado demostró que la concentración de ácido oleico disminuyó de 84.4 a 55.51% en el aceite usado mientras que la presencia de ácidos grasos de baja longitud de cadena (<C10) aumento 22.5%. Entre ambos sustratos utilizados para el medio de cultivo con *Pseudomonas sp* y *Bacillus sp*. la producción de biosurfactantes fue mayor con el aceite usado.

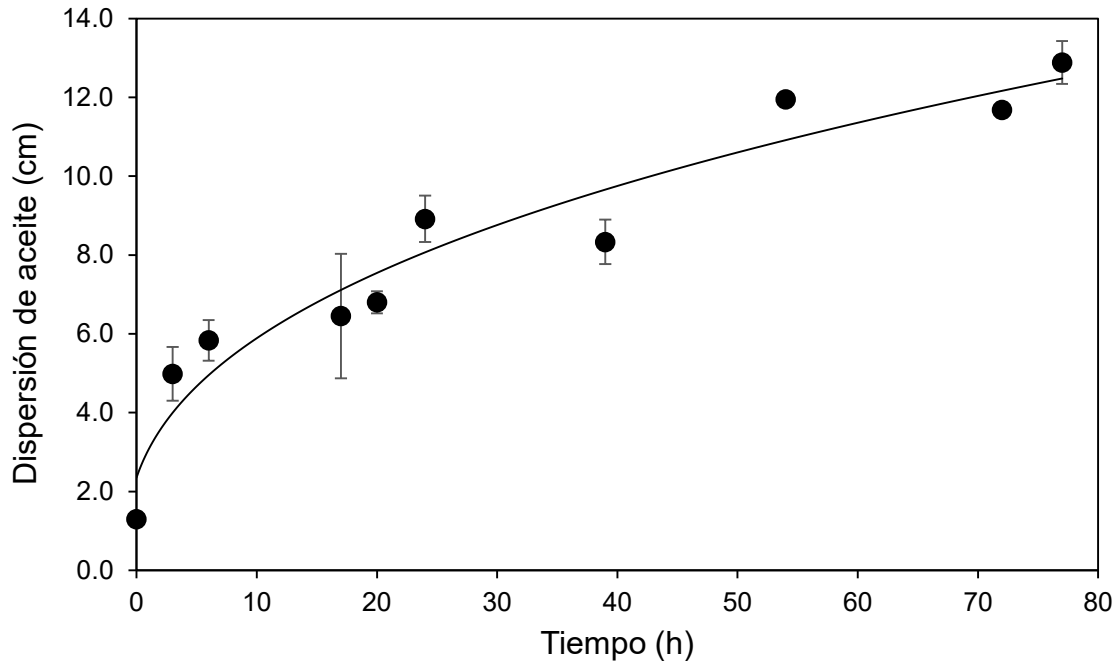


Figura 9.9 Cinética de la producción de biosurfactante con la cepa IMP-K, mediante la evaluación de dispersión de aceite, cultivada con aceite gastado de cocina como fuente de carbono a nivel matraz.

En cuanto a la evaluación de la producción de biosurfactante con aceite de soya, mediante la determinación de la tensión superficial (Fig. 9.10), se observó que la cepa IMP-K produce este metabolito desde las 6 horas, donde ocurre un cambio en TS. La máxima disminución de TS (28 mN/m) se alcanzó a las 20 h y este valor se mantuvo hasta las 77 horas. Lo anterior muestra que la TS tuvo un comportamiento similar a lo que se observó con la dispersión de aceite (Fig. 9.9), alcanzando el mejor valor desde las 20 h. Pero la TS se mantuvo hasta el final de la cinética, mientras que la dispersión de aceite disminuyó después de las 54 h.

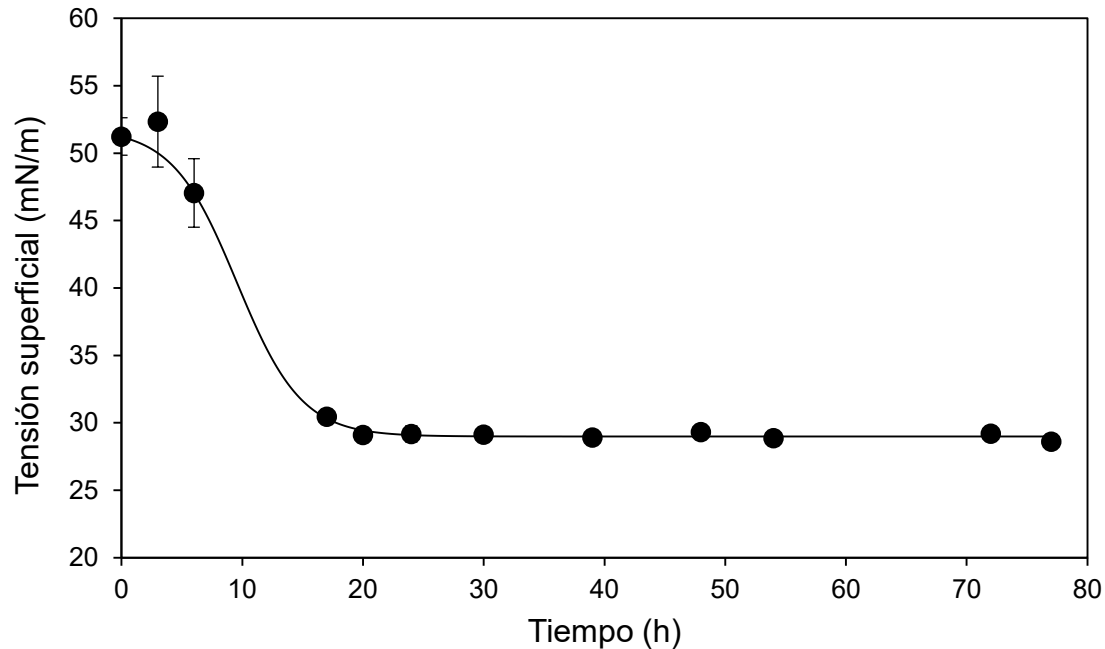


Figura 9.10 Evaluación de la producción de biosurfactante de la cepa IMP-K, mediante la determinación de tensión superficial, cultivada con aceite de soya como fuente de carbono a nivel matraz.

Para el caso de la producción de biosurfactante con aceite gastado de cocina (Fig. 7.11), se tuvo un comportamiento similar al del aceite de soya y a la evaluación preliminar. Durante esta cinética la TS disminuyó desde las primeras horas (a partir de las 3 h), alcanzando un mínimo de TS (28 mN/m) a partir de las 20 h y manteniendo este valor hasta las 77 h. Durante las primeras horas de incubación los valores de tensión superficial disminuyeron rápidamente y alcanzaron valores cercanos a 28 mN, manteniéndose constantes hasta el final de la cinética. El valor mínimo de tensión superficial fue de 28.64 mN/m a las 48 h. En este caso no hubo una correlación de la TS con la dispersión de aceite. La TS fue más estable, mientras que la dispersión se incrementó gradualmente durante la cinética.

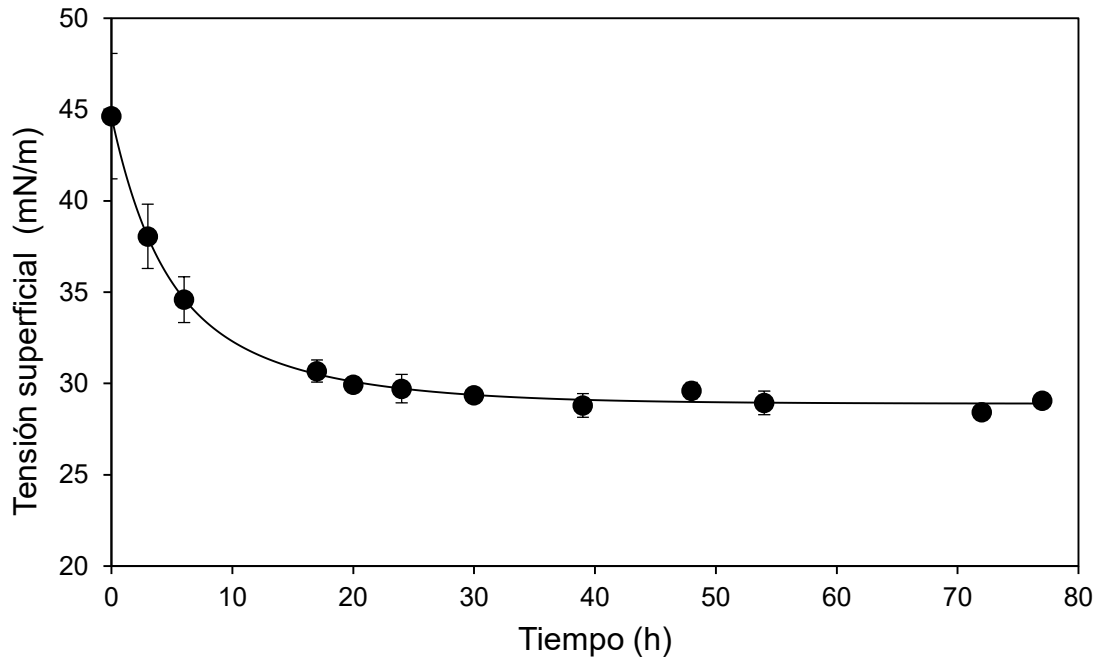


Figura 9.11 Evaluación de la producción de biosurfactante de la cepa IMP-K, mediante la determinación de la tensión superficial, cultivada con aceite gastado de como fuente de carbono a nivel matraz.

Los resultados de la evaluación de la DMC (Tabla 9.3) muestran que cuando se utilizó aceite de soya como sustrato para la producción de biosurfactante, se obtuvo una DMC a una dilución 1:16 a las 48 h, sin cambios significativos ($\alpha= 0.05$) en la TS. A esta DMC la TS se mantuvo en un intervalo de 29-31 mN/m. Para la producción de BS con aceite gastado de cocina se tuvieron dos mejores tiempos de producción (30 y 72 h), que corresponden a los tiempos donde se obtuvo la mejor DMC= 1:16 con una TS de 32 y 31.7, respectivamente. En ambos tiempos no hubo diferencia significativa.

Tabla 9.3 Evaluación de la tensión superficial y DMC con el sobrenadante libre de células del cultivo de la cepa IMP-K a diferentes tiempos de incubación y realizando diluciones.

Fuente de carbono	Tiempo de incubación (h)	Tensión Superficial (mN/m)					
		Dilución					
		Sin Dilución	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Aceite de soya	3	52.3	Nd	nd	nd	nd	nd
	6	47.1	Nd	nd	nd	nd	nd
	17	30.5	31.1	34.0	nd	nd	nd
	20	29.1	29.8	30.8	32.9	nd	nd
	24	29.2	29.5	30.3	32.5	nd	nd
	30	29.3	28.7	29.3	29.6	33.0	nd
	39	28.9	30.0	31.9	35.3	nd	nd
	48	29.3	28.8	29.3	29.9	31.1	32.8
	54	28.5	29.2	30.4	33.3	34.6	nd
	72	29.1	30.2	30.8	32.1	35.1	nd
77	28.8	28.5	29.8	32.1	nd	nd	
Aceite gastado de cocina	3	38.1	Nd	nd	nd	nd	nd
	6	34.6	Nd	nd	nd	nd	nd
	17	30.7	15.5	16.1	nd	nd	nd
	20	29.9	30.2	30.6	32.0	nd	nd
	24	29.7	30.2	30.6	32.2	nd	nd
	30	29.4	29.4	29.9	30.6	32.0	34.6
	39	28.8	30.6	31.1	32.0	33.1	34.2
	48	29.6	30.1	31.1	32.2	37.1	nd
	54	28.9	29.7	29.9	30.6	32.5	nd
	72	28.4	28.9	29.0	30.2	31.7	nd
77	30.3	30.8	31.5	34.3	nd	nd	

Nd. No determinado

Con respecto al crecimiento de la cepa IMP-K durante la producción de biosurfactante (Fig. 9.12) cultivada en aceite de soya, se observó que el microorganismo tuvo una fase de adaptación de 6 h. Después de este tiempo inició la fase exponencial del crecimiento y alcanzó un máximo de biomasa a las 50 h. Al evaluar la velocidad de crecimiento de la cepa IMP-K con este sustrato dio un valor de μ de 0.0908 h^{-1} con un tiempo de duplicación (t_d) de 7.63 h., similar al obtenido en la evaluación preliminar. En cuanto al crecimiento de la cepa IMP-K realizado con el aceite gastado de cocina (Fig. 9.13) se observó que el microorganismo creció exponencialmente hasta las 40 h y se mantuvo en la fase estacionaria hasta el final del experimento. Con AGC la velocidad de crecimiento fue de (μ) 0.0732 h^{-1} con un tiempo de duplicación (t_d) de 9.46 h.

Considerando este crecimiento y la producción de biosurfactante (Figs. 9.11 y 9.10) se puede observar que la producción de BS está asociada al crecimiento, la cual inicia en la fase exponencial y se mantiene durante la fase estacionaria.

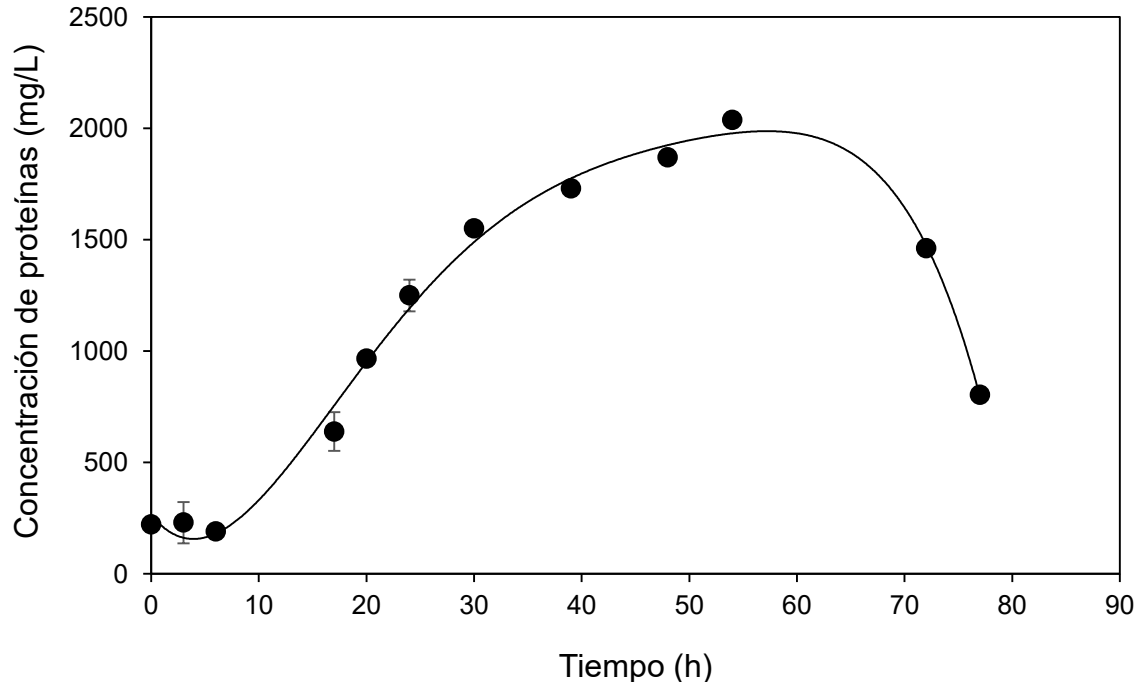


Figura 9.12 Evaluación del crecimiento (proteínas) de la cepa IMP-K cultivada con aceite de soya como fuente de carbono.

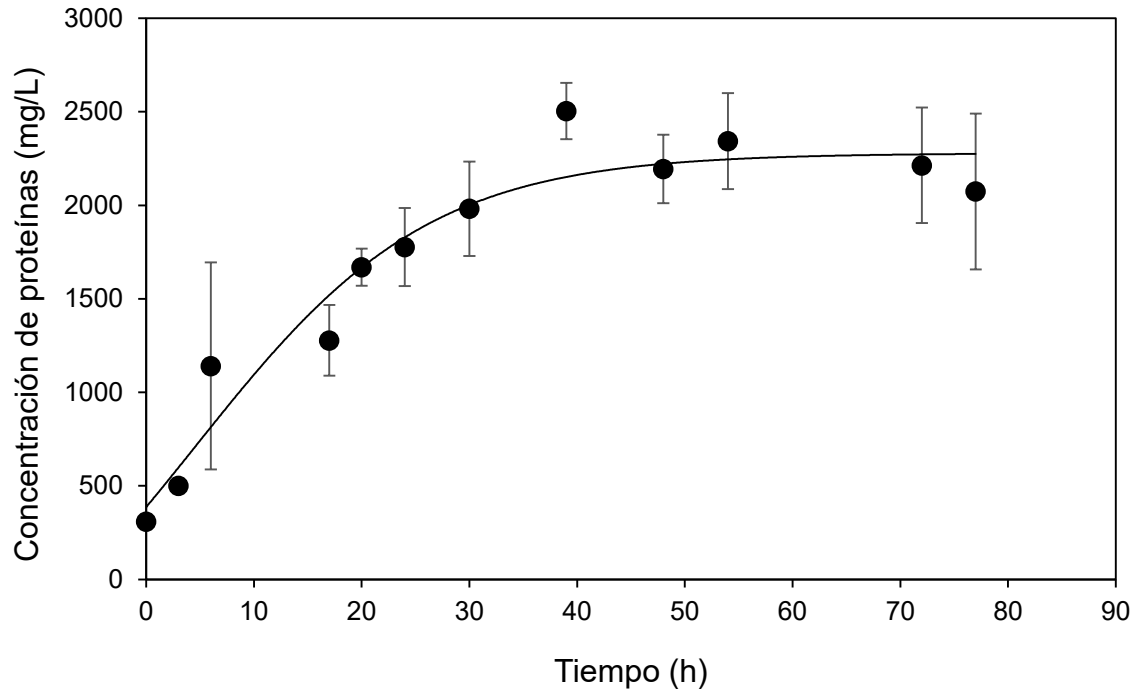


Figura 9.13 Evaluación del crecimiento (proteínas) de la cepa IMP-K cultivada con aceite gastado de cocina como fuente de carbono.

9.4 Evaluación de diferentes parámetros sobre la producción de biosurfactante

9.4.1 Evaluación del efecto de la concentración de oxígeno sobre el crecimiento y producción de biosurfactante

Con la finalidad de analizar el efecto de la presencia de O₂ sobre el crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-K, se realizaron experimentos en donde los sistemas se adicionaron con 0, 25, 50 y 100% de aire, correspondientes a 0, 6.7, 9.7 y 21% de oxígeno (Sección 8.4.1).

La evaluación del efecto de la concentración de oxígeno sobre el crecimiento de la cepa IMP-K se presenta en la figura 9.14, donde se observó que durante las primeras 24 horas a mayor aireación, mayor crecimiento de la cepa. Sin embargo a las 48 h, la mayor producción de biomasa se obtuvo con el 50% de aire, seguida del 100%, 25% y 0% respectivamente. Este mismo comportamiento de aire se continuó hasta las 168 h, alcanzando la fase estacionaria para 50% desde las 48 h y para 25% y 100% desde las 72 horas. En el sistema completamente anaerobio se presentó un ligero crecimiento, el cual fue significativamente menor a los obtenidos con presencia de aire en los sistemas 50 y 100%.

Otro indicativo cualitativo del crecimiento en los sistemas se observó en los frascos incubados. Donde hubo un incremento en la turbiedad del sistema conforme se incrementó el nivel de aire hasta las 48 horas (Fig. 9.15), aumentando incluso la presencia de biomasa sobre la pared de vidrio del sistema, asociado a la concentración de oxígeno. Posteriormente, a las 72 h no se observó diferencia significativa entre 25, 50 y 100% de aire. Por último, a las 168 h la turbiedad se hizo notable para el sistema completamente anaerobio mostrando un crecimiento incluso en estas condiciones, pero sin llegar a ser tan importante como en los sistemas con aire.

