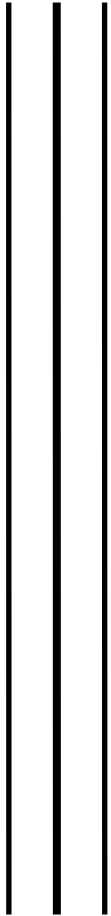




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Optimización y escalamiento de la producción de un biosurfactante bacteriano en un bioreactor de 3 L, con posible aplicación en la recuperación mejorada de hidrocarburos vía microbiana (MEOR)”



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

VIRIDIANA CONTRERAS COSTILLA

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Gladys Teresa Castorena Cortés

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla,
Estado de México.,**



2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo fue realizado dentro de las actividades del proyecto D61042, de la línea de investigación Recuperación Mejorada de Hidrocarburos Vía Microbiana, que pertenece a la gerencia de Ingeniería de Recuperación Adicional de Hidrocarburos del Instituto Mexicano del Petróleo (IMP), bajo la dirección de la doctora Gladys Teresa Castorena Cortés.

Contenido

| | |
|---|-----------|
| Resumen | 1 |
| 1. Introducción | 2 |
| 1.1 Marco teórico | 3 |
| 1.2 Antecedentes | 24 |
| 1.3 Hipótesis | 25 |
| 1.4 Objetivos | 25 |
| 1.4.1 Objetivo general | 25 |
| 1.4.2 Objetivos específicos | 25 |
| 2. Material y métodos..... | 26 |
| 2.1 Cepa | 26 |
| 2.1.1 Reactivación de la cepa | 26 |
| 2.1.2 Caracterización morfológica de la cepa | 26 |
| 2.1.2.1 Caracterización macroscópica..... | 26 |
| 2.1.2.2 Caracterización microscópica | 26 |
| 2.1.3 Conservación y mantenimiento | 26 |
| 2.2 Optimización del medio de cultivo para la producción de BS | 27 |
| 2.2.1 Medio mineral base | 27 |
| 2.2.2 Evaluación preeliminar del crecimiento y producción del biosurfactante por la cepa IMP-G | 27 |
| 2.2.3 Concentración de la fuente de carbono..... | 27 |
| 2.2.4 Formulación del medio de cultivo para la producción de biosurfactante empleando un diseño Taguchi L9 (3 ⁴)..... | 27 |
| 2.2.5 Cinética de producción del biosurfactante..... | 29 |
| 2.3 Evaluación de factores ambientales que afectan la producción de la biomolécula tensoactiva | 29 |
| 2.3.1 Evaluación de la temperatura sobre el crecimiento y producción del biosurfactante..... | 29 |
| 2.3.2 Evaluación de la salinidad sobre el crecimiento y producción del biosurfactante..... | 29 |
| 2.3.3 Evaluación del efecto del oxígeno sobre el crecimiento y producción de biosurfactante con la cepa IMP-G..... | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4 Evaluación de la producción de biosurfactante con la cepa IMP-G a nivel bioreactor..... | 31 |
| 2.4.1 Escalamiento a nivel reactor de 3 L. | 31 |
| 2.4.2 Separación y rendimiento del bioproducto. | 32 |
| 2.5 Métodos analíticos..... | 33 |
| 2.5.1 Preparación de las muestras..... | 33 |
| 2.5.2 Evaluación de la tensión superficial | 33 |
| 2.5.3 Dispersión de aceite..... | 33 |
| 2.5.4 Densidad óptica..... | 34 |
| 2.5.5 Actividad emulsificante (%E ₂₄) | 34 |
| 2.5.6 Tensión Interfacial (TIF) | 35 |
| 3. Resultados y discusión | 38 |
| 3.1 Cepa | 38 |
| 3.1.1 Reactivación de la cepa | 38 |
| 3.1.2 Caracterización morfológica de la cepa (microscópica y macroscópica) | 38 |
| 3.2 Cinética de crecimiento y producción del biosurfactante por la cepa IMP-G41 | |
| 3.3 Medio de producción..... | 41 |
| 3.3.1 Cinética con diferentes concentraciones de la fuente de carbono sobre la producción del biosurfactante..... | 41 |
| 3.3.2 Formulación del medio de cultivo para la producción de biosurfactante empleando un diseño Taguchi L9 (3 ⁴)..... | 42 |
| 3.3.2.1 Superficie de respuesta | 50 |
| 3.4 Evaluación de los factores ambientales en la producción de la biomolécula | 58 |
| 3.4.1 Evaluación de la temperatura sobre el crecimiento y producción del biosurfactante..... | 58 |
| 3.4.2 Evaluación de la salinidad sobre el crecimiento y producción del biosurfactante..... | 60 |
| 3.4.3 Evaluación del efecto de la concentración del oxígeno sobre la cepa productora de biosurfactante..... | 62 |
| 3.4.3.1 Producción de CO ₂ con la cepa IMP-G en condiciones limitadas de aire..... | 62 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.3.2 Producción del biosurfactante bajo condiciones limitadas de oxígeno | 66 |
| 3.4.3.3 Evaluación de la dispersión de aceite obtenida bajo condiciones limitadas de oxígeno..... | 67 |
| 3.4.3.4 Evaluación de la producción de biomasa bajo condiciones limitadas de aire..... | 68 |
| 3.5 Efecto combinado de la temperatura y la salinidad sobre la tensión interfacial (TIF) y emulsión de aceite (% E ₂₄)..... | 72 |
| 3.5.1 Efecto de la temperatura y la salinidad sobre %E ₂₄ | 72 |
| 3.5.2 Efecto de la temperatura y la salinidad sobre la tensión interfacial (TIF). | 74 |
| 3.5.2.1 Comparación de los resultados del TIF en los aceites | 76 |
| 3.6 Escalamiento de la producción de biosurfactante de nivel matraz a nivel bioreactor..... | 78 |
| 3.6.1 Dispersión de aceite del biosurfactante..... | 81 |
| 3.7 Rendimiento de la producción de biosurfactante de nivel matraz a nivel biorreactor..... | 82 |
| 3.8 Concentración Micelar Crítica (CMC) | 84 |
| 3.9 Caracterización del biosurfactante..... | 85 |
| 4. Conclusiones..... | 86 |
| 5. Referencias..... | 88 |

Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1.1 Biosurfactantes producidos por microorganismos | 8 |
| Tabla 1.2 Efecto de diferentes biosurfactantes y surfactantes químicos sobre la tensión superficial del agua destilada..... | 11 |
| Tabla 1.3 Ejemplos de aplicaciones de biosurfactantes en el campo médico..... | 16 |
| Tabla 2.1 Diseño experimental Taguchi L9 (3 ⁴)..... | 28 |
| Tabla 2.2 Concentración de los niveles estudiados en el diseño experimental Taguchi. | 28 |
| Tabla 2.3 Sistemas con las diferentes atmósferas..... | 30 |
| Tabla 3.1 Características macroscópicas de la cepa IMP-G..... | 38 |
| Tabla 3.2 Resultado de los tratamientos del diseño experimental Taguchi L9 (3 ⁴). | 47 |
| Tabla 3.3 Factores y niveles del tratamiento experimental y tratamiento óptimo.. | 55 |
| Tabla 3.4 Parámetros cinéticos de los tratamientos con diferentes relaciones de oxígeno. | 65 |
| Tabla 3.5 Características de los aceites crudos empleados para evaluar la TIF en función del BS producido por la cepa IMP-G | 76 |
| Tabla 3.6 Comparación de la producción a nivel reactor y matraz evaluados por su actividad tensoactiva (TS)..... | 83 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1.1 Estructuras de los principales glicolípidos, a) mono- y dirammnolípidos; b) estructura principal de un trehalolípidio; c) soforolípidio en equilibrio con su forma de lactona..... | 5 |
| Figura 1.2 Estructura de los tres principales lipopéptidos con actividad tensoactiva. a) Gramicidina S; b) Polimixina B; c) Surfactina..... | 6 |
| Figura 1.3 Monómero del biosurfactante polimérico emulsan. | 7 |
| Figura 1.4 Efecto de la concentración de surfactante en la tensión superficial a, b y c muestran la ubicación de los surfactantes en la interfase y la formación de micelas a medida que aumenta la concentración del agente tensoactivo. | 11 |
| Figura 1.5 Estrategias de reducción de costos para la producción de compuestos de superficie microbianos..... | 12 |
| Figura 1.6 Mecanismos que contribuyen a la eliminación de hidrocarburos por biosurfactantes en función de su masa molecular y concentración..... | 14 |
| Figura 1.7 Mecanismo de actividad de los biosurfactante en suelos contaminados con metales. | 15 |
| Figura 1.8 Mecanismo de recuperación mejorada de hidrocarburos por biosurfactantes. | 22 |
| Figura 1.9 Esquema de inyección de biosurfactantes. | 23 |
| Figura 2.1 Tanque de bioreactor, controlador y agitador Applikon. | 31 |
| Figura 2.2 Liofilizadora marca Labconco freezone 2.5 L. | 32 |
| Figura 2.3 Placa Petri con agua e hidrocarburo para dispersión de aceite. | 34 |
| Figura 2.4 Clasificación de crudos con respecto a sus grados API. Imagen modificada de acuerdo a la clasificación de crudos del American petroleum institute. | 35 |
| Figura 2.5 Medición de TIF empleando la técnica de la gota pendiente en sistema DSA..... | 36 |
| Figura 2.6 Principales dimensiones empleadas en la tensión interfacial con el método de la gota pendiente..... | 37 |
| Figura 3.1 Cultivo IMP-G en caja petrí amplificado en el que se observa la morfología de las colonias aisladas..... | 39 |
| Figura 3.2 Cultivo de IMP-G en placa de Petri, en el que se observa la morfología macroscópica de la cepa..... | 39 |
| Figura 3.3 Gram de la cepa IMP-G reactivada en caldo nutritivo. | 40 |
| Figura 3.4 Tinción de Gram de la cepa IMP-G a partir de tubo de ensaye..... | 40 |
| Figura 3.5 Evaluación de la actividad tensoactiva de la cepa IMP-G reactivada en medio mineral..... | 41 |
| Figura 3.6 Evaluación de la reducción de tensión superficial entre los tratamientos con diferente concentración de sustrato..... | 42 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.7 Evaluación de la reducción de tensión superficial en los tratamientos con mascabado como fuente de carbono. | 43 |
| Figura 3.8 Dispersión de aceite de los sistemas 1, 2, 3 con mascabado y el testigo a diferentes periodos de incubación..... | 44 |
| Figura 3.9 Evaluación de la reducción de tensión superficial en los tratamientos con sacarosa como fuente de carbono. | 44 |
| Figura 3.10 Dispersión de aceite de los tratamientos 4, 5 y 6 a diferentes periodos de incubación. | 45 |
| Figura 3.11 Evaluación de la tensión superficial en los tratamientos con glucosa como fuente de carbono..... | 46 |
| Figura 3.12 Dispersión de aceite de los tratamientos 7, 8 y 9 (sistemas con glucosa) a diferentes periodos de incubación. | 46 |
| Figura 3.13 Comparativo de reducción de tensión superficial entre los mejores tratamientos experimentales. | 48 |
| Figura 3.14 Dispersión de aceite de los tratamientos 1, 2 y 9 a diferentes periodos de incubación. | 49 |
| Figura 3.15 Densidad óptica obtenida con los mejores tratamientos experimentales. | 49 |
| Figura 3.16 Análisis estadístico del efecto por nivel de cada una de las variables independiente en la reducción de tensión superficial. | 50 |
| Figura 3.17 Análisis de superficie de respuesta de la reducción de tensión superficial en función de la concentración del NaNO_3 y MgSO_4 sobre el efecto de reducción de tensión superficial. | 51 |