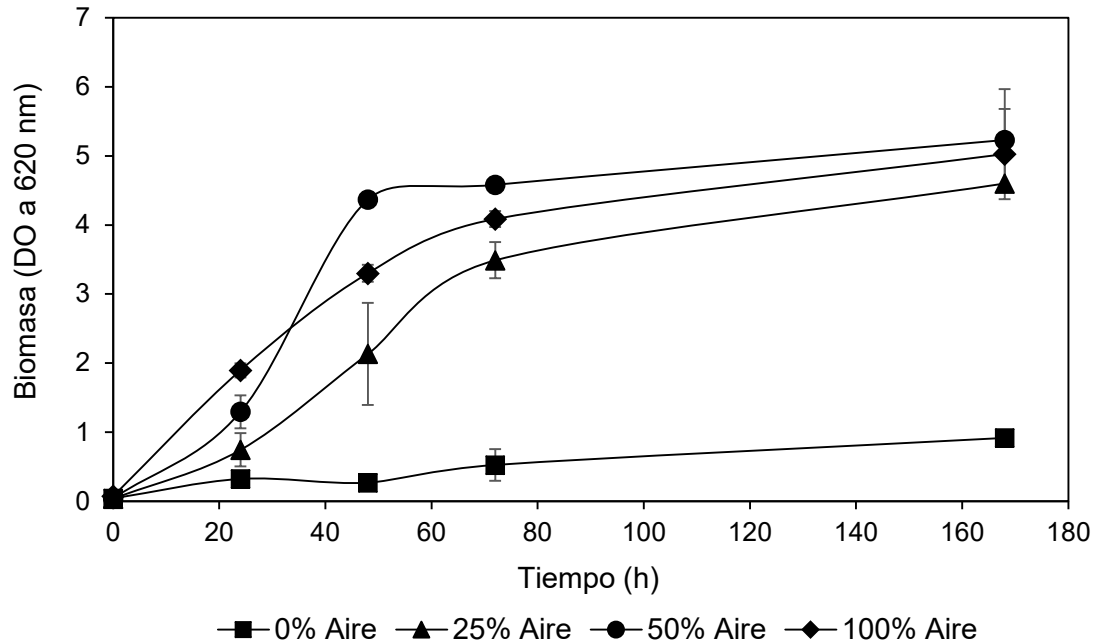


Figura 9.14 Evaluación del crecimiento de la cepa IMP-K en matraz a diferentes concentraciones de oxígeno a 30°C y 150 rpm.



Figura 9.15 Sistemas inoculados con la cepa IMP-K y adicionados con aceite de soya como sustrato para la producción de biosurfactante a diferentes porcentajes de O₂, a las 24, 48, 72 y 168 h de cultivo a 30° C. A) Control sin inocular, B) 0% aire, C) 25% aire, D) 50% aire y E) 100% aire.

Otro parámetro indicativo del crecimiento y actividad microbiana de la cepa IMP-K fue la producción de CO₂ (Figura. 9.16). Donde se observó que el sistema completamente aerobio (100% de aire) fue el que produjo la mayor cantidad de CO₂ (15.8 mmoles/L). Aunque se observó un patrón de incremento de la producción de CO₂ conforme se incrementaba la concentración de aire en los sistemas, en los tratamientos con 25 y 50% de aire la producción de CO₂ fue mucho menor (10 y 6 veces menos, respectivamente) comparado con el tratamiento con 100% de aire. Mientras que el tratamiento sin oxígeno prácticamente no produjo CO₂.

El comportamiento anterior probablemente se deba a que la biodegradación de aceites es un evento metabólico principalmente oxidativo con requerimiento de oxígeno intensivo para llevarse a cabo (Panesar *et al.*, 2009), como es el caso de la cepa IMP-K que utiliza aceite de soya como sustrato y necesita oxígeno para degradarlo.

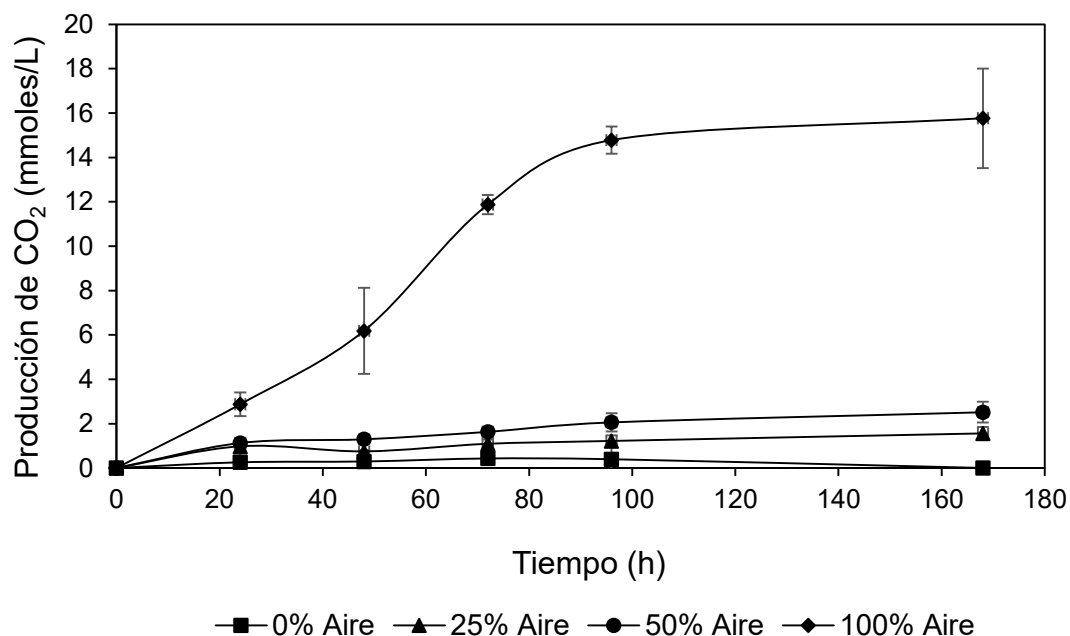


Figura 9.16 Evaluación de la producción CO₂ mediante cromatografía de gases en los sistemas cultivados con la cepa IMP-K a diferentes concentraciones de oxígeno a 30°C y 150 rpm.

Los parámetros cinéticos calculados con la producción de CO₂, en los tratamientos con diferente porcentajes de oxígeno durante el cultivo de la cepa IMP-K se presentan en la tabla 9.4, para obtenerlos se realizó un ajuste con el modelo de Gompertz modificado (Van Ginkel *et al.*, 2001), con coeficientes de correlación (r^2) de 0.89 a 0.97. La producción máxima de CO₂ (P_{\max}) aumentó con la presencia de oxígeno en los sistemas, obteniendo el valor más alto de CO₂ (16.5 mmoles de CO₂ L⁻¹) con 100% de aire. Este valor fue 41, 10 y 6.7 veces más alto que los valores obtenidos con 0, 25, y 50% de aire. Lo anterior indica que la cepa IMP-K se desarrolla preferentemente en condiciones completamente aerobias, aunque tiene actividad en sistemas disminuidos en oxígeno.

Tabla 9.4 Parámetros cinéticos de la producción de CO₂ obtenidos con el modelo de Gompertz modificado con el cultivo de la cepa IMP-K a diferentes concentraciones de oxígeno.

% O₂ en tratamientos	% Aire en tratamientos	P_{max} (mmoles CO ₂ L ⁻¹)	R_{max} (mmol CO ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)	λ (h)	r²
0	0	0.40	0.020	16.7	0.84
6.7	25	1.55	0.017	6.5	0.98
9.7	50	2.46	0.277	0.0	0.92
21	100	16.5	0.230	16.2	0.98

nd: no determinado

En cuanto a la determinación de la tensión superficial, se observó que en todos los tratamientos hubo una disminución de este parámetro desde las 24 h (Figura 9.17) debido al biosurfactante producido, aun en el tratamiento anaerobio donde el

crecimiento fue muy poco y la producción de CO₂ casi nula, con una TS de 29-30 mN/m y sin diferencia significativa ($\alpha= 0.05$) entre los tratamientos. Lo anterior muestra que se obtiene producción de BS por medio de la cepa IMP-K aun en ausencia de oxígeno. Tal como lo demostró Chayabutra *et al.* (2001) utilizando *Pseudomonas aeruginosa* con diferentes sustratos, donde el microorganismo tuvo crecimiento celular en condiciones anaerobias desnitrificantes. Sin embargo, con la evaluación de la dispersión de aceite (Figura 9.18) se observó diferencia significativa entre los tratamientos con la menor concentración de oxígeno (25%) y anaerobiosis (0% aire) y las mayores concentraciones de oxígeno (50 y 100% de aire). Sin diferencia significativa entre los mayores % de aire, con un máximo de dispersión de aceite de 6.6 a 7.5 cm, lo que indica que la mayor producción de biosurfactante se obtuvo con las altas concentraciones de aire.

Con otro microorganismo del género *Bacillus*, Abushady *et al.* (2005) analizaron el efecto del oxígeno que existe sobre la producción de surfactina, en sus sistemas con medio mineral y diferentes porcentajes de oxígeno que iban del 30 al 90%, los resultados mostraron que existe un aumento en la producción de biosurfactante con el aumento del oxígeno. Además se sabe que *P. aeruginosa* se describe generalmente como una bacteria que se favorece bajo condiciones de crecimiento aeróbico (Palleroni, 1984). Sin embargo, otros trabajos muestran que bajo condiciones de limitación de oxígeno, *P. aeruginosa* crece en presencia de nitrato o nitrito mediante la desnitrificación (Davies *et al.*, 1989; Zumft, 1997). Bajo estas condiciones, nitrato o nitrito reemplazan al oxígeno como aceptores de electrones alternativos, por lo que puede explicar porque la cepa IMP-K creció en condiciones anaerobias, ya que el medio utilizado es a base de nitratos.

Lo que significa que dependiendo de la cantidad de oxígeno en los sistemas, se afecta o favorece la producción de biosurfactante. Estos resultados son muy interesantes, ya que podrían tener impacto en la aplicación *in situ* de la cepa IMP-K para la producción de biosurfactante dentro de tecnología de recuperación mejorada de hidrocarburos vía microbiana (MEOR), en donde generalmente se tiene una falta

de oxígeno en los yacimientos. Además, se sabe que pocos microorganismos pueden producir biosurfactantes en condiciones anóxicas (Zhao *et al.*, 2015). Sin embargo, otra de las variables que afecta la producción de biosurfactantes es la temperatura de incubación del microorganismo productor, por lo que la aplicación de la cepa IMP-K dependerá también de la temperatura que tenga el yacimiento donde se vaya a aplicar.

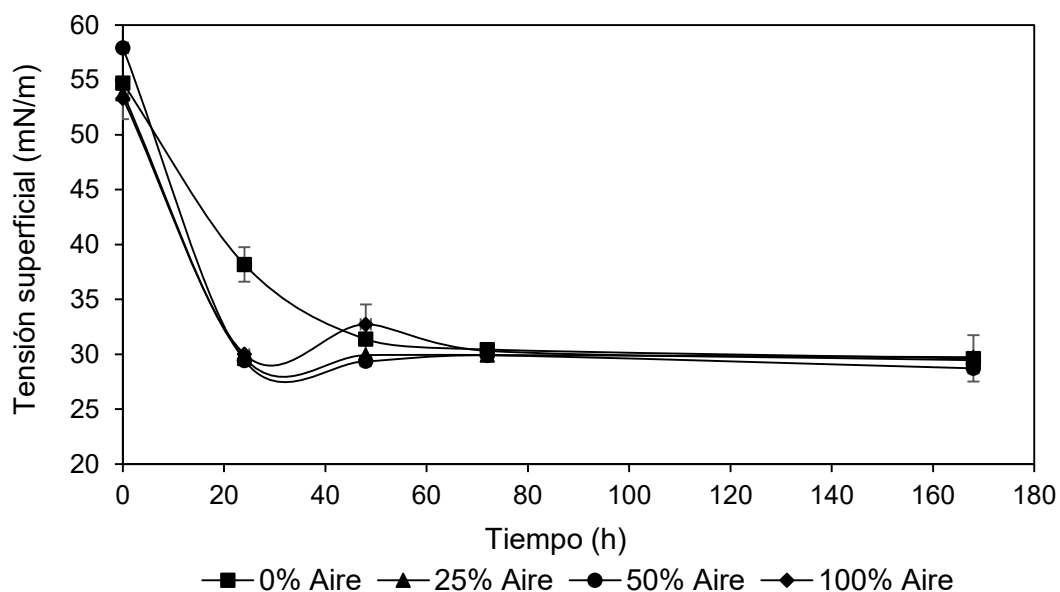


Figura 9.17 Evaluación del efecto de la concentración de oxígeno sobre la producción de biosurfactante mediante la tensión superficial, con la cepa IMP-K cultivada en aceite de soja como sustrato e incubada a 30° C y 150 rpm.

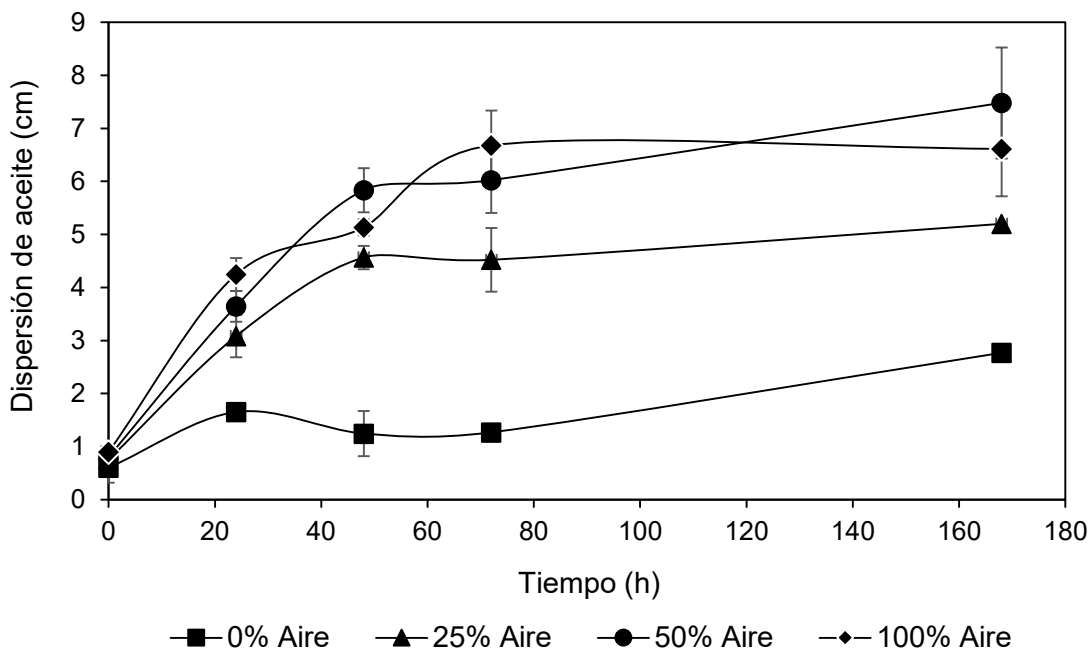


Figura 9.18 Evaluación del efecto de la concentración de oxígeno sobre la producción de biosurfactante mediante la dispersión de aceite, con la cepa IMP-K cultivada en aceite de soya como sustrato e incubada a 30° C y 150 rpm.

9.4.2 Evaluación de la temperatura de incubación sobre el crecimiento y producción de biosurfactante

Como se mencionó anteriormente otro de los parámetros que afecta el crecimiento y la producción de biosurfactantes en los microorganismos es la temperatura (Kiran *et al.*, 2009). Los microorganismos pueden crecer y desarrollarse en un intervalo de temperaturas, pero generalmente tienen una temperatura óptima para su crecimiento o bien para la producción de algún metabolito de interés, que no necesariamente corresponden a la misma. También se ha observado que este parámetro puede afectar la composición del biosurfactante que produce, como ha sido reportado para *P. aeruginosa* (Moussa *et al.*, 2014).

Otros trabajos con este microorganismo, indican que la temperatura donde se produce mejor el biosurfactante es a 37°C, mientras que la temperatura óptima de crecimiento es a 27°C (Robert *et al.*, 1991). Sin embargo, otros autores sugieren utilizar temperatura de 30°C para el crecimiento y producción de biosurfactante con este mismo microorganismo obteniendo buenos resultados (Benicasa *et al.*, 2008). Lo anterior indica que la temperatura óptima para la producción de BS dependerá del tipo de microorganismo y de todas las condiciones de cultivo.

En la figura 9.19 se presenta el comportamiento de la cepa IMP-K durante su crecimiento cuando fue cultivada a diferentes temperaturas. La mejor temperatura para el crecimiento de este microorganismo fue 30°C, ya que a esta temperatura tuvo la mayor velocidad de crecimiento y alcanzó su máximo entre 48 y 72 h. A la temperatura de 40°C la, cepa IMP-K también creció, pero disminuyó su velocidad de crecimiento (pendiente más pequeña), con un crecimiento de un 38% menor al obtenido a 30°C a las 48 h. mientras que a 50°C el microorganismo prácticamente no creció.

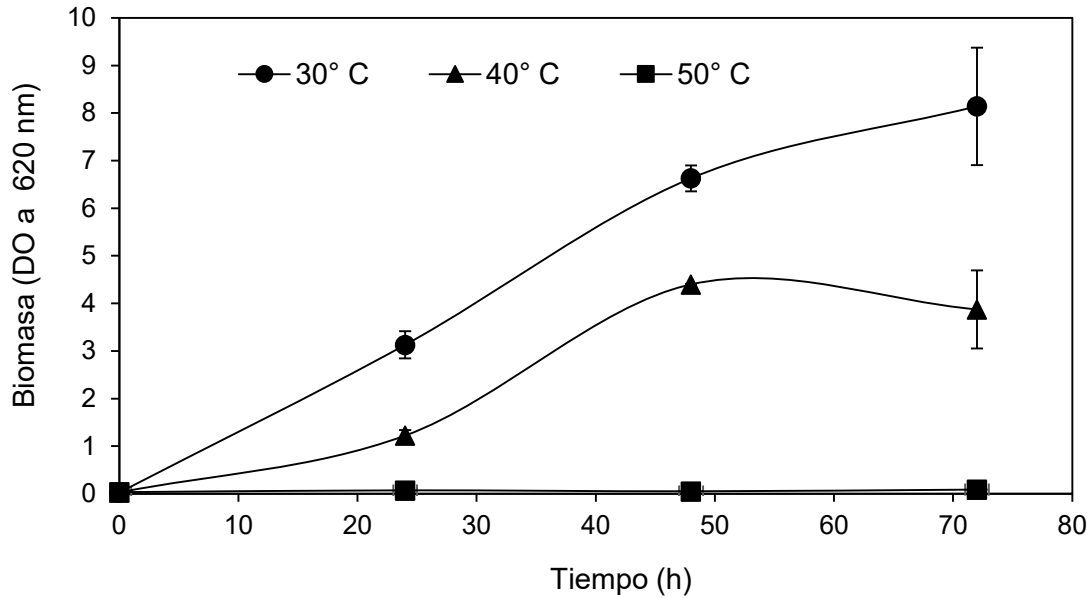


Figura 9.19 Evaluación del efecto de la temperatura sobre el crecimiento de la cepa IMP-K cultivada en aceite de soya como sustrato y con agitación de 150 rpm.

En cuanto a la producción de biosurfactante evaluada con la tensión superficial (Fig. 9.20), se observó que la cepa IMP-K tuvo un comportamiento similar a 30 y 40°C, con una disminución de la TS de 28-29 mN/m en ambas condiciones desde las 24 horas. En cambio a 50 °C, la producción de biosurfactante se desfavoreció significativamente, con tan solo una disminución en 7 unidades (de 53 a 46 mN/m). En tanto, que los controles con medio de cultivo sin inocular presentaron una TS de 52-55 mN/m, durante todo el periodo de experimentación. Estos resultados son similares a los obtenidos por Pruthi y Cameotra (2003) utilizando *Pseudomonas putida*, donde alcanzaron la máxima concentración de biomasa y producción de biotensoactivo a pH entre 6.4 y 7.2 y temperatura entre 30 y 40 °C.

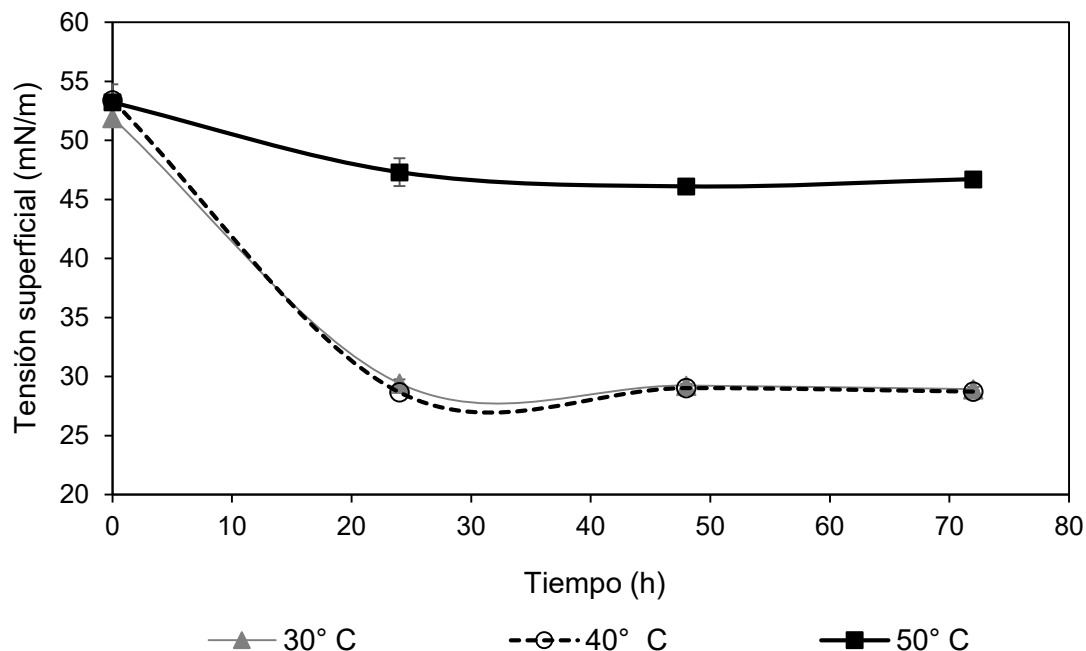


Figura 9.20 Evaluación del efecto de la temperatura de incubación de la cepa IMP-K sobre la producción de biosurfactante mediante la tensión superficial, con aceite de soja como sustrato y a 150 rpm.

Otro de los parámetros evaluados para determinar la producción de biosurfactante fue la dispersión de aceite (Fig. 9.21), con la cual se corroboró que la mejor temperatura para la producción de biosurfactante fue 30 °C, con halos de dispersión de aceite de hasta 8.6 cm. Mientras que a 40° C la producción de BS fue menor con halos de dispersión de 6.7 cm y a 50° C no hubo dispersión de aceite. Los controles de medio de cultivo sin inocular se mantuvieron con dispersiones de aceite de 0.8-1.0 cm durante todo el tiempo de experimentación.

Estos resultados muestran que la cepa IMP-K es capaz de producir biosurfactantes cuando se incubaba a 30 y 40 °C, siendo mejor la producción a 30 °C. En cambio la temperatura de 50 °C inhibe el crecimiento y la producción de biosurfactante. Lo anterior está de acuerdo con lo reportado por Sonali *et al.*, (2011) quienes observaron que para *Pseudomonas aeruginosa* OCD1 la temperatura óptima de crecimiento y producción de biosurfactante es 30° C y 35°C.

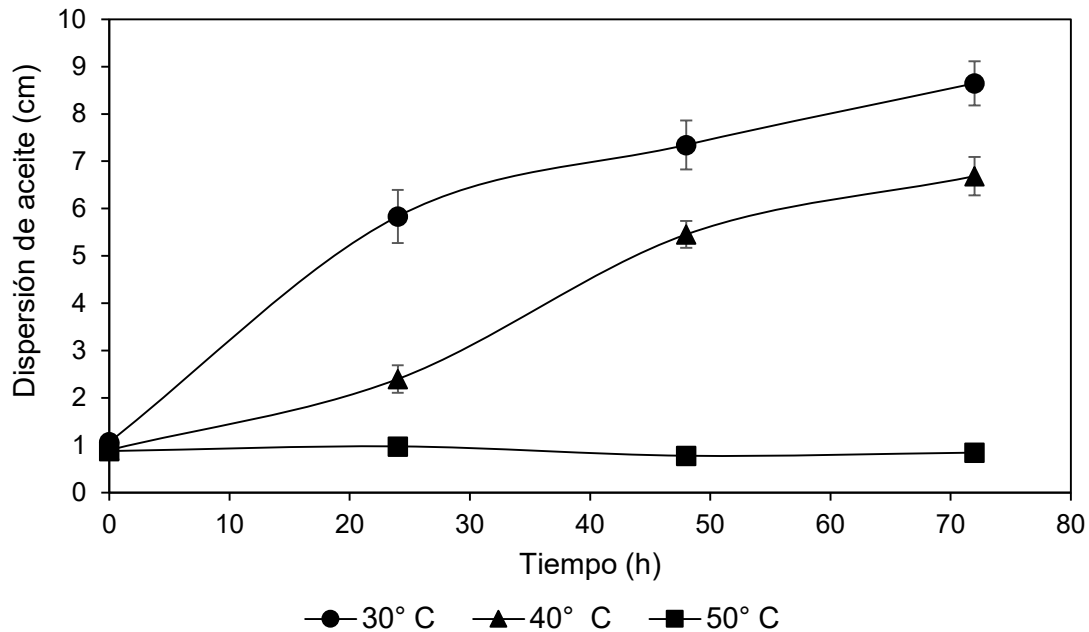


Figura 9.21 Evaluación del efecto de la temperatura de incubación de la cepa IMP-K sobre la producción de biosurfactante mediante la dispersión de aceite, con aceite de soya como sustrato y a 150 rpm.

Considerando los resultados del efecto del oxígeno y temperatura sobre el crecimiento y producción de biosurfactantes con la cepa IMP-K, se pudo observar que ambos parámetros afectan el desarrollo del microorganismo y por lo tanto su aplicación directa en un yacimiento para la producción de biosurfactantes *in situ*, no es factible dentro de la tecnología de MEOR.

9.4.3 Evaluación del efecto tensoactivo del biosurfactante sobre un aceite crudo

Una de las características más importantes de los biosurfactantes es su capacidad de reducir la tensión que existe entre las interfases agua y aceite (Amani *et al.*,

2010), que se traduce en la disminución de las fuerzas capilares, promoviendo el aumento de la movilidad y la liberación de petróleo residual de los yacimientos (Premuzic y Lin, 1991). Esta capacidad se evaluó como disminución de la tensión interfacial (TI) que produce el biosurfactante de la cepa IMP-K sobre un aceite crudo pesado de 14.8 °API proveniente de un yacimiento. Además de evaluar la actividad emulsificante (AE₂₄) que produce el biosurfactante sobre un hidrocarburo.

El biosurfactante fue evaluado a temperaturas de 30 y 60° C, con salinidad de 50,000 mg/L (NaCl) y sin salinidad (ver sección 8.5). Cada evaluación se realizó por triplicado y con sus respectivos controles.

La actividad emulsificante que presentó el biosurfactante de la cepa IMP-K sobre un aceite pesado de 14.8 °API desde su contacto y posterior agitación se muestra en la figura 9.22, donde se observó que el biosurfactante provocó inmediata emulsificación del hidrocarburo. Sin embargo, después de incubar los tratamientos a dos temperaturas (30 y 60° C) durante 24 horas, la emulsificación no fue estable, lo que repercutió en una actividad emulsificante (AE₂₄) menor (Fig. 9.23). En los diferentes tratamientos se observaron diferencias significativas. La temperatura de 30 °C favoreció la actividad emulsificante, en contraste con 60 °C, donde la AE₂₄ fue ligeramente menor. En cambio la salinidad incrementó la AE₂₄. La mayor actividad emulsificante (22.8%) se obtuvo con el tratamiento a 30 °C y 50 g/L de NaCl.

Estos resultados indican que la cepa IMP-K tiene la capacidad de formar emulsiones con un aceite pesado. Los biosurfactantes son moléculas anfifílicas que pueden tener la capacidad de formar emulsiones de tipo agua/aceite o aceite/agua, dependiendo del balance hidrofílico/lipofílico (HLB) que presenten (Müller *et al.*, 2012). Aunque la AE₂₄ (22.8%) que produjo el biosurfactante de la cepa IMP-K fue relativamente baja, fue un resultado promisorio, ya que el biosurfactante fue producido a las 48 horas de cultivo del microorganismo, y en otros trabajos anteriores con este mismo microorganismo del grupo de Biotecnología del IMP se

ha observado que a partir de cultivos con mayor tiempo se puede obtener un biosurfactante que produce mayor AE₂₄ (Vargas, 2015).

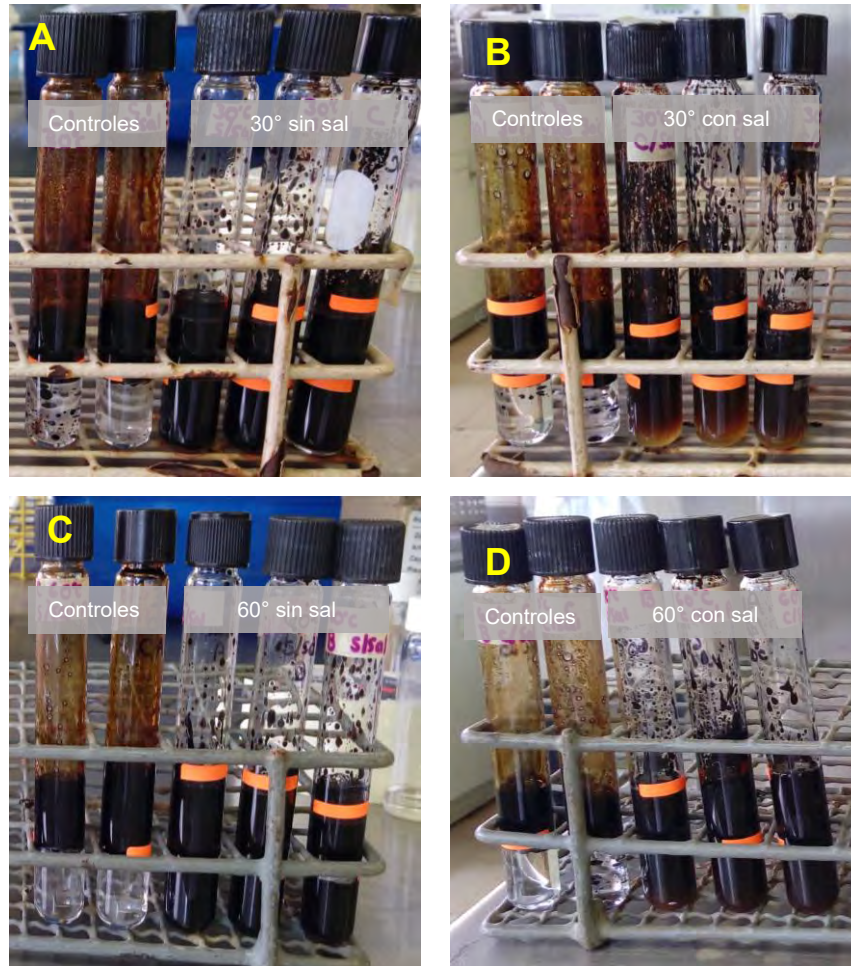


Figura 9.22 Evaluación de la actividad emulsificante (AE₂₄) con el biosurfactante producido por la capa IMP-K sobre un aceite pesado, al tiempo 0. A) a 30° C y sin sal, B) a 30° C y 50 g/L NaCl, C) a 60° C y sin sal, D) a 60° C y 50 g/L NaCl.

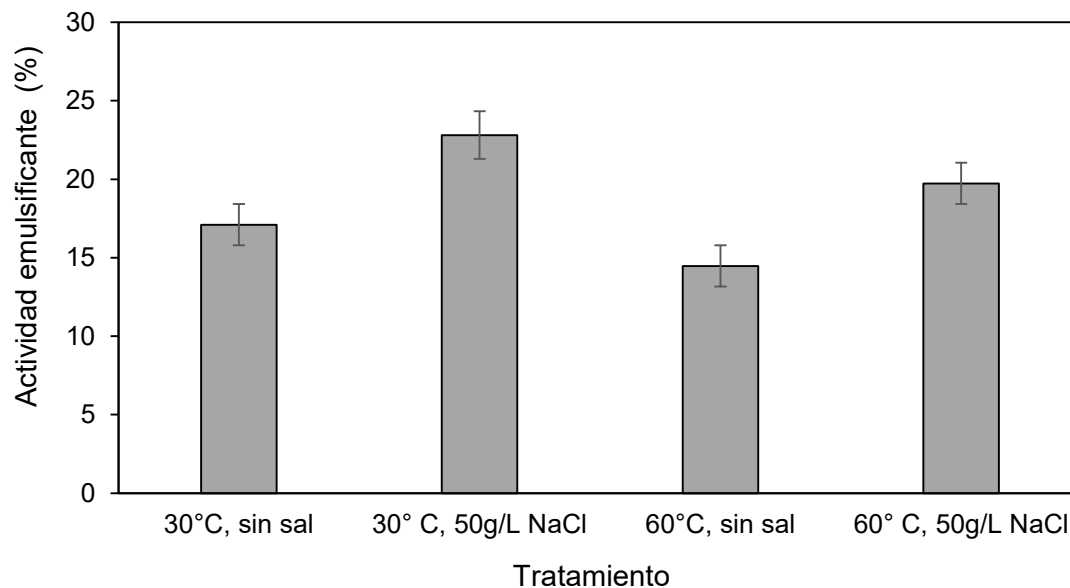


Figura 9.23 Evaluación de la actividad emulsificante (AE_{24}) con el biosurfactante producido por la cepa IMP-K sobre un aceite pesado a las 24 horas, a diferentes condiciones de temperatura y salinidad.

En cuanto a la tensión interfacial que produce el biosurfactante de la cepa IMP-K a diferentes condiciones de temperatura y salinidad (Fig. 9.24) se pudo observar que la mayor disminución de la TI (0.8 mN/m) comparada con el control (agua, 8.15 mN/m) fue con el tratamiento a 30 °C y con una salinidad de 50 g/L de NaCl. En todos los tratamientos hubo disminución de la TI por efecto del biosurfactante; sin embargo, no se pudo observar una correlación entre temperatura y salinidad, ya que a 60 °C fue mejor sin sal y a 30 °C con sal. La mayor disminución de la TI en un 90%, con respecto al control se logró con estos dos tratamientos. Lo anterior concuerda con lo reportado en la literatura para los biosurfactantes producidos por *P. aeruginosa*, donde se menciona que estos BS son capaces de disminuir la TI en sistemas agua/hexadecano hasta valores por debajo de 1 mN/m (Santos *et al.*, 2016; Amani *et al.*, 2013). Aunque para el BS de la cepa IMP-K se utilizó un aceite pesado para evaluar la TI.

Estos resultados indican que el biosurfactante producido por la cepa IMP-K es una opción para lograr mayores recuperaciones de aceite en yacimiento, sobretodo en aceites crudos pesados, de alta viscosidad, densos y de menor gravedad API como el aceite utilizado en este trabajo, donde se obtuvieron valores bajos de TI (hasta de 0.8 mN/m). Por lo tanto, este biosurfactante podría ser utilizado en procesos de recuperación de hidrocarburos y movilización de crudo pesado.

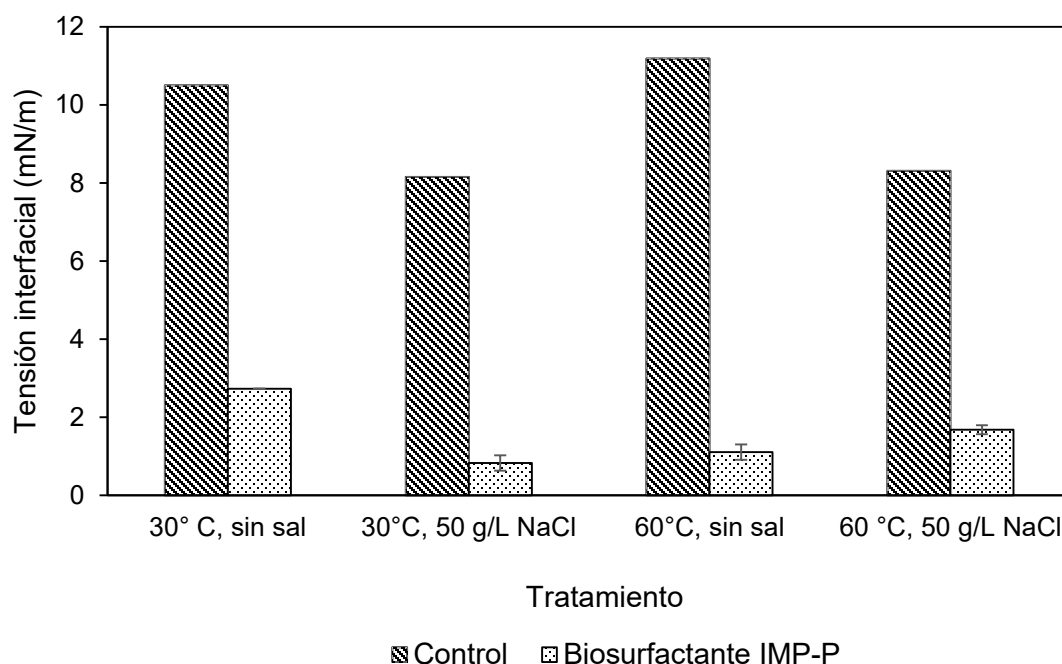


Figura 9.24 Evaluación de la TI que produce el biosurfactante de la cepa IMP-K sobre un aceite a diferentes condiciones de temperatura y salinidad.

9.5 Efecto de la aireación sobre la producción de biosurfactante a nivel reactor con la cepa IMP-K

La aireación es un factor importante en la producción de biosurfactantes a nivel reactor (Cardoso *et al.*, 2010). La mayoría de los trabajos sobre la producción de

biosurfactantes a nivel reactor a escala laboratorio se han realizado en reactores tipo tanque agitado (Benicasa et al., 2002; Muller *et al.*, 2010). En estos trabajos se han utilizado aireaciones desde 0.25 hasta 5 L/min donde se han tenido resultados óptimos. Sin embargo, la aireación adecuada para cada cultivo, sobre producción de biosurfactante también depende del microorganismo y otras condiciones de cultivo a utilizar por lo que es importante evaluar el efecto de la aireación.

Después de realizar el crecimiento de la cepa IMP-K y la producción del biosurfactante a nivel matraz comprobando las condiciones óptimas (% de fuente de carbono, % de inóculo, nitrógeno y otros nutrientes) y condiciones de cultivo (agitación y temperatura) establecidas en trabajos previos del proyecto, se procedió a escalar la producción del BS a nivel reactor.

Se llevó a cabo la evaluación del crecimiento y la producción del BS a diferentes flujos de aireación con la cepa IMP-K en un reactor de tipo tanque agitado de 3 L, los cuales fueron 400, 700, 1000, 15000 mL/min, utilizando aceite de soya como sustrato. Estos flujos de aire corresponden a 0.33, 0.58, 0.83 y 1.25 vvm (volumen de aire / volumen de medio de cultivo / min). El efecto de la aireación sobre la producción de biosurfactante se evaluó mediante la tensión superficial y dispersión de aceite.

El efecto de la aireación sobre el crecimiento de la cepa IMP-K se muestra en la figura 9.25, donde se observa que a mayor aireación mayor crecimiento, aunque entre las aireaciones 1000 y 1500 mL aire/min no hubo diferencia significativa en las primeras 24 h de cultivo, pero a las 48 h el crecimiento fue mejor con una aireación de 1000 mL/min. En todas las aireaciones se observó una fase exponencial de crecimiento y posteriormente una fase estacionaria.