| Figura 3.18 Análisis de superficie de respuesta de la reducción de tensión superficial en función de la concentración del MgSO_4 y la fuente de carbono. | 52 |
| Figura 3.19 Análisis de superficie de respuesta de la reducción de tensión superficial en función de la concentración del NaNO_3 y la fuente de carbono. | 52 |
| Figura 3.20 Análisis de superficie de respuesta de la reducción de tensión superficial en función de la concentración de CuSO_4 y el MgSO_4 | 53 |
| Figura 3.21 Análisis de superficie de respuesta de la reducción de tensión superficial en función de la concentración de CuSO_4 y la fuente de carbono (FC). | 54 |
| Figura 3.22 Análisis de superficie de respuesta de la reducción de tensión superficial en función de la concentración de NaNO_3 y CuSO_4 | 55 |
| Figura 3.23 Comparativo de reducción en la tensión superficial entre el tratamiento teórico brindado por el software y el tratamiento 2 experimental. | 56 |
| Figura 3.24 Efecto macroscópico de la temperatura de incubación en la producción de biomasa de la cepa IMP-G en matraz Erlenmeyer A) Matraz inoculado y control incubados a 60°C , B)Matraz inoculado y control incubados a 40°C , C) Matraces inoculados e incubados a 30 y 60°C | 59 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.25 Efecto de la temperatura de incubación sobre la reducción de TS de la cepa IMP-G. | 59 |
| Figura 3.26 Efecto de la concentración de NaCl sobre la reducción de TS de la cepa IMP-G. | 60 |
| Figura 3.27 Crecimiento de la cepa IMP-G sometida a diferentes concentraciones de NaCl. | 61 |
| Figura 3.28 Producción de CO ₂ de los tratamientos con diferentes relaciones de aire-nitrógeno. | 62 |
| Figura 3.29 Producción de CO ₂ en el tratamiento con 100% de nitrógeno. Ajuste realizado con el modelo de Gompertz. | 64 |
| Figura 3.30 Producción de CO ₂ en el tratamiento con 25% aire y 75% nitrógeno. Ajuste realizado con el modelo de Gompertz. | 64 |
| Figura 3.31 Producción de CO ₂ en el tratamiento con 50% aire y 50% de nitrógeno. Ajuste realizado con el modelo de Gompertz. | 65 |
| Figura 3.32 Tensión superficial del sobrenadante de los tratamientos con diferentes relaciones de aire/ nitrógeno a diferentes periodos de incubación, relación aire / nitrógeno (0-100%) (■), relación aire / nitrógeno (25-75%) (▲), relación aire / nitrógeno (50-50%) (●). | 66 |
| Figura 3.33 Dispersión de aceite de los tratamientos con diferentes relaciones de aire/nitrógeno en los diferentes periodos de incubación, relación aire / nitrógeno (0-100%) (■), relación aire / nitrógeno (25-75%) (▲), relación aire / nitrógeno (50-50%) (●). | 67 |
| Figura 3.34 Crecimiento de los microorganismos evaluada como densidad óptica en los tratamientos con diferentes relaciones aire / nitrógeno a diferentes periodos de incubación, relación aire / nitrógeno (0-100%) (■), relación aire / nitrógeno (25-75%) (▲), relación aire / nitrógeno (50-50%) (●). | 69 |
| Figura 3.35 Efecto macroscópico de los cultivos a diferentes tiempos de incubación A) 24 h, B) 48 h, C) 72 h, D) 96 h. | 70 |
| Figura 3.36 Tinción de Gram de la cepa IMP-G a las 72 h de incubación: A) 25% aire, B) 50 % aire, C) 100% aire, D) sin Oxígeno. | 71 |
| Figura 3.37 Coloración de la biomasa después de 72 h de incubación: A) 0% aire .B) 100% aire, C) 50% aire. | 72 |
| Figura 3.38 Prueba de %E ₂₄ sistema aceite 500A- biosurfactante. | 73 |
| Figura 3.39 Prueba de %E ₂₄ sistema aceite 600F- biosurfactante. | 73 |
| Figura 3.40 Forma de la gota pendiente sistema [A] aceite 500A/biosurfactante 30°C; [B] aceite 500A/agua destilada 30°C sin sal. | 75 |
| Figura 3.41 Forma de la gota pendiente sistema [A] aceite 600F/biosurfactante 30°C; [B] aceite 600F/agua destilada 30°C sin sal. | 75 |
| Figura 3.42 Comparación de la tensión interfacial entre los sistemas aceite 600F/biosurfactante (BS-aceite) y el control aceite 600F/medio mineral (BM-aceite) a diferentes condiciones ambientales. | 77 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.43 Comparación de la tensión interfacial entre los sistemas aceite 500A/biosurfactante y el control (aceite 500A/medio mineral) a diferentes condiciones ambientales. | 78 |
| Figura 3.44 Producción de biosurfactante por la cepa IMP-G en un bioreactor de tipo tanque agitado A) T= 0 h, B) T= 24 h y C) T= 48 h..... | 79 |
| Figura 3.45 Bioreactor con apertura superior y conexión de manguera a un frasco para la recolección de espuma..... | 80 |
| Figura 3.46 Cinética de la producción de biosurfactante en el bioreactor analizada como TS en la espuma y en el caldo de cultivo. | 80 |
| Figura 3.47 Evaluación de la dispersión de aceite con A) Biosurfactante contenido a nivel matraz B) Biosurfactante contenido en la espuma producida en el bioreactor. | 81 |
| Figura 3.48 Apariencia del liofilizado crudo del biosurfactante de <i>B. subtilis</i> IMP-G. | 82 |
| Figura 3.49 Cálculo de la CMC con el producto semipurificado. | 84 |
| Figura 3.50 Comparación de la espectroscopia FTIR del estándar de surfactina (A) y del biosurfactante semipurificado producido por la cepa IMP-G (B). | 85 |