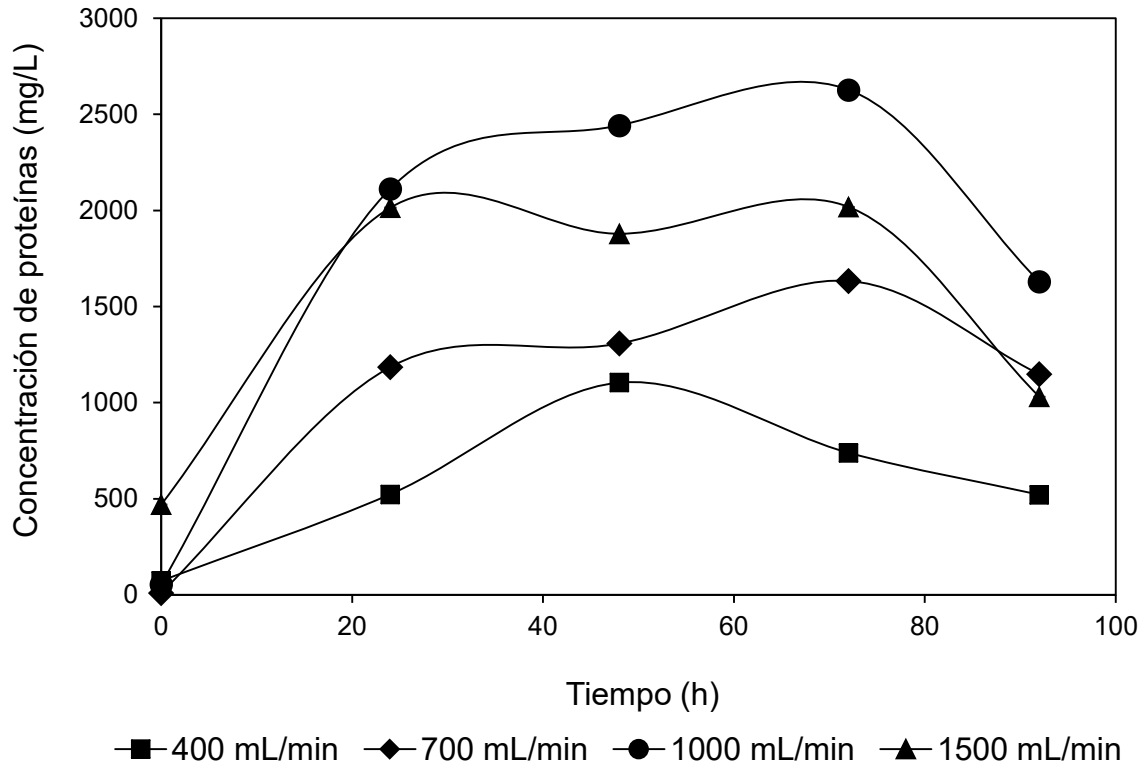


Figura 9.25 Evaluación del crecimiento de la cepa IMP-K a nivel reactor tanque agitado a diferentes aireaciones.

Otro parámetro que se monitoreó durante el cultivo de la cepa IMP-K a nivel reactor fue el oxígeno disuelto en las 4 aireaciones (Fig. 9.26). Se observó que para los flujos menores (400 mL/min y 700 mL/min) no se alcanzó más del 5% de O_2 en el reactor; mientras que a 1000 mL/min se mantuvo alrededor del 15% de O_2 . En cambio a 1500 mL/min subió gradualmente después de las 12 h hasta un 45%. Se sabe que el oxígeno a menudo limita el rendimiento de los bioprocesos aeróbicos, debido a la baja solubilidad de oxígeno en los medios acuosos, y por lo tanto su disponibilidad hacia el microorganismo (Doran, 1995).

De las 0 a la 24 h en todas las aireaciones se tuvo un comportamiento similar, en cuanto al O_2 disuelto con una baja concentración. Probablemente porque este periodo, fue el más activo y el oxígeno se consumió en las 4 aireaciones. Pero después fue notorio, que a 400 y 700 mL/min el oxígeno fue menor; mientras que a

1000 y 1500 mL/min el oxígeno disuelto estuvo en mayor concentración, lo cual repercutió en mayor crecimiento del microorganismo.

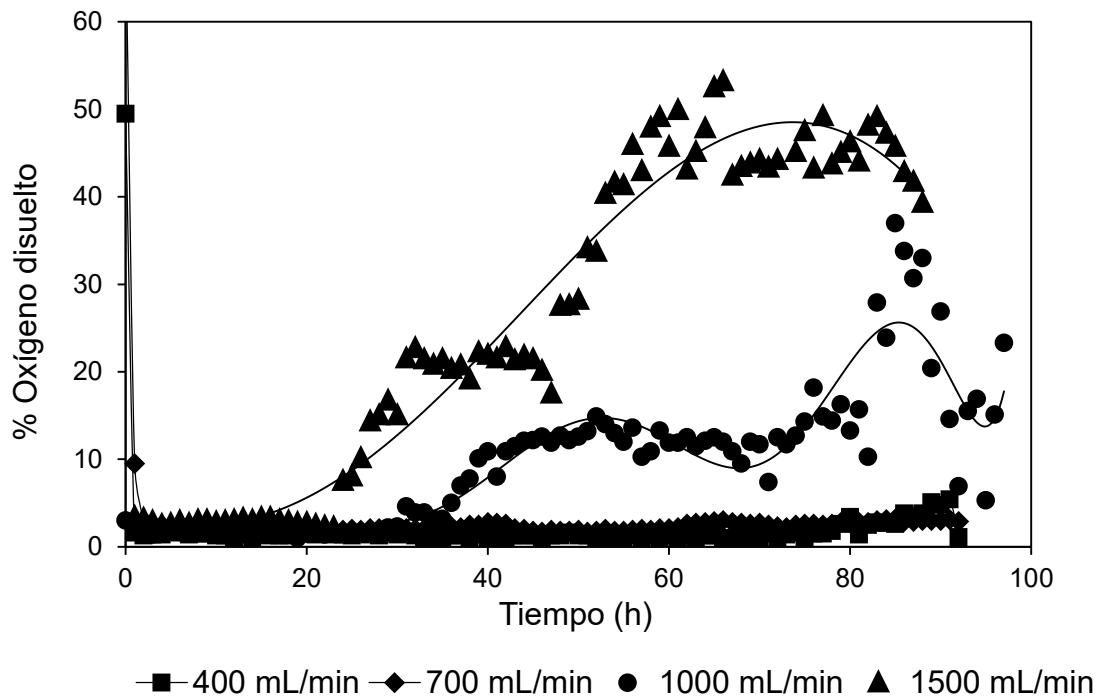


Figura 9.26 Seguimiento del oxígeno disuelto en el cultivo de la cepa IMP-K en reactor e diferentes aireaciones.

En cuanto al comportamiento del pH (Fig. 9.27) no hubo diferencia significativa entre las 4 aireaciones, incrementando su valor a pH ligeramente básico de 6.5 a 8 en las primeras horas y manteniéndolo hasta el final de la experimentación. Este comportamiento, es similar a lo reportado por Vargas (2016) utilizando el mismo microorganismo, pero a nivel matraz. Este ligero aumento del pH probablemente se deba a que la fuente de nitrógeno utilizada fue NaNO_3 , la cual tiene que ser reducida a amonio para su utilización, este compuesto al estar presente en el medio produce el aumento de pH de 7 a 8 como ha sido reportado en otros trabajos (Santa-Anna *et al.*, 2002).

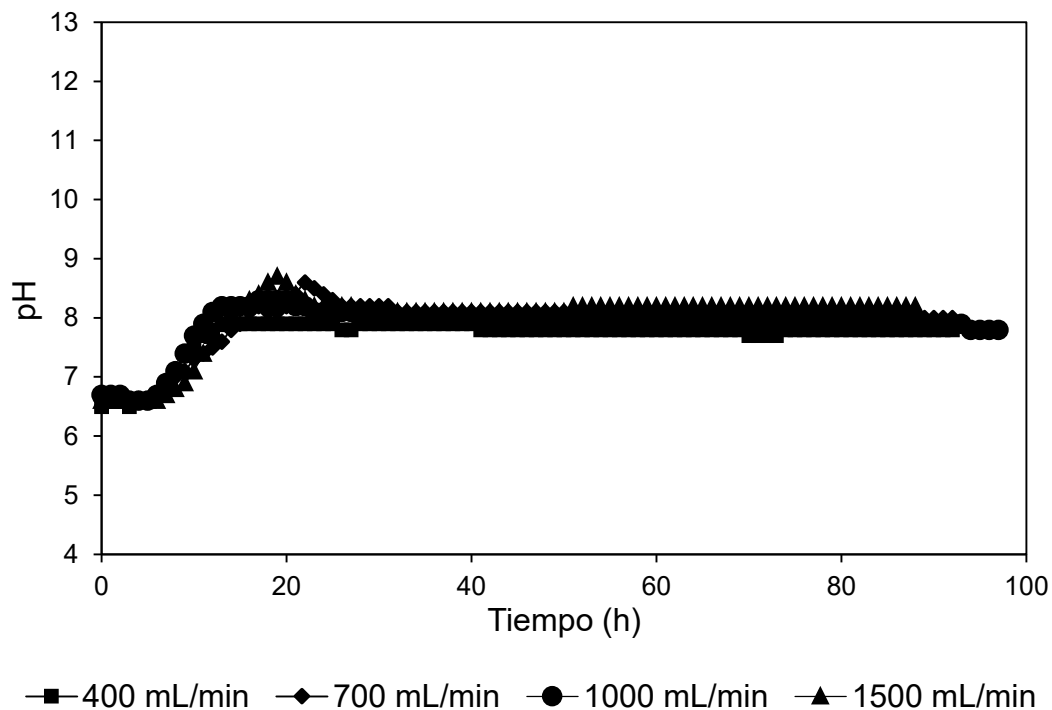


Figura 9.27 Seguimiento del pH en el cultivo de la cepa IMP-K en reactor a diferentes aireaciones.

Los resultados también mostraron que la cepa IMP-K, produce satisfactoriamente el biosurfactante a nivel reactor, ya que la tensión superficial disminuyó desde las 24 h, alcanzando una TS mínima de 29 mN/m para los cuatro flujos de aireación (Fig. 9.28). Esta actividad tensoactiva se mantuvo estable de las 24 a las 96 h, no mostrando diferencias significativas entre las diferentes aireaciones.

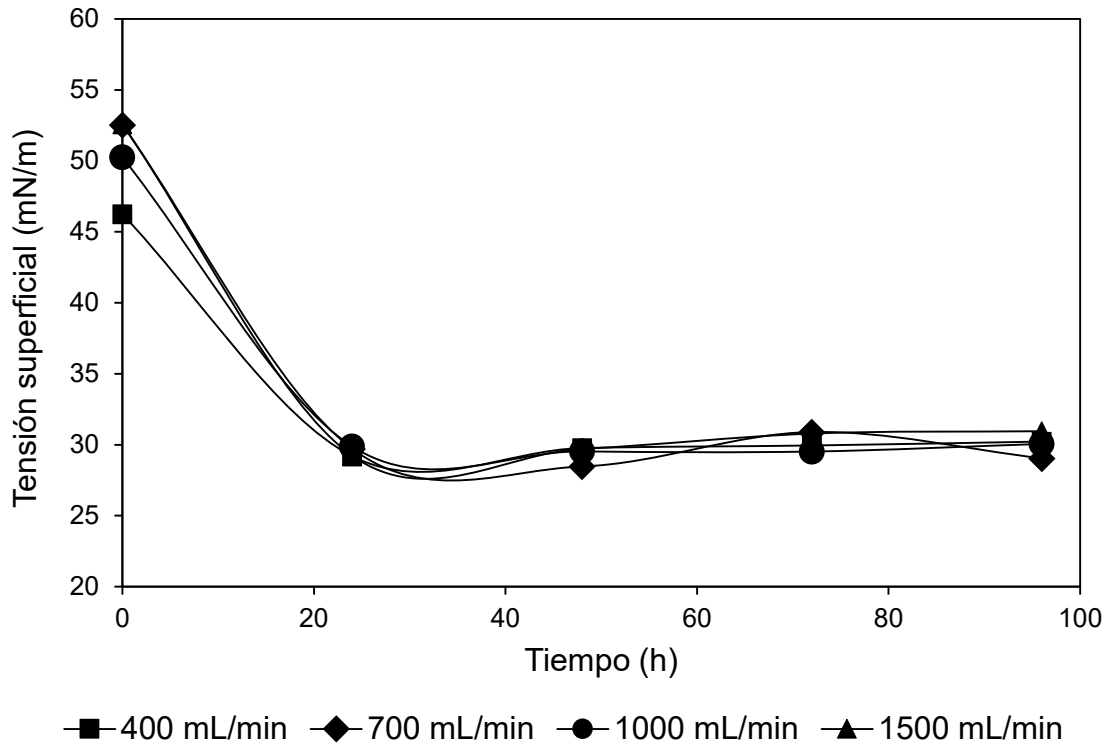


Figura 9.28 Evaluación de la producción de BS por la cepa IMP-K mediante la tensión superficial a diferentes aireaciones a nivel reactor.

En cambio con la dispersión de aceite (DA) se apreció una diferencia significativa entre los 4 flujos de aire evaluados (Fig. 9.29) para la producción de BS con la cepa IMP-K. Se observó que el biosurfactante obtenido con 1500 mL/min de aire produjo halos de dispersión de aceite similares a los obtenidos con aceite de soya en evaluaciones preliminares a nivel matraz con valores de 12 cm. Mientras que en el reactor con el flujo de 1000 mL/min se obtuvo la mayor dispersión de aceite en comparación con los otros flujos y la evaluación preliminar a nivel matraz, con 13 cm de DA desde la 24 h y hasta las 96 h. En los reactores con menor flujo de aireación (400 y 700 mL/min) los halos de dispersión disminuyeron significativamente alcanzando únicamente 4 cm a las 24 h para 700 mL/min y 48 h para los 400 mL de aire/min.

Entre la DA y TS se observó que existe una correlación indirectamente proporcional (Figs. 9.28 y 9.29), ya que mientras una aumentaba (DA) la otra bajaba (TS), con un periodo estable en ambos casos.

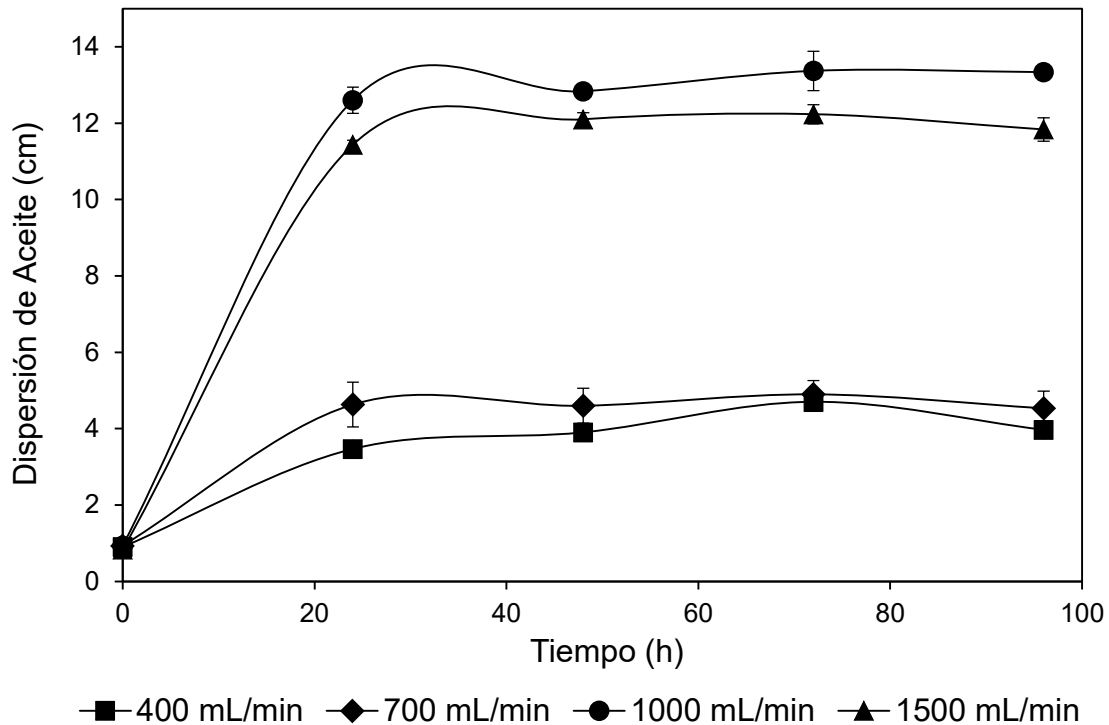


Figura 9.29 Evaluación de la producción de BS por la cepa IMP-K mediante la dispersión de aceite a diferentes aireaciones a nivel reactor.

Durante la experimentación en los reactores con mayor flujo de aireación (1000 y 1500 mL aire/min) hubo producción de espuma (Fig. 9.30), que se formó durante la fase exponencial y estacionaria, lo que concuerda con otros reportes sobre la producción de ramnolípidos en procesos aeróbicos con formación de espuma densa, por efecto de la aireación, agitación (Rashedi *et al.*, 2005). Por lo que, en el reactor se integró un colector de espuma en su salida gaseosa permitiendo la recolección de la espuma en un recipiente separado y con ésta se midió la tensión superficial. Con esta medición se corroboró que la espuma contenía biosurfactantes, con un valor de tensión superficial de 29 mN/m. Dicha espuma

puede ser un factor que altere la producción del biosurfactantes. De Lima *et al.*, (2009) mencionan que probablemente un alto grado de espumación limita la velocidad de aireación del sistema.



Figura 9.30 Cultivo de la cepa IMP-K en reactor tanque agitado con aceite de soya como sustrato, con aireación de 1000 mL/min donde hubo formación de espuma.

Con el BS contenido en el sobrenadante libre de células a diferentes tiempos, también se llevó a cabo la evaluación de la dilución micelar crítica (DMC), diluyendo con agua destilada, hasta encontrar la dilución en la que no cambiaba significativamente la TS. En la figura 9.31 se observa que el biosurfactante producido con una aireación de 1000 mL/min, tuvo la mejor DMC de 1:16, ya que mantuvo la estabilidad de la TS sin variación significativa con un valor aproximado de 30 mN/m, sobre todo con el sobrenadante de las 48 h. Aunque el sobrenadante de la aireación de 700 mL/min (Fig. 9.31B), también presentó un resultado similar, el biosurfactante evaluado fue de 96 h. En cambio con las otras aireaciones, la TS se mantuvo hasta una dilución de 1:4 sin cambio significativo.

En general, con las aireaciones de menor flujo (400 y 700 mL/min) se obtienen máximas concentraciones de biosurfactante con mayores tiempos de incubación (72 h y 96 h), mientras que con mayores flujos (1000 y 1500 mL) la mayor concentración de BS se obtuvo a las 24 y 48 h de incubación.

Este comportamiento muestra que el suministro de oxígeno en los reactores con menor aireación retrasa la producción del biosurfactante mientras una aireación elevada permite una producción más concentrada del biosurfactante en menores tiempos de incubación. Con estos resultados también se observa que se tiene una mayor concentración del biosurfactante con 1000 mL aire/min a un tiempo de 48 h.

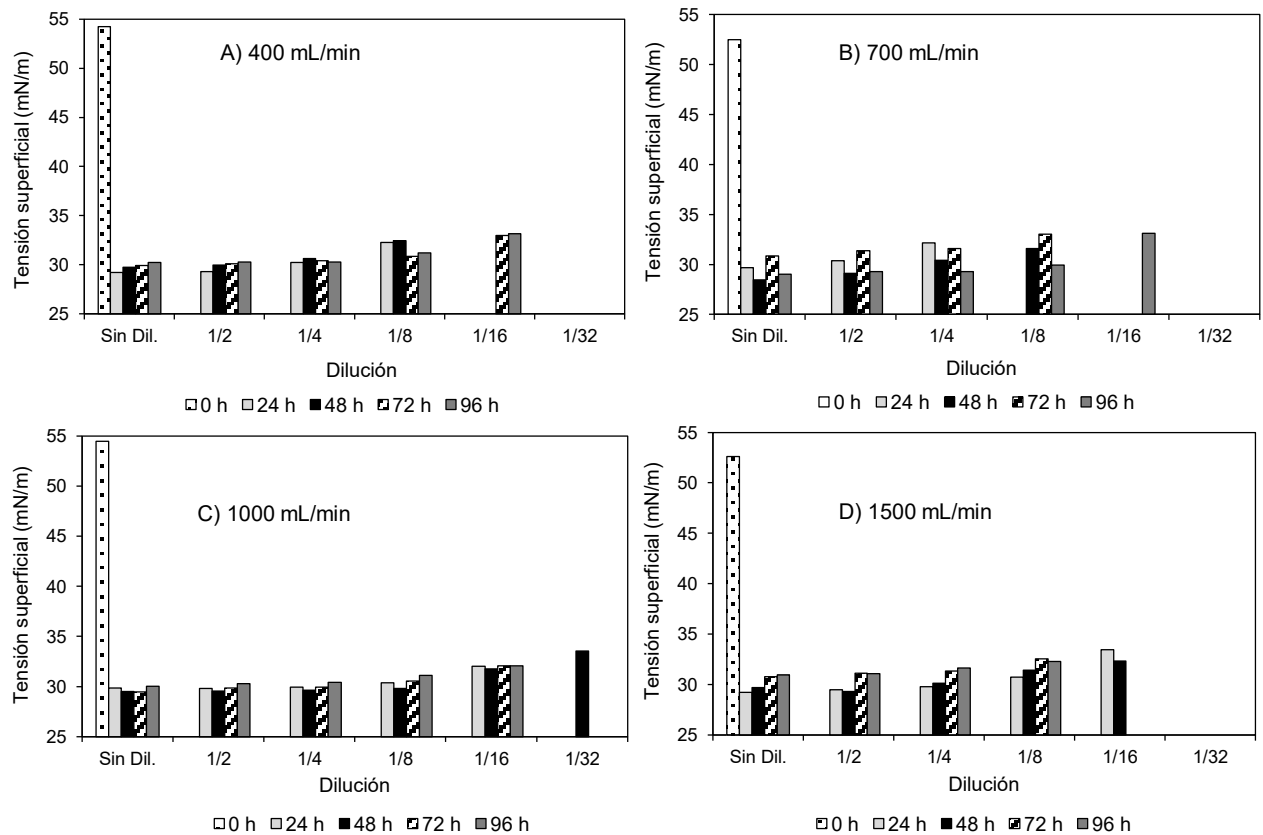


Figura 9.31 Evaluación de la tensión superficial con el sobrenadante libre de células del cultivo de la cepa IMP-K a diferentes tiempos de incubación y realizando diluciones.