Nomenclatura

| | |
|------------------|---|
| %E ₂₄ | Porcentaje de actividad emulsificante a las 24 horas |
| BM | Medio mineral |
| BS | Biosurfactante |
| CMC | Concentración micelar crítica |
| DA | Dispersión de aceite |
| DMC | Dilución micelar crítica |
| DO | Densidad óptica |
| EOR | Recuperación mejorada de petróleo |
| FC | Fuente de carbono |
| FTIR | Espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier |
| HLB | Equilibrio hidrófobo-lipofílico |
| MEOR | Recuperación mejorada de petróleo vía microbiana |
| TIF | Tensión interfacial |
| TS | Tensión superficial |
| vvm | Volumen de aire por volumen de medio de cultivo |

Resumen

La producción de biosurfactante por la cepa IMP-G fue optimizada implementando un diseño experimental Taguchi empleando 4 factores (carbono, NaNO_3 , MgSO_4 y CuSO_4) a 3 niveles (concentración baja, media y alta). Los menores valores de tensión superficial fueron obtenidos con mascarado como fuente de carbono, y las siguientes concentraciones de nutrientes 0.001 gL^{-1} de CuSO_4 , NaNO_3 2.5 gL^{-1} y MgSO_4 0.6 gL^{-1} .

Se encontró que el crecimiento celular y la producción de biosurfactante fueron fuertemente afectadas por los elementos del medio de cultivo y las condiciones de fermentación. Bajo las mejores condiciones el biosurfactante redujo la tensión superficial de 72 a 28.44 mN/m. En las mediciones con crudo pesado-biosurfactante la tensión interfacial fue de 2.53 mN/m y con crudo ligero de 0.93 mN/m. En contraste, los sistemas sin biosurfactante presentaron valores de tensión interfacial más altos en el sistema crudo pesado/agua fue 12.91 mN/m y para crudo ligero/agua fue de 14.62 mN/m, lo que evidencia la actividad del biotensioactivo.

Las condiciones ambientales óptimas de crecimiento y producción de biosurfactante fueron temperatura de incubación de 30 °C y pH neutro. Se comprobó que la cepa es tolerante a concentraciones hasta de 25 gL^{-1} de NaCl y la cepa puede producir el biosurfactante en condiciones facultativas.