9.5.1 Separación parcial del biosurfactante y rendimiento

Con el cultivo de las 48 h proveniente de los reactores a las diferentes aireaciones, se realizó la separación parcial del biosurfactante por liofilización, encontrando una producción de BS de 11.3, 10.0, 22.5 y 11.75 g/L para las aireaciones de 400, 700, 1000 y 1500 mL aire/min, respectivamente. Con estos bioproductos se determinó la concentración micelar crítica (CMC) (Fig. 9.32). Considerando la TS que se obtuvo a las diferentes concentraciones, el rendimiento de cada BS y la CMC, la mejor aireación fue de 1000 mL/ min, con una CMC de 1380 mg/L y una TS de 35 mN/m para la producción de BS con la cepa IMP-K a nivel reactor.

Este resultado se puede comparar con un estudio hecho por Tayebe *et al.* (2013) quienes obtuvieron una concentración del biosurfactante similar (20.9 g/L) con *Pseudomonas aeruginosa* MR01 utilizando aceite de soya como sustrato en reactor tanque agitado de 50 L con 1 vvm de aireación y 300 rpm de agitación. Cabe mencionar que esta concentración fue después de 200 h de incubación.

Otro estudio hecho por Mercadé *et al.* (1993), utilizando efluente de aceite de oliva como sustrato en reactor tanque agitado de 2 L, con 1 vvm de aireación y 1000 rpm de agitación obtuvieron una concentración máxima de 1.4 g/L de BS producido por *Pseudomonas aeruginosa* después de 150 h de incubación. En este caso la obtención del ramnolípido se hizo separándolo con n-hexano del medio y posteriormente con una precipitación ácida y una extracción con acetato de etilo. Por lo cual la producción de BS es menor al obtenido con la cepa IMP-K, en el cuál la separación fue parcial y el bioproducto crudo.

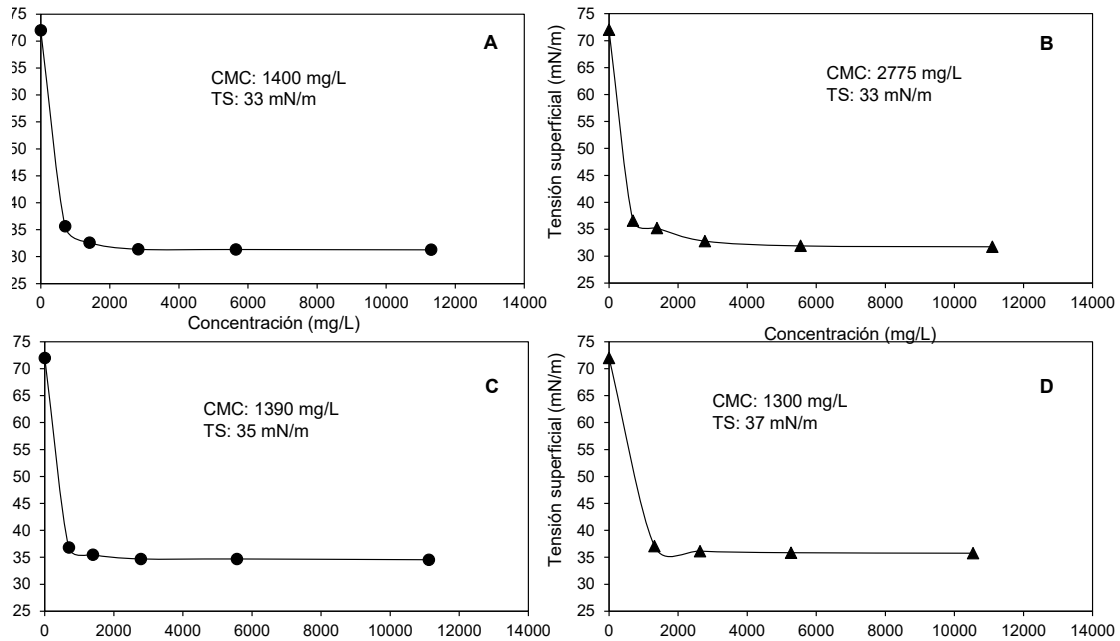


Figura 9.32 Evaluación de la TS a diferentes concentraciones de BS proveniente de las 48 h de cultivo de la cepa IMP-K a nivel reactor a diferentes aireaciones: A) 400, B) 700, C) 1000 y D) 1500 mL aire/min.

9.6 Cinética de crecimiento y producción de biosurfactante con la cepa IMP-K en reactor de tipo tanque agitado

Con la mejor aireación (1000 mL/min) para la producción de biosurfactante y condiciones establecidas en etapas anteriores del estudio (Sección 6.5) se llevó a cabo una cinética de crecimiento y producción de biosurfactante con la cepa IMP-K, con la finalidad de verificar el mejor tiempo de producción, así como determinar la actividad tensoactiva, concentración micelar crítica y el rendimiento del BS. Esta cinética se llevó a cabo utilizando dos sustratos, aceite de soya nuevo (AS) y aceite gastado de cocina (AGC). En las figura 9.33 a 9.43 se presentan los resultados de las dos cinéticas.

El crecimiento de la cepa IMP-K con ambos sustratos, indica que fue mejor con el AGC (Fig. 9.33), donde se obtuvo una biomasa de 3.2 g/L evaluada como proteína. Mientras que con el AS se obtuvo menos de la mitad del crecimiento, con tan solo 1.3 g/L de proteína. Aunque en ambas cinéticas se tuvo un perfil similar, con una fase exponencial hasta las 24 h y después de este tiempo una fase estacionaria. Esto concuerda con Benicasa *et al.* (2002) que mencionan que inicialmente la producción de biosurfactante se lleva a cabo en la fase de crecimiento exponencial, pero cuando el crecimiento microbiano cesa y se logra una fase estacionaria, la síntesis de ramnolípidos continúa, lo que sugiere una producción biosurfactante asociada al crecimiento microbiano, también como un metabolito secundario. Sin embargo, Hauser y Karnovsky (1991), demostraron que glicolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* fueron secretados en el medio durante la fase estacionaria cuando el nitrógeno estaba agotado en el medio. Otro estudio hecho por Van Hamme *et al.*, (2003) obtuvieron un aumento en la producción de ramnolípidos en la fase estacionaria sugiriendo la acumulación del biosurfactantes como metabolito secundario para este microorganismo. Es importante notar que para la cepa IMP-K la producción de biosurfactante no solo se da en la fase estacionaria, sino que inicia en la fase exponencial por lo que también está asociada al crecimiento microbiano.

Al evaluar las velocidad de crecimiento de la cepa IMP-K se observó que se tiene un crecimiento más rápido en aceite gastado de cocina, el cual tuvo una velocidad de crecimiento de (μ) 0.1256 h^{-1} con un tiempo de duplicación (t_d) de 5.51 h en comparación con el aceite de soya el cual presentó una velocidad de crecimiento (μ) de 0.1013 h^{-1} con un tiempo de duplicación (t_d) de 6.84 h.

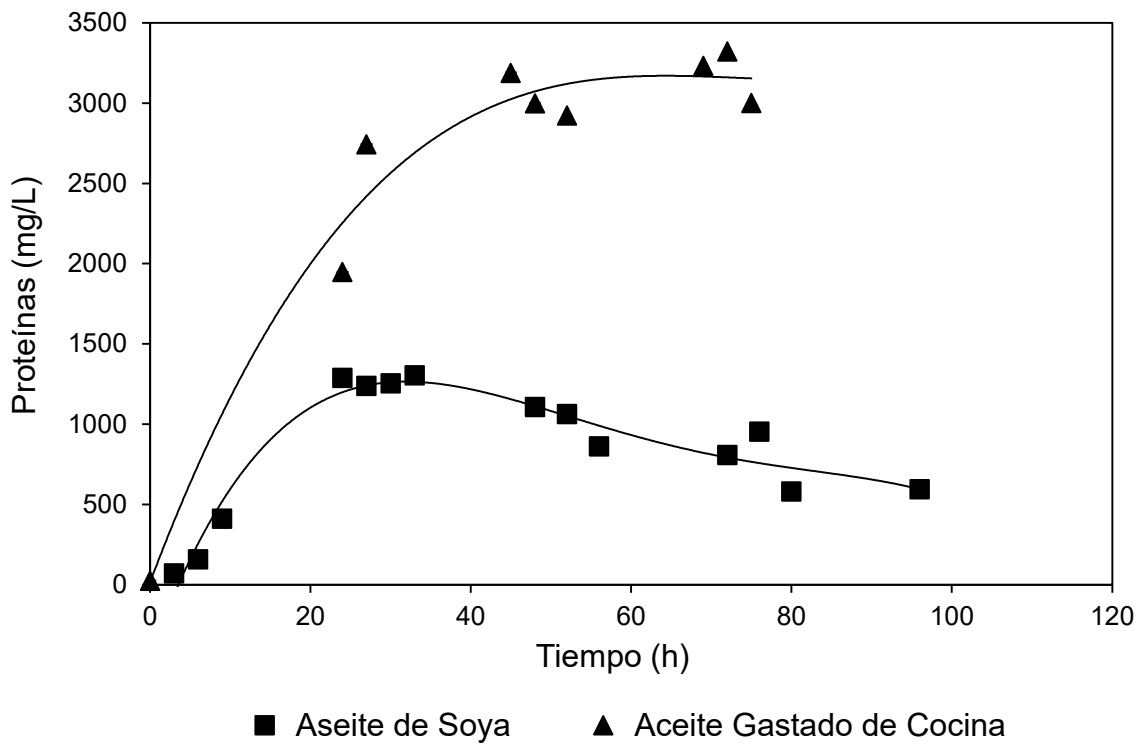


Figura 9.33 Cinética de crecimiento de la cepa IMP-K en reactor tanque agitado con dos sustratos aceite de soja nuevo (AS) y aceite gastado de cocina (AGC).

Además, durante la cinética con aceite de soja se observó en fresco, el caldo de cultivo con un microscopio de contraste de fases (Fig. 9.34), donde se puede ver la incorporación del sustrato (aceite de soja) a la fase acuosa conforme avanzaba el tiempo de experimentación hasta las 48 h. Conforme se producía el BS el sustrato se solubilizaba haciéndolo disponible para el microorganismo, ya que se observan mayor número de gotitas de aceite incorporados a la fase acuosa.

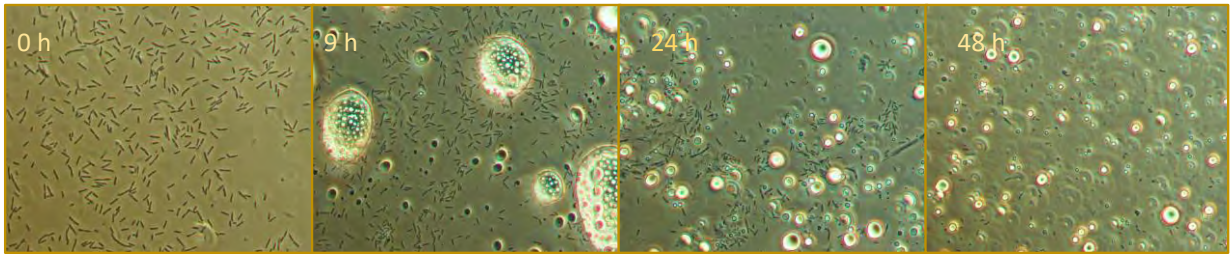


Figura 9.34 Observación microscópica en fresco de la cepa IMP-K, cultivada en reactor con aceite de soya nuevo (AS) hasta las 48 h de incubación, con microscopio de contraste de fases a 100X.

La producción de espuma se empezó a observar desde las 24 horas, la cual aumentó hasta el final del experimento (Fig. 9.35). La producción de espuma se ha visto como un inconveniente durante la producción de biosurfactantes (Chayabutra *et al.*, 2001; Reiling *et al.*, 1986), ya que el exceso de la espuma generada sale a través del ducto de la salida de aire y bloquea la salida de aire filtrado. Esto puede incrementar el riesgo de contaminación, disminución en la productividad y pone en peligro todo el proceso. Un control mecánico de la espuma es una alternativa a considerar; por ejemplo, adicionando un separador de esta (Müller *et al.*, 2010). Sin embargo algunos estudios sugieren que la producción de ramnolípidos participan activamente en la protección contra el estrés oxidativo de *Pseudomonas*, previniendo la entrada de oxígeno a través de la capa de espuma formada en la superficie (Kim *et al.*, 2003; Sabra *et al.*, 2002), por lo cual se puede ver como una oportunidad de la recuperación del biosurfactante a través de la espuma colectada, a la cual se le midió tensión superficial y para el caso de la cepa IMP-K fue de 28 mN/m.



Figura 9.35 Evolución del cultivo de la cepa IMP-K en reactor con aceite de soya nuevo (AS) durante 0, 8, 24, 48, 76,82 y 92 h.

En cuanto a la actividad tensoactiva (Fig. 9.36), las cinéticas mostraron un comportamiento similar al realizado en la evaluación previa con el mismo flujo de aire; donde se tuvo una TS promedio de 29 mN/m, que se alcanzó desde las 24 h y hasta el final de los experimentos para ambos sustratos. La producción del BS con ambos sustratos se inició desde las primeras horas, alcanzando una disminución máxima de la TS después de las 24 h. El perfil de la TS fue similar con ambos sustratos, con una TS mínima de 29 mN/m.

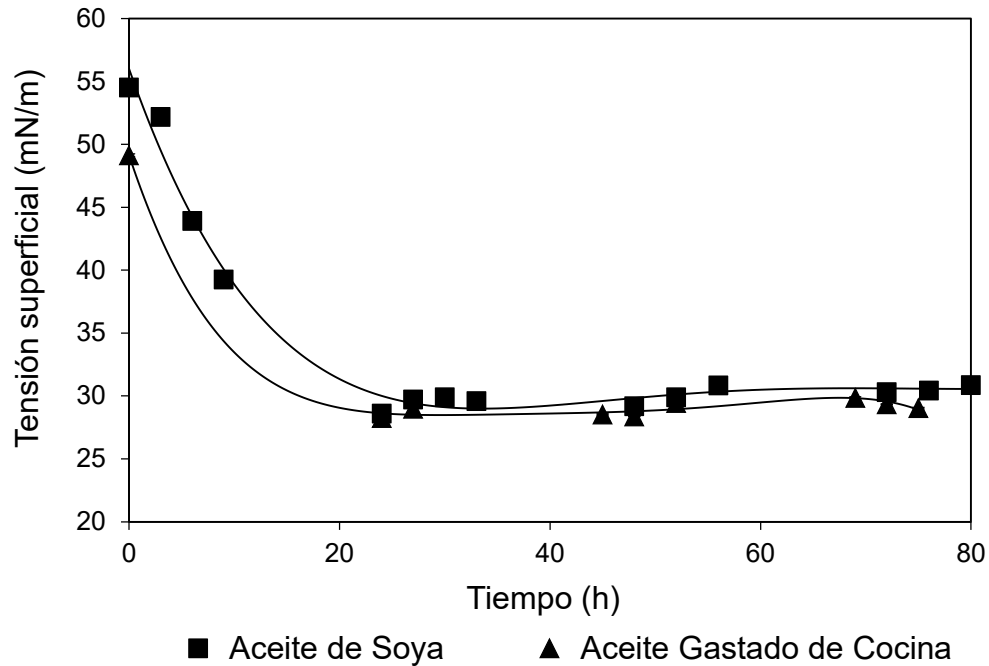


Figura 9.36 Cinética producción de biosurfactante con la cepa IMP-K, mediante la TS en reactor tanque agitado, con aireación de 1000 mL/min con aceite de soya (AS) y aceite gastado de cocina (AGC) como sustratos.

En cuanto a la DA se alcanzó el máximo halo de dispersión para ambos sustratos desde las 24 h (Fig. 9.37). Con el AGC fue ligeramente mejor con halos de 13.3 cm, mientras que con AS se alcanzó un máximo de DA de 11.6.

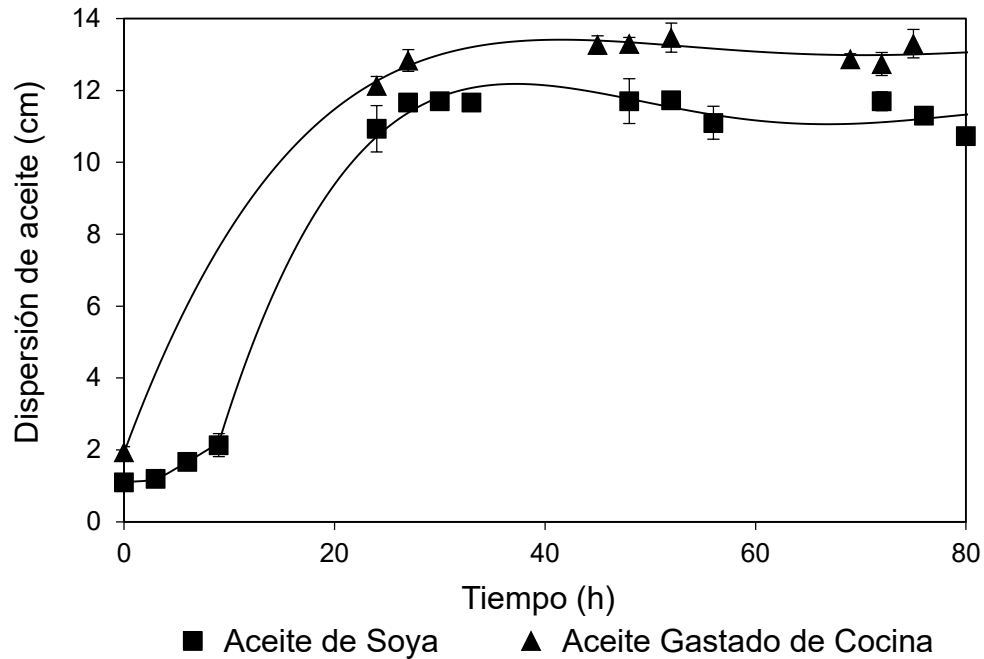


Figura 9.37 Cinética producción de biosurfactante con la cepa IMP-K, mediante la evaluación de DA en reactor tanque agitado, con aireación de 1000 mL/min con aceite de soya (AS) y aceite gastado de cocina (AGC) como sustratos.

En la figura 9.38 se observa un aumento gradual del halo de dispersión por efecto del biosurfactante producido por la cepa IMP-K en reactor con aceite de soya como sustrato, el halo comienza de 1 cm hasta alcanzar su máximo de 11.6 cm a las 52 h. Después comienza a disminuir ligeramente hasta las 96 h.

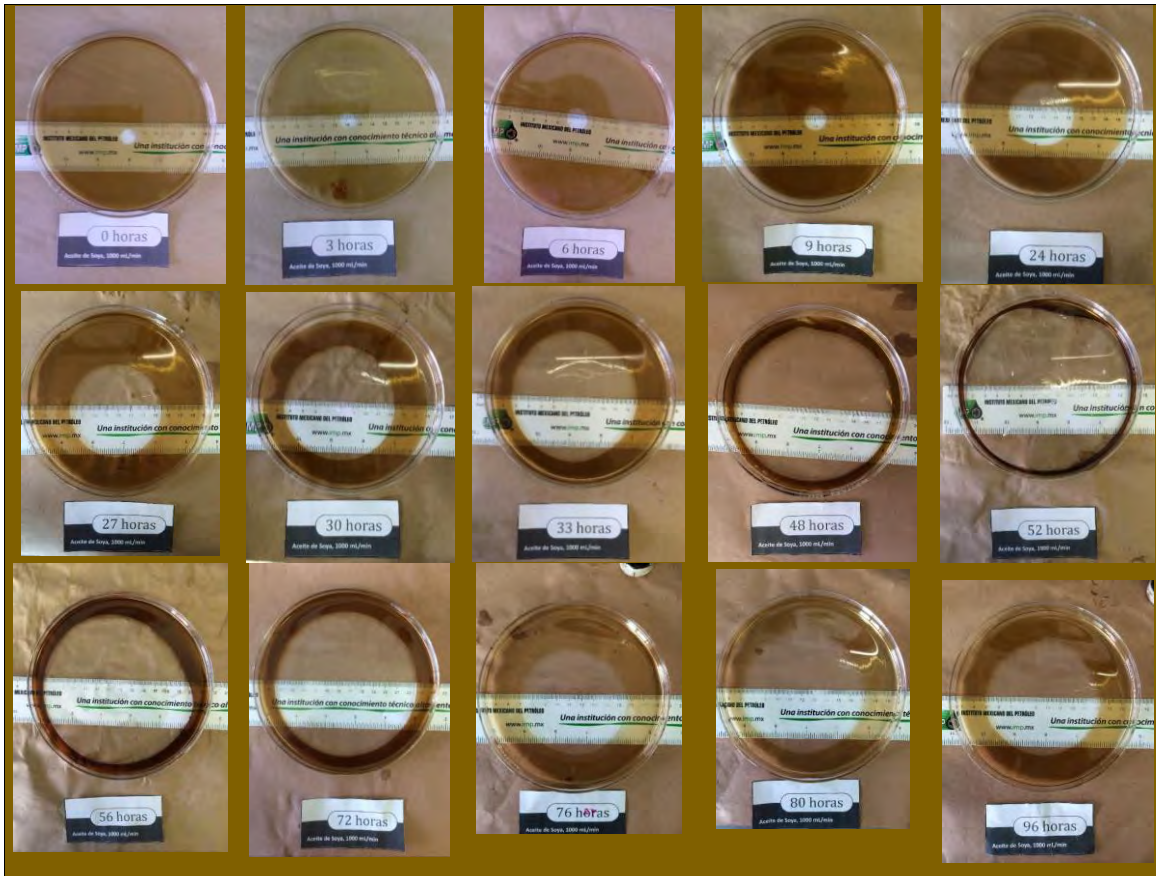


Figura 9.38 Evaluación de la dispersión de aceite con muestras del cultivo de la cepa IMP-K en reactor con aceite de soya como sustrato a diferentes tiempos de incubación

Con el BS contenido en el sobrenadante también se llevó a cabo la evaluación de la dilución micelar crítica (DMC) a diferentes tiempos con ambos sustratos (AS y AGC) al igual que en las cinéticas preliminares. En la figura 9.39 A se observa que el biosurfactante producido con AS, tuvo la mejor DMC de 1:8 con el sobrenadante de las 48 h, ya que mantuvo la TS sin variación significativa con un valor aproximado de 31 mN/m; en cambio en la cinética realizada con AGC (Fig. 9.39 B) se tuvo un mejor resultado con una DMC de 1:16 a las 48 h, con una TS de 31 mN/m y el la dilución 1:32 se obtuvo un TS de 32 mN/m. Esto puede ser indicativo, de que el microorganismo prefirió el aceite gastado de cocina para producir el BS. En general, con ambos sustratos se obtienen máximas concentraciones de biosurfactante a las 48 h de incubación.

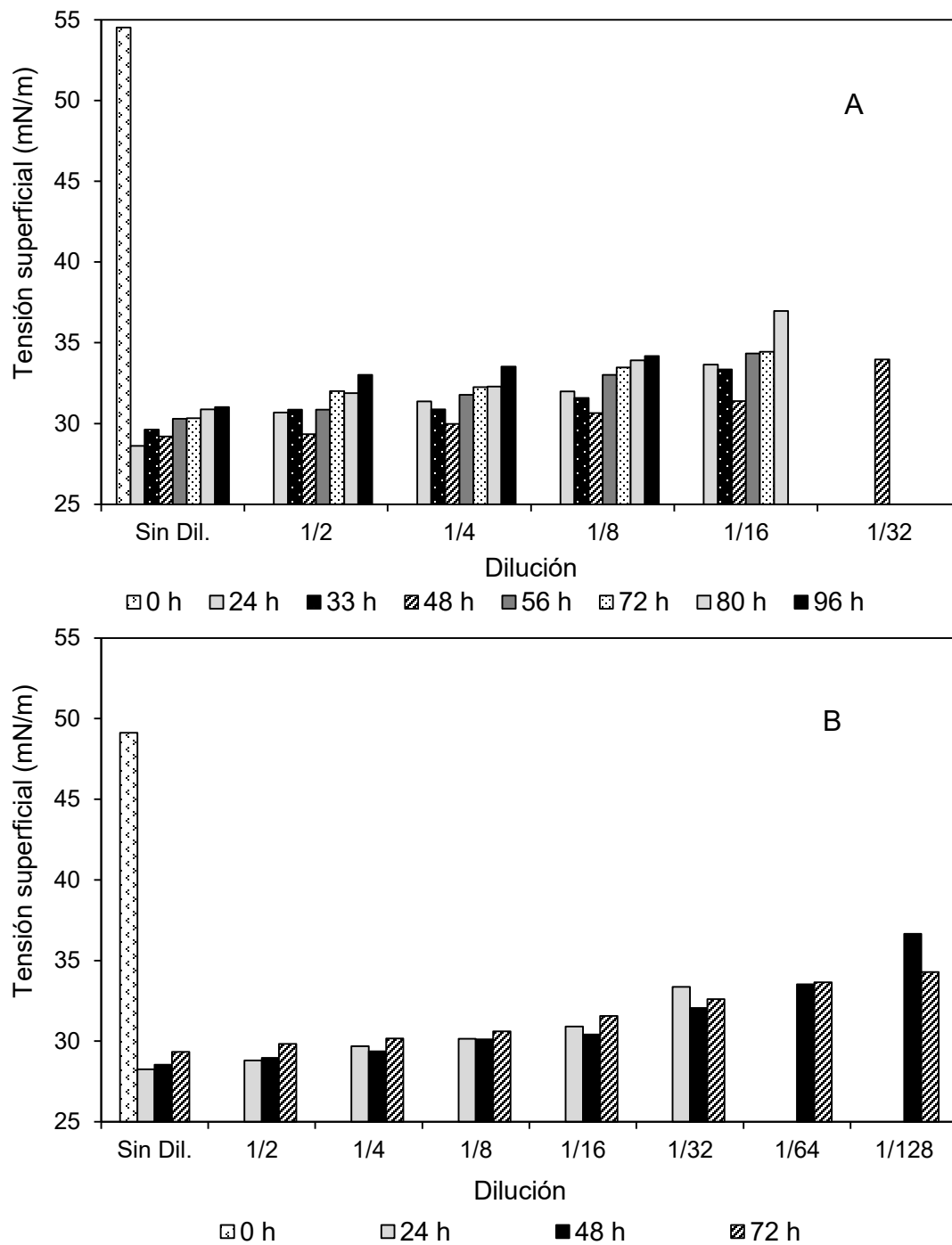


Figura 9.39 Evaluación de la tensión superficial con el sobrenadante libre de células del cultivo de la cepa IMP-K diluido y sin diluir a diferentes tiempos de incubación con dos sustratos: A) aceite de soya, B) aceite gastado de cocina.

El biosurfactante producido por la cepa IMP-K en reactor tanque agitado utilizando AS y AGC como sustrato fue parcialmente purificado como se indica en la sección 8.7. Al producto obtenido (polvo) se le evaluó su CMC (Figura 9.40). Se observó una CMC menor con el producto crudo liofilizado de AGC con un valor de 749 mg/L con una TS 30 mN/m en comparación con el AS el cual fue de 1554 mg/L con una TS 32 mN/m. Lo anterior reafirma que el aceite gastado de cocina es un mejor sustrato para la obtención de BS por la cepa IMP-K. Estos valores son comparables con un estudio realizado con *Pseudomonas aeruginosa* para la producción de biosurfactantes utilizando aceite de soya como sustrato, donde obtuvieron un valor de CMC de 800 mg/L (Suryanty *et al.*, 2009). Además, la CMC obtenida para ambos sustratos del presente trabajo, es mucho menor comparada con algunos surfactantes sintéticos, por ejemplo, dodecil sulfato de sodio (SDS) que presenta un valor de CMC de 2100 mg/L (Chen *et al.*, 2006).

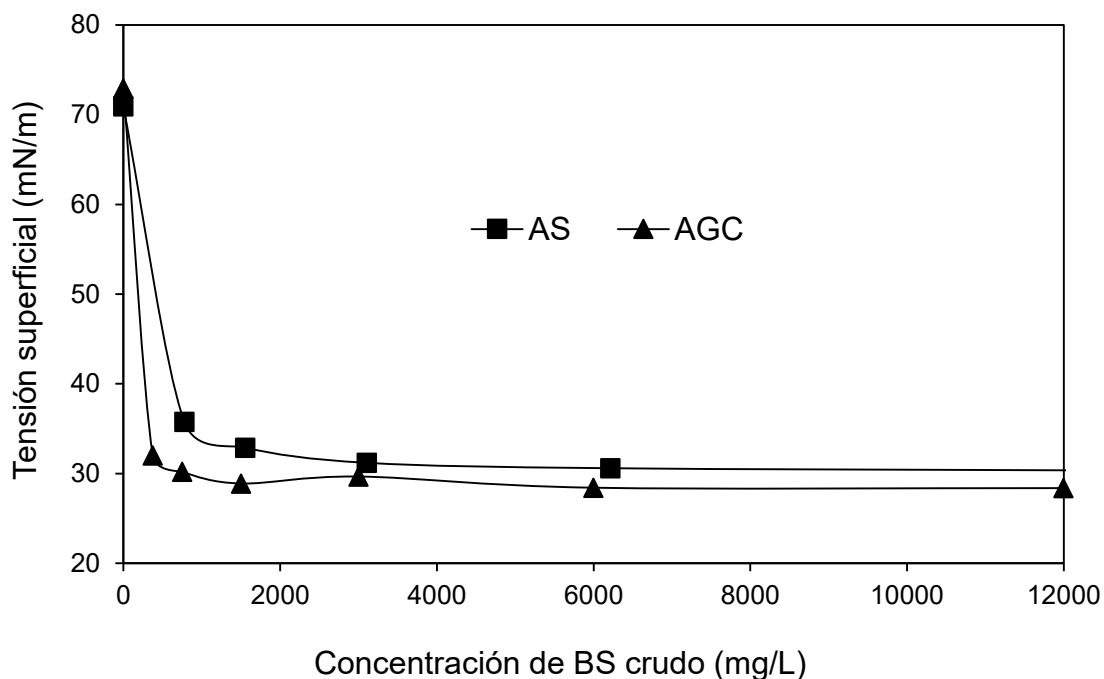


Figura 9.40 Evaluación de la Tensión Superficial con el producto parcialmente purificado (biosurfactante) de la cepa IMP-K con dos sustratos (AS y AGC) a diferentes concentraciones.

También se cuantificó el sustrato no consumido para ambas fuentes de carbono (AS y AGC) (Fig. 9.41), apreciándose que en el mejor tiempo (48 h) de producción de BS para el AS ya se había consumido el 56%; mientras que para el AGC sólo se consumió 40%. Al final de la cinética (96 h) el consumo de sustrato con AS fue del 86.5% y para el AGC de 52.3%. Lo anterior muestra que el consumo de sustrato de la cepa IMP-K es menor en AGC. Además, indica que las dos fuentes de carbono no parecen ser un sustrato limitante para su crecimiento.

Resultados similares fueron observados en un estudio con *Bacillus subtilis* LAMI005 para la producción del biosurfactante “surfactina” en un biorreactor de 4 L con glucosa (20 g/L) como sustrato; donde reportan una gran cantidad de sustrato residual (60%) al final del proceso (Davis *et al.*, 1999). Por lo que concluyeron que la producción de biosurfactante no estaba limitada por la fuente de carbono, ya que el sustrato no se consumió totalmente y la surfactina se incrementó hasta el final del proceso de fermentación, con una concentración máxima de 263.64 mg/L.

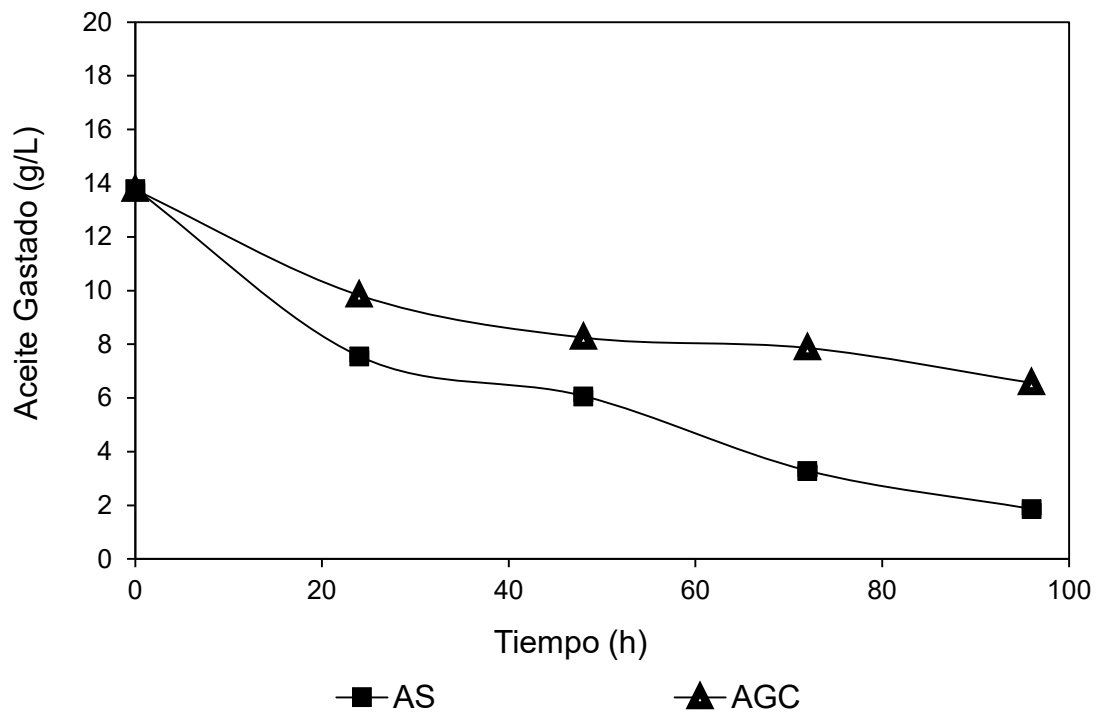


Figura 9.41 Evaluación del sustrato consumido durante el cultivo de la cepa IMP-K con AS y AGC en reactor.

Al cuantificar el BS obtenido durante las cinéticas con ambos sustratos (Fig. 9.42) se pudo apreciar que con el AGC se obtuvo mayor rendimiento (24 g/L) a las 48 h. En cambio con el AS se obtuvo casi la mitad (12.4 g/L) a las 48 h. Esto indica que la cepa IMP-K prefiere al AGC como sustrato para la producción de biosurfactante, ya que tiene una mejor producción de este bioproducto. Al utilizar este sustrato residual se disminuye el costo de producción del biosurfactante.

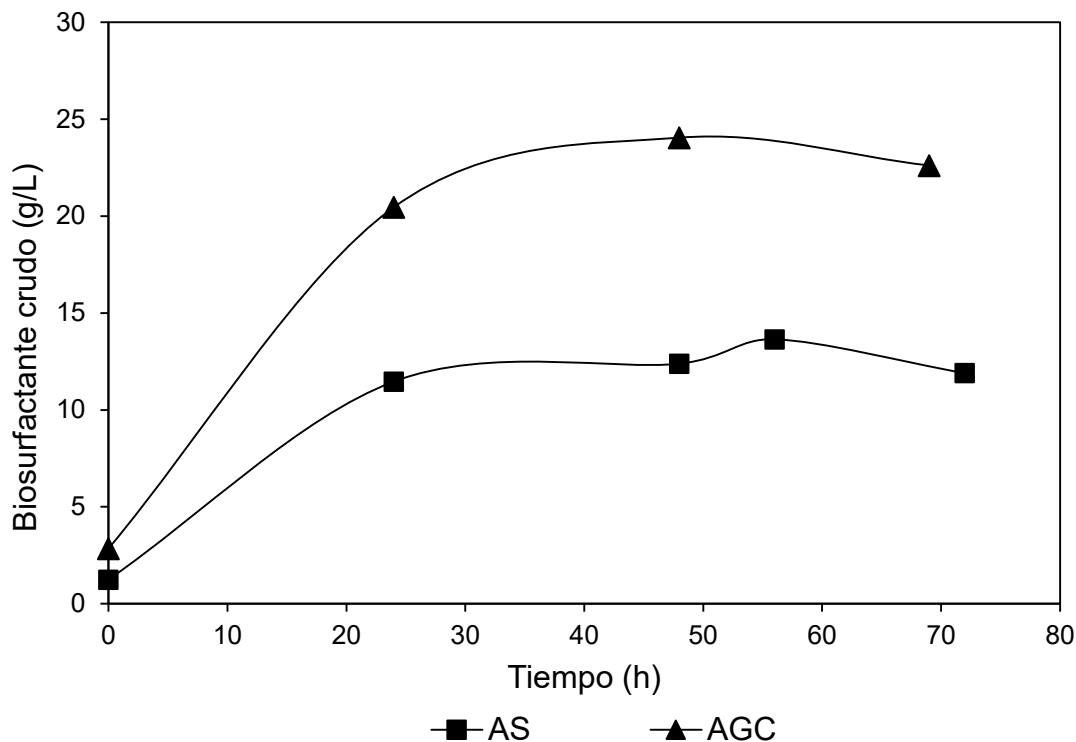


Figura 9.42 Evaluación del biosurfactante crudo obtenido por liofilización, proveniente del cultivo en reactor a las 48 h, con dos sustratos aceite de soya (AS) y aceite gastado de cocina (AGC).

Borges *et al.* (2015) trabajaron con el cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* en reactor en lote a 30°C para la producción de ramnolípidos, utilizando glucosa como fuente de carbono, evaluaron diferentes aireaciones y agitaciones encontrando que la mejor condición fue 1.2 vvm y 600 rpm con un rendimiento de ramnolípidos de 5.37 g/L y TS de 25.6 mN/m a las 48 h. Esta producción es menor a la obtenida en este trabajo (24 g/L), debido a que estos autores realizaron una separación por precipitación con ácido y extracción con ácido tioglicólico y en el caso de la cepa IMP-K la separación fue parcial obteniendo un producto crudo.

En otro trabajo realizado con *Pseudomonas aeruginosa* PACL para la producción de biosurfactante, obtuvieron 3.3 g/L de ramnolípidos con una aireación de 0.5 vvm,

550 rpm, a 30° C y utilizando aceite de soya como fuente de carbono (De Lima *et al.*, 2009). Este ramnolípido separado y extraído del cultivo de reactor a las 54 h produjo una TS de 26.0 mN/m. Los resultados de este trabajo muestran que cuando el biosurfactante se separa y extrae parcial o totalmente, la cantidad que se obtiene de este bioproducto es menor.

En comparación con otros estudios los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a TS, TI y concentración de biosurfactante (28 mN/m, 1 mN/m y 24 g/L) muestran claramente la eficiencia de la producción de biosurfactante por la cepa IMP-K.

9.6.1 Rendimiento del proceso

Para determinar el rendimiento del producto crudo parcialmente purificado se realizaron algunas consideraciones:

- El contenido de proteína microbiana equivale al 50 % del peso seco de la célula (Madigan, 2012).
- La biomasa microbiana está constituida aproximadamente del 45-50% de carbono (Quintero, 1990).
- En la literatura está reportado que *Pseudomonas aeruginosa* produce biosurfactantes del tipo ramnolípidos (Soberón, 2011), los cuales se producen en una mezcla de mono y di-ramnolípidos y sus diferentes isómeros. Debido a que no se tenía la caracterización química del biosurfactante producido por la cepa IMP-K, se tomó en cuenta la anterior información, pero considerando la fórmula condensada de un ramnolípido promedio: $C_{32}H_{58}O_{13}$ (Ricalovic *et al.*, 2011).