Los resultados de la producción del lote en el biorreactor indicaron un rendimiento de 1.8 gL^{-1} con una tensión superficial de 27.48 mN/m.

El biosurfactante obtenido fue caracterizado por espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), la estructura química obtenida fue similar a la que presenta la surfactina.

1. Introducción

Los biosurfactantes son compuestos anfifílicos con un componente hidrofílico, tal como aminoácidos, péptidos, sacáridos y un componente hidrófobo como lípidos saturados o insaturados y ácidos grasos. Estos compuestos son producidos en las superficies celulares microbianas, o excretados extracelularmente (Banat *et al.*, 2010). Su principal característica es la propiedad de reducir la tensión superficial e interfacial entre dos fluidos inmiscibles de diferentes polaridades (Calvacante, 2008). Los mejores biosurfactantes presentan valores bajos de concentración micelar crítica (CMC), reducción de la tensión superficial del medio de cultivo a menos de 30 mN / m y tensión interfacial cercanos a 1 mN/m (Amani, 2010).

A diferencia de los surfactantes químicos, los biosurfactantes presentan varias ventajas incluyendo baja o nula toxicidad, alta biodegradabilidad y efectividad en temperaturas extremas, pH extremo y alta salinidad (Rodrigues *et al.*, 2006a).

Estructuralmente hay diversos grupos de moléculas surfactantes sintetizadas por diferentes microorganismos: rhamnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa*, surfactina por *Bacillus subtilis* y soforolípidos por *Candida bombicola* (Desai y Banat, 1997; Lu *et al.*, 2007).

El creciente interés en los últimos años por estos compuestos, se ha dado por su potencial aplicación en la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética y petrolera. Las principales aplicaciones en esta última industria son en la bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos y recuperación mejorada del petróleo por vía microbiana (**Microbial Enhanced Oil Recovery**, MEOR **por sus siglas en ingles**) por sus siglas en ingles) (Haddad *et al.*, 2009).

Las propiedades de los biosurfactantes son muy importantes en MEOR. La reducción de la tensión interfacial provoca la caída de las fuerzas capilares requerida para liberar el aceite atrapado en los poros de la roca, desplazando el aceite desde los poros a la fase líquida móvil (Gabbitto, 2006).

Los estudios han indicado que la producción de biosurfactantes puede ser afectada por factores inherentes al medio de cultivo como son: la naturaleza y concentración de la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas, fósforo, sodio, magnesio, hierro, zinc y manganeso. También afectan las condiciones operacionales empleadas, entre ellas: pH, temperatura, proporción de la dilución en cultivo continuo, tiempo de cultivo, agitación y aireación (Cortés-Sánchez *et al.*, 2013).

1.1 Marco teórico

Biosurfactantes

Los biosurfactantes son compuestos tensoactivos producidos en la fermentación por microorganismos como bacterias (*Bacillus subtilis* y *Lactobacillus*) hongos (*Aspergillus* y *Geotrichum*) y levaduras (*Candida* y *Saccharomyces cerevisiae*). Como los surfactantes químicos, los biosurfactantes tienen la capacidad de disminuir la concentración de líquidos en la superficie y en la interfase, y formar micelas y microemulsiones entre dos fases diferentes. Sus principales características beneficiosas incluyen baja toxicidad, alta biodegradabilidad y compatibilidad ambiental (Santos da Silva *et al.*, 2015).

Síntesis de los biosurfactantes

Los biosurfactantes son producidos por una variedad de microorganismos, secretados extracelularmente o unidos a la célula (Martínez, 2011).

- Producción de biosurfactantes por fermentación

Dependiendo de la naturaleza del biosurfactante y el microorganismo productor, los siguientes patrones de producción por fermentación son posibles: a) producción asociada al crecimiento, b) producción bajo condiciones limitadas del crecimiento, c) producción con células en reposo/no crecimiento o inmovilizadas y d) producción asociada a la adición de precursores (Rodrigues *et al.*, 2006a).

- Producción bajo condiciones limitadas del crecimiento

La producción bajo condiciones limitadas del crecimiento está caracterizada por un aumento de la cantidad del biosurfactante como resultado de la limitación de uno o más componentes del medio de cultivo. Algunos investigadores han demostrado una sobreproducción de biosurfactante por *Pseudomonas sp.*, cuando el cultivo llega a la fase estacionaria de crecimiento debido a la limitación de nitrógeno y hierro (Jiménez *et al.*, 2010; Mulligan y Gibbs, 1989).

- Producción en reposo o por inmovilización de células

En la producción de biosurfactantes en reposo o por inmovilización no hay multiplicación de células; sin embargo, éstas siguen utilizando la fuente de carbono para la síntesis de biosurfactantes. Algunos ejemplos de este tipo incluyen la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas sp.* (Reiling *et al.*, 1986) y *P. aeruginosa* CFTR-6 (Ramana y Karanth, 1989), la producción de soforolípidos por *Candida apícola* (Hommel y Huse, 1993) y tetraéster de trehalosa por *Rhodococcus erythropolis* (Syldatk y Wagner, 1987). Este tipo de mecanismo permite la reducción de costos de recuperación del producto, ya que el crecimiento y las fases de formación del producto pueden ser separadas (Desai y Banat, 1997).