La estimación del rendimiento para el producto parcialmente purificado (Anexo 3) con AS como sustrato arrojó un rendimiento de biomasa con respecto al consumo de sustrato ($Y_{X/S}$) de 0.193, un rendimiento de producto con respecto al consumo de sustrato ($Y_{P/S}$) de 0.4255 y un rendimiento de otros productos ($Y_{\text{Otros productos}}$) de 0.3810. Para AGC el valor de $Y_{X/S}$ fue de 0.4910, y el de $Y_{P/S}$ de 0.7740. Estos resultados muestran que es más efectivo el AGC para la producción de biosurfactante con la cepa IMP-K.

Santa Anna *et al.* (2002) utilizaron *Pseudomonas aeruginosa* PA1 con glicerol como sustrato y obtuvieron un rendimiento de $Y_{P/S} = 0.13$, la cuantificación del BS fue solamente con el cultivo libre de células y evaluación sobre la parte carbohidratada (ramnosa) del biosurfactante producido. Otro estudio hecho por Haba *et al.*, (2000) utilizando el mismo microorganismo con aceite gastado de cocina obtuvieron un valor de $Y_{P/S}$ de 0.34. El BS fue medido como ramnosa. Los resultados de este trabajo y los obtenidos con la cepa IMP-K demuestran que la producción de BS es mejor con sustratos residuales. Por otro lado, con la cepa IMP-K se obtuvieron mejores rendimientos de producto con respecto al consumo de ambos sustratos (AGC y AS) comparados con los rendimientos obtenidos por Santa Anna *et al.* (2002) y Haba *et al.*, (2000) con sustratos similares (un sustrato nuevo y aceite gastado de cocina, respectivamente).

9.7 Evaluación de la efectividad del BS después de su almacenamiento

Al BS producido a nivel reactor contenido en el sobrenadante, se le evaluó su efectividad mediante la determinación de tensión superficial (Fig. 9.43) después de 8 meses en conservación a 4°C. Los resultados muestran que el BS producido por la cepa IMP-K conserva su actividad tensoactiva con valor de 29 mN/m en promedio, después de su almacenamiento. Lo cual indica su estabilidad para ser conservado en refrigeración durante su uso.

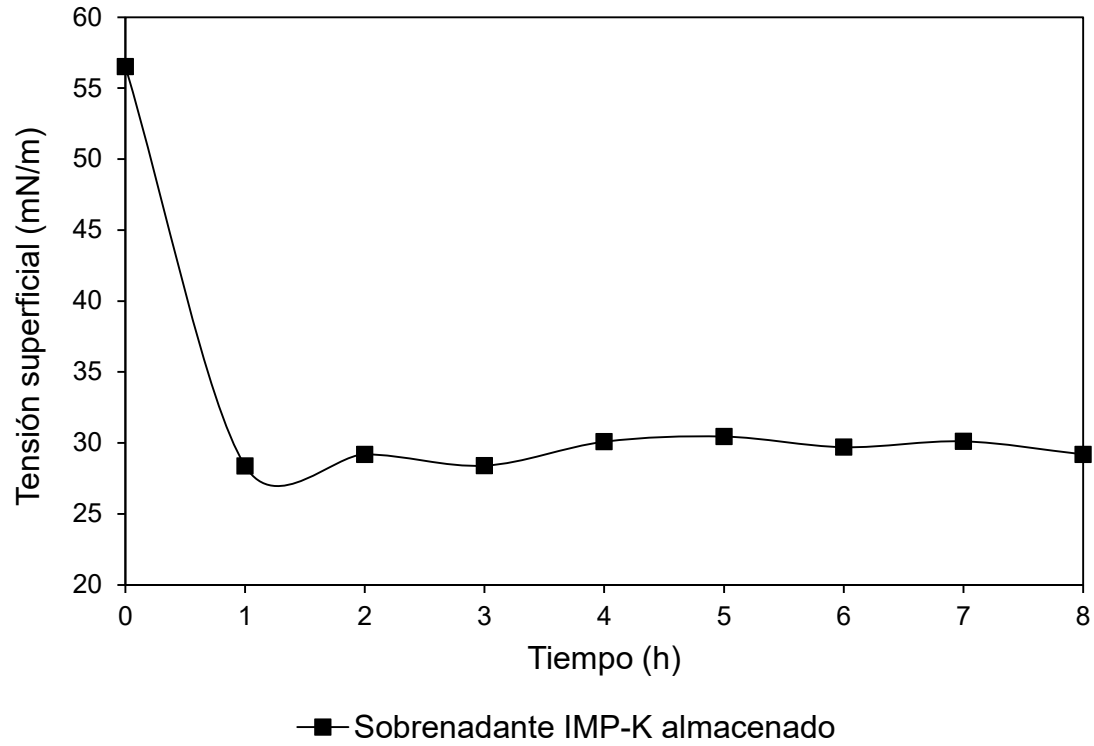


Figura 9.43 Evaluación de la actividad tensoactiva del BS producido por la cepa IMP-K con AS como sustrato, contenido en el sobrenadante durante su almacenamiento en refrigeración.

10. CONCLUSIONES

- La cepa IMP-K se reactivó satisfactoriamente y se corroboró su pureza, mostrando capacidad de crecer en sustratos aceitosos.
- La cepa IMP-K es un microorganismo Gram negativo con forma bacilar, capaz de producir biosurfactantes cuando se cultiva con aceite de soya y aceite gastado de cocina como sustratos.
- A nivel matraz el biosurfactante producido por la cepa IMP-K es capaz de reducir la tensión superficial hasta valores de 28 mN/m y provocar dispersión de aceite de hasta 12 cm.
- A nivel matraz la DMC se obtuvo con una dilución de 1:6 con ambos sustratos (ASY AGC), manteniendo la TS en valores de 29-31 mN/m sin diferencia significativa.
- A nivel matraz la mayor producción de biosurfactante se obtuvo desde las 24 h cuando se utiliza aceite de soya y a las 48 h con aceite gastado de cocina como sustratos.
- La presencia o ausencia de oxígeno afecta el crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-K, favoreciéndose con las mayores concentraciones de este gas y disminuyendo en condiciones anaerobias.

- La temperatura afecta el crecimiento y producción de BS para la cepa IMP-K, siendo mejor la producción a 30° C. En cambio la temperatura de 50° C inhibe el crecimiento y la producción de biosurfactante.
- El biosurfactante producido por la cepa IMP-K tuvo la capacidad de formar emulsiones con el aceite pesado, aunque con un porcentaje bajo (22.8%). Este biosurfactante también fue capaz de reducir la TI de un aceite pesado hasta 0.8 mN/m. La mayor disminución de la TI (90%) se logró con los tratamientos a 30° C con salinidad (50 g/L NaCl) y 60° C sin sal. Con esto se muestra el potencial de aplicación de los biosurfactantes producidos por las cepa IMP-K en la recuperación de hidrocarburos.
- El escalamiento de la producción de biosurfactante con la cepa IMP-K de matraz a reactor tipo agitado fue factible, se obtuvieron resultados similares que los obtenidos a nivel matraz con ambos sustratos en cuanto a TS (28 mN/m), pero con un incremento en la actividad dispersante hasta 13.3 cm en aceite gastado de cocina.
- La aireación afectó la producción de biosurfactante cultivado con aceite de soya como sustrato , siendo mejor 1000 mL/min, con una TS a 48 h de 28 mN/m y DA de 13.3 cm y con una CMC 1300 mg/L.
- El aceite gastado de cocina es un mejor sustrato para la producción de BS con la cepa IMP-K, con un rendimiento de 24 g/L de producto crudo en comparación con el aceite de soya cuyo rendimiento fue 12.4 g/L.
- La cepa IMP-K es capaz de producir BS con aceite de soya nuevo y con aceite gastado de cocina. Por lo tanto el aceite gastado de cocina es una

fuente alternativa económica y viable para la producción de biosurfactante, por lo tanto con este sustrato se pueden disminuir los costos de producción.

11. PERSPECTIVAS A FUTURO

- Realizar el escalamiento para la producción del BS a nivel industrial, empezando por realizar el crecimiento del microorganismo y producción de BS en un reactor a escala piloto.
- Evaluar el efecto de la agitación a nivel reactor sobre la producción de BS con la cepa IMP-K.
- Evaluar concentraciones mayores de aceite residual como sustrato y determinar si el microorganismo es capaz de consumir mayores cantidades de este sustrato y producir mayor biosurfactante.
- Evaluar más detalladamente la producción del biosurfactante en la espuma producida, ya que se vio un concentrado del BS alto en ésta. También se debe evaluar su obtención mediante un reciclador de espuma integrado, fraccionando la espuma producida.
- Evaluar la producción de BS utilizando otros tipos de alimentación de nutrientes al reactor, con una alimentación continua o intermitente.
- Realizar la purificación y caracterización química del BS.
- Evaluar el efecto del BS sobre diferentes tipos de aceites determinando el efecto tensoactivo que provocan o mediante la modificación de las propiedades reológicas de los aceites.
- Evaluar la aplicación del BS en sistemas de recuperación en medio poroso impregnados con hidrocarburo.

- Estudiar la estabilidad del BS a diferentes temperaturas, y salinidades.
- Considerar utilizar el BS junto con otros compuestos, como polímeros y álcalis, para potenciar su eficiencia en la recuperación de hidrocarburos.

12. REFERECIAS

- Abalos, A.; Pinaso, A.; Infante, M.R.; Casals, M.; García, F. and Manresa, A. (2001). Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*. Vol. 17, p. 1367-1371.
- Abbasi, H., Hamed, M. M., Lotfabad, T. B., Zahiri, H. S., Sharafi, H., Masoomi, F., Moosavi-Movahedi, A. A., Ortiz, A., Amanlou, M., Noghabi, K. A. (2012), Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant, *J. Biosci. Bioeng.*, 113 (2) 211-219.
- Abbasi H, Noghabib KA, Hamedia MM, Zahiri HS, Moosavi-Movahedi AA, Amanlou M, Teruel JA & Ortiz A (2013) Physicochemical characterization of a monorhamnolipid secreted by *Pseudomonas aeruginosa* MA01 in aqueous media. An experimental and molecular dynamics study. *Coll. Surf. B: Biointerf.* 101:256– 265.
- Abirami Sivasubramani, Radhathirumalaiarasu Selvaraj (2015) Isolation, Screening and Production of Biosurfactant by *Pseudomonas Aeruginosa* SD4 Using Various Hydrocarbon Sources *International Journal of Science and Research (IJSR)* Volume 6 Issue 2
- Abushady H.M., Bashandy A.S., Aziz N.H., Ibrahim M.M. (2005). Molecular characterization of *Bacillus subtilis* surfactin producing strain and the factors affecting its production. *Int. J. Agriculture Biol.* 7 (3): 337-344.
- Adamczak M., Bednarski W. (2000). Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactans produced by *Candida antartica*. *Biotechnol Letter.* 22: 313-316.
- Amani H., Müller M.M. (2013) Production of microbial rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* MM1011 for *ex situ* enhanced oil recovery. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170: 1080-1093.

- Amani, H., Sarrafzadeh, M. H., Haghghi, M., Mehrnia, M. R., (2010), Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications, *J. Pet. Sci. Eng.*, 75, 209-214.
- Anandaraj B., Thivakaran P., (2010) Isolation and production of biosurfactant producing organism from oil spilled soil, *J. Biosci. And Technol*, 1(3): 120-126.
- Banat I.M. (2000). Biosurfactants, more in demand than ever. *Biofutur*. 198, 44–47.
- Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth T & Marchant R (2010) Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:427– 444.
- Banat, I. M., Perfumo, A. & Marchant, R. (2008). Potential applications of biosurfactants in tackling environmental issues related to oil Industries. School of Biomedical Sciences, University of Ulster, 1-8.
- Banat, I. M., Satpute, S. K., Cameotra, S. S., Patil, R., & Nyayanit, N. V. (2014). Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in Microbiology*, 5, 697.
- Batista S.B., Munteer A.H., Amorim F.R., Tótolá M.R. (2006) Isolation and characterization of biosurfactant / bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites, *Bioresour. Technol.*, 97: 868–875.
- Benincasa M., Accorsini F.R. (2008) *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. *Bioresour. Technol.* 99: 3843–3849.
- Benincasa, M., Contiero, J., Manresa, M. A., & Moraes, I. O. (2002). *Journal of Engineering*, 54, 283– 288.
- Benincasa, M., Contiero, J., Manresa, M. A., Moraes, I. O., (2002), Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source, *J. Food Eng.*, 54(4), 283-288.
- Boatella, J., Codony, R., Rafecas, M., Guardiola, F. (2000) Recycled cooking oils: Assessment of risks for public health en European Parliament STOA Programme., Chambers, G., (ed.), European Parliament, Directorate General for Research. Luxembourgg, Septiembre, pp. 64

- Borges, W. S., Moura, A. A. O., Coutinho Filho, U., Cardoso, V. L., & Resende, M. M. (2015). optimization of the operating conditions for rhamnolipid production using slaughterhouse-generated industrial float as substrate. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 32(2), 357-365.
- Bryant RS. (1987) Potential uses of microorganisms in petroleum recovery technology. Proc. Okla. Acad. Sci. 67: 97-104. Comisión Nacional de Hidrocarburos. (2012). (DT-4) El Futuro de la Producción de Aceite en México: Recuperación Avanzada y Mejorada IOR-EOR. México: SENER.
- Bryant S.L., Lockhart T.P. (2002) Reservoir engineering analysis of microbial enhanced oil recovery. SPE Reservoir Eval. Eng. 5:365-374.
- Cameotra SS, Makkar RS. (2004). Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. Curr. Opin. Microbiol. 7: 262-266.
- Cardoso F. G., Fonseca A.P.F., Nele M., Zarur C.M.A., (2010), Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*, J. Biomedicine Biotechnol, 1-8.
- Centeno da Rosa, C. F., Michelon, M., Burkert, J. F. D. M., Kalil, S. J., Veiga Burkert, C. A., (2010), Production of a rhamnolipid-type biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* LBM10 grown on glycerol, Journal of Biotechnology, 9(53): 9012-9017.
- Chayabutra C, Wu J, Ju LK (2001). Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrates. Biotechnol. Bioeng. 72: 25–33.
- Chen, J., Wang, X. J., Hu, J. D. and Tao, S., Effect of surfactants on biodegradation of PAHs by white-rot fungi. Environ. Sci., 27, 154 (2006).
- Christofi N & Ivshina IB (2002) Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. J. Appl. Microbiol. 93: 915–929.
- Connolly, H. E., Pattanathu, K.S.M., Banat, Ibrahim and Lord, R. A. (2010) Resource recovery and reduction of oily hazardous wastes via biosurfactant washing and bioremediation. In: Trends in Bioremediation and Phytoremediation. Research Signpost, pp. 157-172. ISBN 978-81-308-0424-8

- Darvishi P, Ayatollahi S, Mowla D, Niazi A (2011) Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPP1-2. *Coll and surf. B: Biointerfaces* 84(2):292–300
- Davies, K. J., D. Lloyd, and L. Boddy. (1989). The effect of oxygen on denitrification in *Paracoccus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 135:2445-2451.
- Davis, D. A., Lynch, H. C. and Varley, J., (1999) The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enzyme Microb. Technol.*, 25, 322-329.
- De Lima C., Ribeiro E., Sérvulo E., Resende M., Cardoso V. (2009). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* grown in residual soybean oil. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 152: 156–168.
- Desai J & Banat I (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(1): 47–64.
- Doran P. (1995) *Bioprocess Engineering Principles*, Elsevier Science & Technology Books, Australia.
- Evans, Gareth and Furlong, Judith (2003). *Environmental Biotechnology: Theory and Application*. England: John Wiley & Sons Ltd., p. 302.
- Francy D.S., Thomas J.M., Raymond R.L. y Ward C.H. (1991). Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *J. Ind. Microbiol.* 8, 237–245.
- Gautam K.K. y Tyagi V.K. (2006). Microbial surfactants: a review. *J. Oleo Sci.* 55, 155-166.
- Guerra-Santos, L., Käppeli, O., Fiechter, A., (1984), *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source, *Applied and Environmental Microbiology*, 48(2), 301-305.
- Haba E., Espuny M.J. Busquets M. y Manresa A. (2000). Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB40044 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 379-387.
- Hauser G, Karnovsky ML. Rhamnose and rhamnolipide biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 1957; 224:91-105.

- Hudak A & Cassidy D (2004) Stimulating In-Soil Rhamnolipid Production in a Bioslurry Reactor by Limiting Nitrogen. *Biotechnol. Bioeng.* 88: 7.
- Ibrahim M.L., Ijah U.J.J., Manga S.B., (2013). Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. *International Biodeterioration and biodegradation.* El Sevier.
- Ivshina I, Kuyukina M, Philp J & Christo N (1998) Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 711-717.
- Jiménez D, Medina S & Gracida J (2010) Propiedades, Aplicaciones Y Producción De Biotensoactivos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 26(1):65-84.
- Kaskatepe, Banu, & Yildiz, Sulhiye. (2016). Rhamnolipid Biosurfactants Produced by *Pseudomonas Species*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59, e16160786. Epub June 27, 2016.
- Kearns DB, Losick R. 2003. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 49: 581-590.
- Kim EJ, Sabra W, Zeng AP (2003). Iron deficiency leads to inhibition of oxygen transfer and enhanced formation of virulence factors in cultures of *Pseudomonas aeruginosa PAO1*. *Microbiol.* 149: 2627–2634.
- Kim H. S., Jeon J.W., Kim B.H., Ahn C.H., Oh C.H. y Yoon B.D. (2006). Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biot.* 70, 391-396.
- Kiran G.S., Hema T.A, Gandhimathi R., Selvin J., Thomas A., Ravji T.R., Natarajaseenivasan K. (2009) Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* 73: 250–25.
- Koch A.K., Kappeli O., Fiechter A., and Reiser J. (1991). Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J. Bacteriol.* 173(13): 4212-4219.
- Kosaric N. (1992) Biosurfactants in industry. *Pure & appl Chem* 64:1731-1737.
- Lang S, Wullbrandt D. 1999. Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:22-32.

- Lazar, IG Petrisor, TF Yen. (2007). Recuperación mejorada de petróleo Microbiana (Meor) Mascota. Sci. Technol., pp. 1353 hasta 1366.
- Lin SC, Chen Y & Lin Y (1998) General approach for the development of high-performance liquid chromatography methods for biosurfactant analysis and purification. J. Chromatogr. A 825:149–159.
- Lovaglio RB, dos Santos FJ, Jafelicci M, Contiero J. (2011). Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. Colloids Surf. B Biointerfaces 85:301–305
- Madigan M. T., Martinko J. M., Dunlap P.V., Clark D. P. (2008). Brock Biología de los microorganismos, 13ª Edición, Pearson Education, Inc., Benjamin Cummings, San Francisco.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Dunlap P.V., Clark D. P. (2012). Brock Biología de los microorganismos, 13ª Edición, Pearson Education, Inc., Benjamin Cummings, San Francisco.
- Madsen, J. K., Pihl, R., Møller, A. H., Madsen, A. T., Otzen, D. E., & Andersen, K. K. (2015). The anionic biosurfactant rhamnolipid does not denature industrial enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 6, 292.
- Magot, M.; Ollivier, B. y Patel, B. (2000). Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek*. 77 (2): 103–116.
- Makkar R, Cameotra S & Banat I (2011) Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express* 1:5.
- Mata-Sandoval, Karns & Torrents (2001) Mata-Sandoval JC, Karns J, Torrents A. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. *Microbiological Research*. 2001;155:249–256.
- Mercadé, M. E., Manresa, E. A., Robert, M., Espuny, M. J., Andrés, C., Guinea, J., (1993), Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production, *Bioresour Technol*, 43:1–6
- Morikawa M., Daido H., Takao T., Murata S., Shimonishi Y. y Imanaka T. (1993). A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *J. Bacteriol.* 175, 6459–6466.

- Moussa, T. A. A., Mohamed, M. S., & Samak, N.. (2014). Production and characterization of di-rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31(4), 867-880.
- Muller MM, Hormann B, Sylatk C, Hausmann R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. *Appl Microbiol Biotechnol*; 87:167–174.
- Müller M, Küglera J, Henkela M, Gerlitzki M, Hörmanna B, Pöhnleina M, Sylatkka Ch & Hausmannb R (2012) Rhamnolipids—Next generation surfactants?. *J. Biotechnol.* 162(4): 366–380.
- Mulligan C.N. (2005) Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollution.* 133: 183–198.
- Mulligan CN, Yong RN, Gibbs BF. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: A review. *Eng. Geol.* 2001;60: 371–380.
- Nitschke M., Costa S.G.V. y Conteiro J. (2005). Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnol. Prog.* 21, 1593-1600.
- Nitschke M., Costa S.G.V., Haddad R., Gonçalves L.A.G., Eberlin M.N. y Conteiro J. (2005). Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. *Biotechnol. Prog.* 21, 1562-1566.
- Nur Asshifa MN, Salwa MS and Ahmad RamLi MY (2012) Fed-batch cultivation of *Pseudomonas aeruginosa* USM-AR2 producing rhamnolipid in bioreactor through pulse feeding strategy. *International Conference on Biological and Life Sciences (ICBLS 2012)*, Singapore.
- Ochsner, U. A., K. Koch, A. Fietcher, & J. Reiser, (1994). Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 176: 2044-2054.
- Okoliegbe I.N., Agarry O.O. (2012) Application of microbial surfactant (A review). *Schol. J. Biotechnol.* 1(1): 15-23.