- Producción con precursores

Se ha reportado que la adición de precursores de biosurfactantes en el medio de cultivo causa cambios en la cantidad y la calidad del producto. Por ejemplo, la adición de compuestos lipofílicos al medio de cultivo de *Torulopsis magnoliae*, *T. bombicola* y *T. apícola* incrementa la producción del biosurfactante con rendimientos de 120 a 150 g/L (Desai y Banat., 1997; Tulloch *et al.*, 1968).

Clasificación de los biosurfatantes

Una de las formas de clasificar a los biosurfactantes es por su estructura química. Los biosurfactantes poseen una parte hidrofílica que consiste generalmente de alguna de las estructuras siguientes: aminoácidos, péptidos aniónicos o catiónicos y carbohidratos; mientras que la parte hidrofóbica regularmente está constituida de ácidos grasos saturados o insaturados. Los biosurfactantes más estudiados han sido los glicolípidos, lipopéptidos y lipoproteínas, fosfolípidos y ácidos grasos, tensoactivos poliméricos y tensoactivos particulados (Desai y Banat, 1997).

Glicolípidos

Los glicolípidos pueden subclasificarse en ramnolípidos, trehalolípidos y soforolípidos. Los ramnolípidos están constituidos por mono y disacáridos de ramnosa (Fig. 1a). Los trehalolípidos están constituidos por el disacárido trehalosa, en el que a cada unidad de glucosa se encuentra ligada a un ácido graso (Fig. 1b). La estructura de los soforolípidos tiene como base al disacárido soforosa, el cual se encuentra ligado ya sea a una molécula de ácido esteárico (ácido graso saturado) o a una molécula de ácido oleico (ácido graso insaturado) (Fig. 1c) (Jiménez *et al.*, 2010).

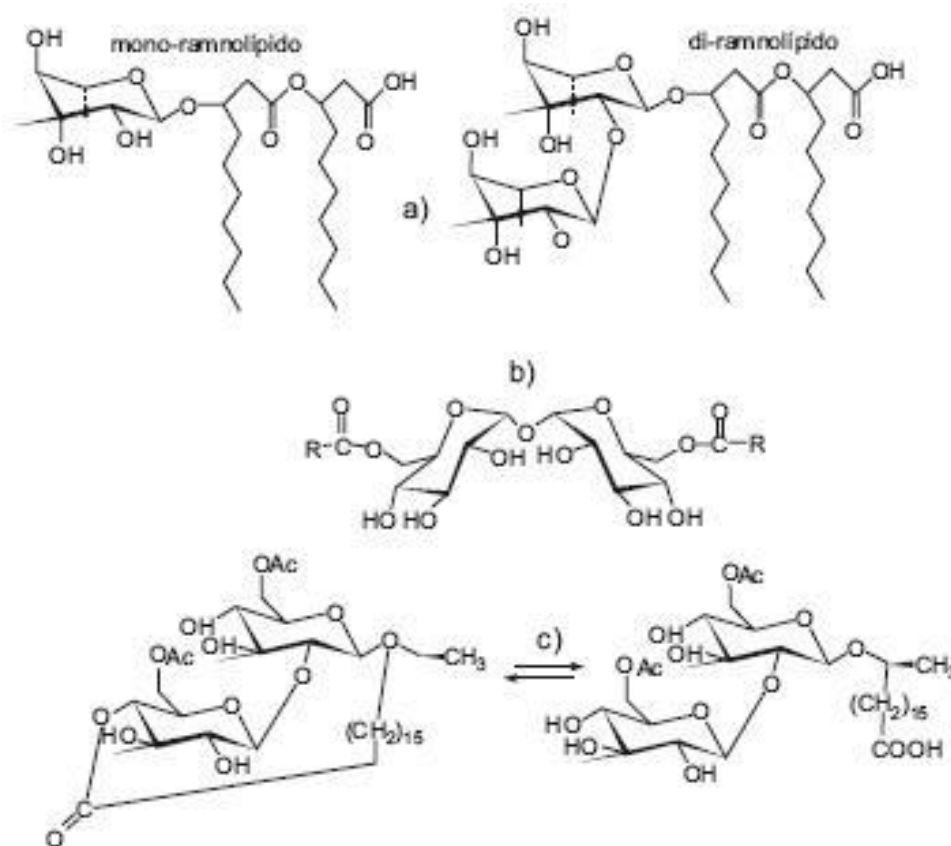


Figura 1.1 Estructuras de los principales glicolípidos, a) mono- y dirammnolípidos; b) estructura principal de un trehalolípidos; c) soforolípidos en equilibrio con su forma de lactona.

Lipopeptidos

Dentro de las estructuras de tipo lipopéptido, con significativa capacidad biotensoactiva, se tiene a los lipopéptidos cíclicos tales como la gramicidina y las polimixinas (Fig. 1.2a y 1.2b). Estas dos clases de biosurfactantes poseen actividad antibacteriana debido a su capacidad de solubilizar enzimas de la membrana. Otro biosurfactantes perteneciente a este grupo y reconocido como uno de los más poderosos es la surfactina (Fig. 1.2c), que en concentraciones menores del 0.005 % en peso reduce la tensión superficial del agua de 72 a 27.9 N/m (Arima *et al.* 1968).

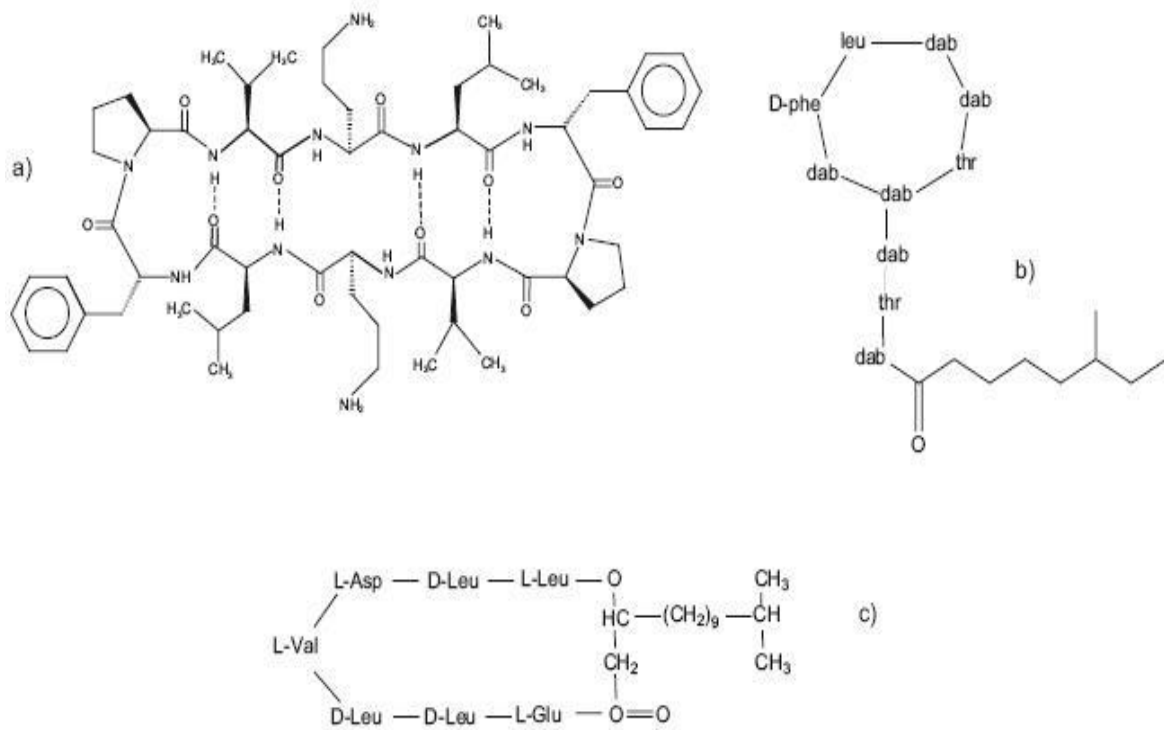


Figura 1.2 Estructura de los tres principales lipopéptidos con actividad tensoactiva. a) Gramicidina S; b) Polimixina B; c) Surfactina.

Biosurfactantes poliméricos

Los biosurfactantes poliméricos están constituidos por diversos grupos químicos. Un ejemplo es el producto comercial emulsán (Fig. 1.3), en el cual los ácidos grasos se encuentran ligados a un esqueleto de heteropolisacáridos (Rosenberg *et al.* 1979). Otro biosurfactante polimérico es el liposán, cuya estructura está constituida principalmente de carbohidratos y proteínas (Cirigliano y Carman 1984).

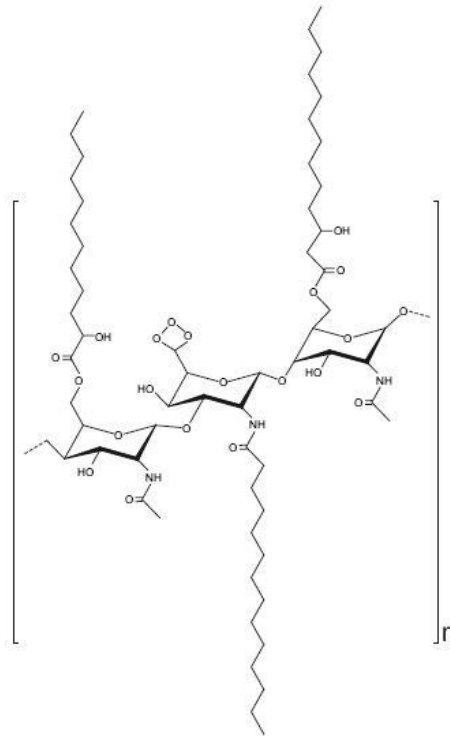


Figura 1.3 Monómero del biosurfactante polimérico emulsan.