- Olguín-Lora, P., Castorena-Cortés, G., Roldán-Carrillo, T., Zapata-Peñasco, I. Biotechnological process for Hydrocarbon recovery in low permeability porous media. Patent No. US 8,631,865 B2. January 21 2014.
- Pacwa-Płociniczak M, Płaza Grażyna A, Piotrowska-Seget Z, Cameotra SS., (2011). Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 12:633-654.
- Palleroni, N (1981). Introduction to the family *pseudomona danceae*. SpringerVerlag U.S.A. p.656-694.
- Palleroni, N. J. (1984). Family I. *Pseudomonaceae*, p. 141-219. In N. R. Krieg and J. G. Hold (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Panesar, R., Panesar, P. S., Hasija, D., Bera, M. B. and Kumar, H., (2009). Fermentative potential of *Pseudomonas aeruginosa* strain for biosurfactant production. *Biol. Forum - Inter. J.*, 1, 109.
- Pansiripat, S., Pornsunthorntawe, O., Rujiravanit, R., Kitiyanan, B., Somboonthanate, P., Chavadej, S., 2010. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: effect of oil-to-glucose ratio. *Biochem. Eng. J.* 49, 185–191.
- Patel J., Gogoi S.B., Rangarajan V., Somasundaran P., Sen R.. (2015) Recent developments in microbial enhanced oil recovery *Renew. Sustain. Energy Rev*, 52, pp. 1539–1558
- Perfumo A., Banat I.M., Canganella F. y Marchant R. (2006). Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1. *Appl. Microbiol. Biot.* 72, 132-138.
- Petróleos Mexicanos (2015) Las reservas de hidrocarburos.
- Petróleos Mexicanos (2015) Estrategia de PEMEX para Optimización de Campos Maduros. <http://www.pep.pemex.com/InformesDGP/EstrategiadePEMEXparaOptimizacióndeCampos>

- Plaza G, Zjawiony I, Banat I. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated bioremediated soils. *J Petro Science Eng.* 2006;50(1):71–77.
- Premuzic, E.T. y Lin, M. (1991). Prospects for thermophilic microorganisms in microbial enhanced oil recovery MEOR. *Soc. Pet. Eng. International Symposium on Oilfield Chemistry.* 20-22 febrero. Anaheim, California.
- Pruthi V. y Cameotra S.S. (2003). Effect of nutrients on optimal production of biosurfactants by *Pseudomonas putida*—A gujarat oil field isolate. *J. Surfactants Deterg.* 6, 65-68.
- Quintero, Rodolfo. *Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones.* México, Editorial Alambra, 1990.
- Rahman K & Gakpe E (2008) Production, characterization and applications of biosurfactants – Review. *Biotechnol.* 7(2):360-370.
- Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., McClean, S., Marchant, R., and Banat, I. M. (2002). Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnol. Progr.* 18, 1277–1281.
- Rahman, P. K. S. M. et al. (2010) 'Production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 in a microfluidic bioreactor', *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 55 (1), pp.45-52.
- Raiger L.J.I, López N. I. (2009), Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Química Viva.* 3(8): 146-148.
- Rakeshkumar.M. Jain, Kalpana Mody. (2012). Physicochemical characterization of biosurfactant and its potential to remove oil from soil and cotton cloth. *Carbohydrate polymers.* El Sevier.
- Rashedi H., Jamshidi E., Mazaheri A. M. y Bonakdarpour B. (2006). Biosurfactant production with glucose as a carbon source. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 20, 99-106.
- Rashedi H., Assadi M.M., Bonakdarpour B., y Jamshidi E., (2005). Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 2(2): 121- 127.

- Reiling, H. E., Thanei-Wyss, U., Guerra-Santos, L. H., Hirt, R., Käppeli, O., & Fiechter, A. (1986). Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5), 985–989.
- Reis R, Pacheco G, Pereira A & Freire D (2013) Biosurfactants: Production and Applications. In: Biodegradation - Life of Science. Chamy R & BioTecnología, Año 2013, Vol. 17 No. 3 27 Rosenkranz F (ed). InTech, ISBN 978-953-51-1154-2. pp. 31-61.
- REOIL (2014) recuperado de:<http://www.reoil.net/rauc.html>
- Rikalovic, M. G., Gojgic-Cvijovic, G., Vrvic, M. M., & Karadzic, I., (2012), Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain ai. *J. Serb. Chem. Soc.*, 77(1): 27-42.
- Robert M., Mercadé E., Andrés C., Espuny M.J., Manresa M.A., Guinea J. (1991) Optimización de la producción de biotensioactivos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*, 42(1):1-7.
- Robert M., Mercadé M.E., Bosch M.P., Parra J.L., Espuny M.J., Manresa M.A. y Guinea J. (1989). Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol. Lett.* 11, 871-874.
- Roldán-Carrillo T., Martínez-García X., Zapata-Peñasco I., Castorena-Cortés G., Reyes-Ávila J., Mayol-Castillo M., Olgúin-Lora P. (2011). Evaluation of the effect of nutrient ratios on biosurfactant production by *Serratia marcescens* using a Box-Behnken design. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* 86: 384-389.
- Roldán-Carrillo, T., Castorena-Cortés, G., Zapata-Peñasco, I., Reyes Ávila, J., Moctezuma Berthier, A., Olgúin-Lora, P. Heavy oil recovery process using extremophile anaerobic indigenous microorganism. Patent No. US 8,895,479 B2. Nov 25 2014.
- Ron EZ, Rosenberg E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* 3:229-236.
- Rosenberg E & Ron E (1999). High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:154-162.

- Salas Alfredo (2012). Tesis de licenciatura: Estudio experimental de recuperación mejorada por efecto joule en un yacimiento fracturado.. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sabra W, Kim E-J, Zeng A-P (2002) Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures. *Microbiol* 148:3195–3202
- Santa-Anna L.M., Sebastian G.V., Menezes E.P., Alves T.L.M., Pereira Jr.N. y Freire D.M.G. (2002). Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. *Braz. J. Chem. Eng.* 19, 159-166.
- Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 401.
- Salwa Mohd Salleh, Nur Asshifa Md Noh and Ahmad RamLi Mohd Yahya (2011). Improving Biosurfactant Recovery from *Pseudomonas aeruginosa* Fermentation, *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*, Prof. Angelo Carpi (Ed.), InTech.
- Sanchez M., Teruel J. A., Espuny M. J., Marques A., Aranda F. J., Manresa A., et al. (2006). Modulation of the physical properties of dielaidoylphosphatidylethanolamine membranes by a lipopeptide biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Phys. Lipids* 142 118–127.
- Sekhon Randhawa, K. K., & Rahman, P. K. S. M. (2014). Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in Microbiology*, 5, 454.
- Sen. R. (2008). Biotecnología en la recuperación de petróleo: el EOR microbiano *Prog. Energ. Combustión.*, 34pp. 714 a 724.
- SENER, (2015). Prospectiva de petróleo y petrolíferos 2015-2029. México.
- Shaw J. D. (1992). *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*. Ed. Butterworth Heinemann. Fourth Edition. London pp 64-73.

- Shete, A. M., Wadhawa, G., Banat, I. M., and Chopade, B. A. (2006). Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: a review. *J. Sci. Ind. Res.* 65, 91–115.
- Silva, R. de C. F. S., Almeida, D. G., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2014). Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), 12523–12542. <http://doi.org/10.3390/ijms150712523>
- Singh A, Van Hamme J & Ward O (2007) Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol. Adv.* 25: 99– 121.
- Soberón-Chávez G, Lépine F & Déziel E (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 718–725.
- Soberón-Chávez, G. (2010). *Biosurfactants: from genes to applications* (Vol. 20). Springer Science & Business Media.
- Sonali Sahoo, Sriparna Datta*, Dipa Biswas, (2011). Optimization of Culture Conditions for Biosurfactant Production from *Pseudomonas aeruginosa* OCD1 Department of Chemical Technology, University of Calcutta, Kolka.
- 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(3), 613-623.
- Stoyanov S.D., Rehage H. y Paunov V.N. (2003). Novel surface tension isotherm for surfactants based on local density functional theory. *Phys. Rev. Lett.* 91, 086102.1-086102.4
- Supaphol S, Jenkins SN, Intomo P, Waite IS & O'Donnell AG (2011) Microbial community dynamics in mesophilic anaerobic co-digestion of mixed waste. *Bioresour. Technol.* 102: 4021–4027.
- Suryanti Venty, Hastuti Sri , Dwi Wahyuningsih Tutik, Mudasir , Ika Muliawati Dina (2009) Biosurfactants production by *Pseudomonas aeruginosa* using soybean oil as substrate *Indo. J. Chem.*, 9 (1), 107 – 112.

- Syidatk, C. and Wagner, F. (1987). "Production of biosurfactants" in "Biosurfactants and Biotechnology" pp. 89-120.- N. Kosaric, W. L. Cairns and N. O. C. Gray (Eds.), Marcel Dekker Inc., New York,
- Tayebe Bagheri Lotfabad, Shokoufe Tayyebi, Reza Roostaazad (2013) Kinetic Measurements for *Pseudomonas aeruginosa* MR01 During Biosurfactant Production in Two-phase System and Developing a Double-Exponential Model for Viable Cell Profile, *World Applied Sciences Journal*, 22(6), 809-816.
- Thavasi, R., Subramanyam Nambaru, V. R. M., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., & Banat, I. M. (2011). Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* from Renewable Resources. *Indian Journal of Microbiology*, 51(1), 30–36. <http://doi.org/10.1007/s12088-011-0076-7>
- Thomas S. (2008) Enhanced oil recovery – An overview, *Oil & Gas Science and Technology*, Vol. 63, pp. 9-19.
- Toledo F.L., Gonzalez-Lopez C., Calvo C. (2008) Production of bioemulsifier by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Enterobacter* species in liquid culture. *Bioresour. Technol.* 1-6.
- Urum K, Grigson S, Pekdemir T, McMenamy S. (2006). A comparison of the efficiency of different surfactants for removal of crude oil from contaminated soils. *Chemosphere* 62: 1403-1410.
- Van Dyke, M.I., P. Couture, M.Brauer, H. Lee and Trevors J.T., (1993). *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactans: Structural characterisation and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can J. Microbiol.*; 39(11):1071-1078.
- Van Ginkel, S., Sung, S., Lay, J., 2001. Biohydrogen production as function of pH and substrate concentration. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4726–4730.
- Van Hamme J.D., Singh A., and Ward O.P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67(4): 503-549.
- Vargas L. (2016) Evaluación de un microorganismo productor de biomoléculas tensoactivas con aplicación en la industria petrolera. Tesis de Licenciatura. FES Cuatitlán, UNAM.

- Volk, H. y Liu, K. (2010). Oil Recovery: Experiences and Economics of Microbial Enhanced Oil Recovery MEOR. En Timmis, K.N. ed., Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Berlín-Springer. 2739-2751
- Wu, J. Y., Yeh, K. L., Lu, W. B., Lin, C. L. and Chang, J. S. (2008) Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oilcontaminated site. *Bioresour. Technol.*, 99, 1157
- Xia W.J., Luo Z.B., Dong H.P., Yu L., (2013). Studies of biosurfactant for Microbial Enhanced Oil Recovery by using bacteria isolated from the formation water of petroleum reservoir. *Petroleum Science and technology*, 31: 2311-2317.
- Yakimov M.M., Timmis K.N., Wray V., Fredrickson H.L. (1995) Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (5): 1706-1713.
- Yateem A., Balba M.T., Al-Shayji Y. y Al-Awadhi. (2002) Isolation and characterization of biosurfactant-producing bacteria from oil-contaminated soil. *Soil Sediment. Contam.* 11, 41-55.
- Yin, J. Qiang YJ, Jia Y, Ye J, Peng H, Qin H, Zhang N and He B. (2008). Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 from oil-containing wastewater, *Proc. Biochem.* 44: 302–308.
- Youssef H.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. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (4):1239–1247.
- Zeng G., Zhong H., Huang G. y Fu H. (2005). Physicochemical and microbiological effects of biosurfactant on the remediation of HOC–contaminated soil. *Prog. Nat. Sci.* 15, 577–585.
- Zhao F., Zhang J., Shi R., Han S., Ma F., Zhang Y. (2015) Production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* isolate and its applicability to in situ microbial enhanced oil recovery under anoxic conditions. *RSC Adv.* 5 (45): 36044-36050.

Zumft, W. G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:533-616.

13. ANEXOS

13.1 Anexo 1. Observación de microorganismos en microscopio

Observación en fresco con microscopio de contraste de fases

En un portaobjetos previamente desengrasado se coloca en el centro una gota del cultivo líquido a evaluar, se cubre con un cubreobjetos y se observa directamente en el microscopio de contraste de fases a 100 X con aceite de inmersión.

Observación en microscopio óptico

La observación de microorganismos en microscopio óptico se debe realizar con una preparación del cultivo fijada sobre un portaobjetos y posteriormente teñida con la tinción de Gram.

Tinción de Gram

Esta tinción se utiliza para bacterias y sirve para diferenciar aquellas que son Gram positivas de las Gram negativas, de acuerdo a la coloración que adquieren, las primeras se colorean de color violeta, mientras que las segundas se colorean de rojo. Lo anterior depende de la estructura que tengan las bacterias en su pared celular en cuanto a los lípidos y proteínas que contienen.

- Para realizar la tinción de Gram se toma un portaobjetos previamente desengrasado y se coloca en el centro del mismo una gota del cultivo líquido a evaluar.
- Se procede a la fijación de la muestra. Para ello se pasa lentamente el portaobjetos, en forma horizontal, sobre la llama de un mechero, manteniendo la muestra hacia arriba. La operación se repite hasta sequedad total, cuidando evitar la combustión de la muestra.
- La muestra se tiñe con los reactivos de la tinción de Gram:
 - Adicionar solución de cristal violeta (1%) sobre la muestra y dejar un minuto.
 - Eliminar esta solución con agua destilada

- Adicionar solución de lugol (yodo-yodurada) y dejar actuar 1 minuto. Esta solución sirve como fijador del color violeta, para las células que se hayan teñido con el colorante cristal violeta y que corresponden a bacterias Gram positivas.
- Eliminar esta solución con agua destilada
- Adicionar una solución de alcohol-cetona para eliminar el exceso de colorante violeta.
- Lavar con agua destilada
- Adicionar solución de safranina (colorante rojo) y dejar actuar por 1 minuto. Las células que no se tiñeron con el colorante de cristal violeta, se teñirán con este colorante y se tornarán rojas que indica que son bacterias Gram negativas.
- Lavar con agua destilada
- Dejar secar la muestra
- Observar en el microscopio óptico con el objetivo de 100x.

13.2 Anexo 2. Curva patrón para evaluación de proteínas

Para realizar la medición de proteínas primero se realizó una curva patrón (Fig. A1) con albúmina de huevo a las concentraciones indicadas en la Tabla A1.

Tabla A1. Valores de la curva patrón de proteínas.

Proteína (mg/L)	Absorbancia	a 595 nm	Promedio	Desviación Estándar
3	0	0.018	0.042	0.020
5	0.08	0.038	0.075	0.023
10	0.144	0.082	0.150	0.038
20	0.18	0.178	0.199	0.012
30	0.285	0.264	0.215	0.036
50	0.294	0.414	0.358	0.060
70	0.415	0.453	0.565	0.078

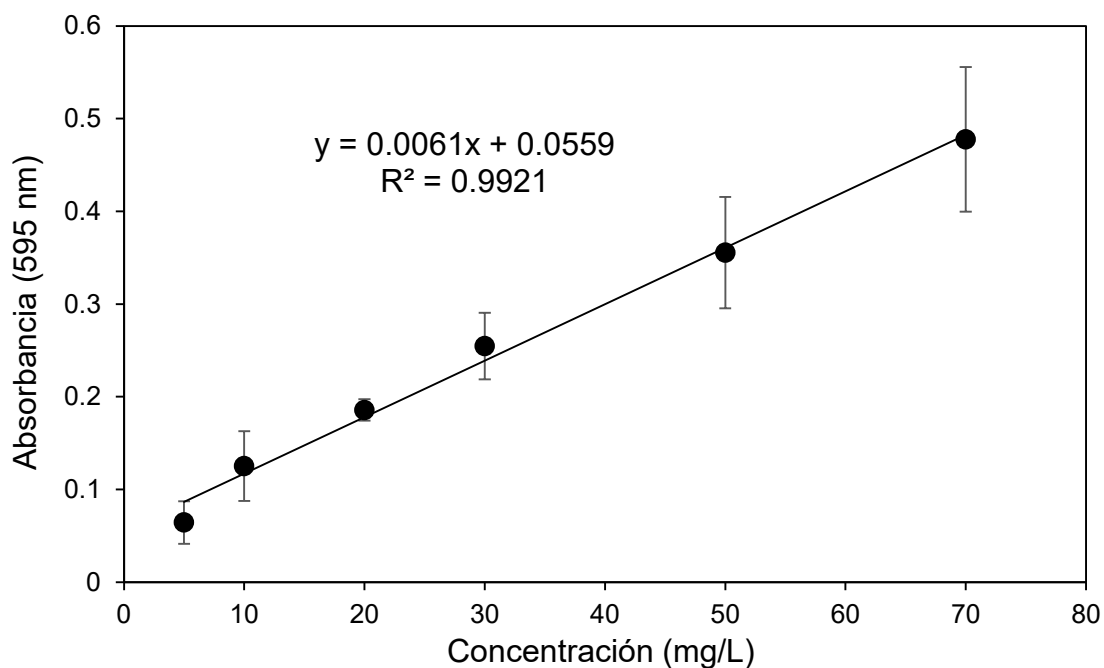


Figura A1. Curva patrón de proteínas (albúmina de huevo).

13.3 Anexo 3. Cálculo del rendimiento

Parámetro	Unidades	Valor	Rendimiento	Valor
Sustrato (AS) inicial	mL/L	15.000	$Y_{X/S}$	0.1934
Sustrato (AS) inicial	g/L	13.785	$Y_{P/S}$	0.4255
Densidad AS	g/mL	0.919	$Y_{P/X}$	2.2002
Sustrato utilizado	%	63.900		
Sustrato utilizado	g/L	8.809	$Y_{\text{otros bioproductos}}$	0.3810
CT en AS	%	65.0		
CT en sustrato utilizado	g/L	5.726		
Biomasa (Proteína)	g/L	1.107		
Proteína microbiana del peso seco de células	%	50.0		
Biomasa Total (Peso seco)	g/L	2.215		
CT Biomasa	%	50.000		
CT Biomasa cepa IMP-P	g/L	1.107		
Biosurfactante producido	g/L	4.130		
CT Biosurfactante*	%	59.0		
PM biosurfactante	g/mol	650.790		
CT Biosurfactante	g/L	2.437		

*considerando un ramnolípido (C32H58O13)

Parámetro	Unidades	Valor	Rendimiento	Valor
Sustrato (AGC) inicial	mL/L	15.000	$Y_{X/S}$	0.491
Sustrato (AGC) inicial	g/L	13.757	$Y_{P/S}$	0.774
Densidad AGC	g/mL	0.917	$Y_{P/X}$	1.576
Sustrato utilizado	%	49.9		
Sustrato utilizado	g/L	6.864	$Y_{\text{otros bioproductos}}$	-0.265
CT en AGC	%	89.0		
CT en sustrato utilizado	g/L	6.109		
Biomasa (Proteína)	g/L	3.0		
Proteína microbiana del peso seco de células	%	50.000		
Biomasa Total (Peso seco)	g/L	5.999		
CT Biomasa	%	50.0		
CT Biomasa cepa IMP-P	g/L	3.0		
Biosurfactante producido	g/L	8.014		
CT Biosurfactante*	%	59.000		
PM biosurfactante	g/mol	650.790		
CT Biosurfactante	g/L	4.728		

*considerando un ramnolípido (C32H58O13)