Biosurfactantes particulados

Las vesículas y células microbianas con actividad tensoactiva son denominadas biosurfactantes particulados. Ejemplos de microorganismos con una elevada hidrofobicidad son las cianobacterias y algunos microorganismos patógenos del género *Serratia* (Jiménez *et al.*, 2010).

La actividad surfactante en la mayoría de las bacterias patógenas y degradadoras de hidrocarburos se atribuye a varios componentes de la superficie celular, que incluyen estructuras como la proteína M y el ácido lipoteicoico en el caso de *estreptococos* del grupo A, proteína A en *Staphylococcus aureus*, capa A en *Aeromonas salmonicida*, prodigiosina en *Serratia spp.*, gramicidinas en esporas de *Bacillus brevis* y fimbrias delgadas en *A. calcoaceticus* RAG-1 (Desai, 1987; Fattom y Shilo, 1985; Lang y Wagner, 1987; Rosenberg, 1986; Wilkinson y Galbraith, 1975).

Organismos productores de biotensoactivos

Se han aislado y caracterizado varios tipos de biotensoactivos, que incluyen glicolípidos, fosfolípidos, lípidos neutros, ácidos grasos, peptidolípidos, lipopolisacáridos y otros no completamente caracterizados. Los microorganismos más representativos que producen biosurfactantes y sus estructuras se enumeran en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1 Biosurfactantes producidos por microorganismos

| Microorganismo | Biosurfactante | Referencia |
|-------------------------------------|---|--------------------------------|
| <i>Arthrobacter MIS 38</i> | Lipopéptido | Morikawa <i>et al.</i> , 1993 |
| <i>Bacillus licheniformis JF-2</i> | Lipopéptidos | McInerney <i>et al.</i> , 1990 |
| <i>Bacillus licheniformis BAS50</i> | Liquenisina | Yakimov <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Surfactina | Nitschke y Pastore, 2005 |
| <i>Bacillus pumilus A1</i> | Surfactina | Morikawa <i>et al.</i> , 1992 |
| <i>Bacillus sp. AB-2</i> | Ramrólpidos | Banat, 1993 |
| <i>Bacillus sp. C- 14</i> | Hidrocarburo-lípido-proteína | Eliseev <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>Candida antarctica</i> | Lípidos de mannosyl erytritol | Kitamoto <i>et al.</i> , 1992 |
| <i>Candida tropicalis</i> | Polisacaridos-ácidos grasos | Batista <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Candida lipolytica Y-917</i> | Soporolípido | Lesik <i>et al.</i> , 1989 |
| <i>Corynebacterium lepus MM1</i> | Glucosa, lípidos y ácidos hidroxidecanoicos | Passeri, 1992 |
| <i>Nocardia erythropolis</i> | Lípidos neutros | MacDonald <i>et al.</i> , 1981 |
| <i>Ochrobactrum anthropii</i> | Proteína | Wasko y Bratt, 1990 |
| <i>Penicillium spiculisporum</i> | Ácido espiculispórico | Ban y Sato, 1993 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Ramrólípido | Rahman <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Ramrólípido | Abouseoud <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Phaffia rhodozyma</i> | Carbohidratos-lípidos | Lesik <i>et al.</i> , 1991 |

| | | |
|--------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> | Trehalosa | Shulga <i>et al.</i> , 1990 |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> 3C-9 | Glicolípidos y ácidos grasos | Peng <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Rhodococcus sp.</i> TA6 | Lípidos y glicolípidos | Shavandi <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Rhodococcus sp.</i> 33 | Polisacárido | Neu <i>et al.</i> , 1992 |
| <i>Torulopsis bombicola</i> | Lípidos soforososs | Inoue y Ito, 1982 |

Principales funciones de los biosurfactantes a nivel fisiológico

Los microorganismos utilizan una amplia variedad de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía para su crecimiento. Cuando estos sustratos son inaccesibles por su baja solubilidad, competencia con otros microorganismos u otro tipo de factor ambiental, utilizan a los biosurfactantes para disponer de la fuente de carbono. Las principales funciones de los biosurfactantes a nivel fisiológico son:

- Capacidad para emulsificar y solubilizar compuestos insolubles en fases acuosas, como son los hidrocarburos, facilitando la disponibilidad de estos sustratos para el crecimiento y mantenimiento de los microorganismos (Francy *et al.* 1991).
- Adherencia y liberación de células en superficies. Ésta 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. Estos 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.* 1989).
- Actividad antibiótica, la que ha sido demostrada por varios biosurfactantes, principalmente los lipopéptidos y glicolípidos. Ejemplos de éstos 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 microbianas de otros microorganismos y les brinda una mayor oportunidad de supervivencia en nichos con una alta competitividad por nutrientes (Lin, 1996).

La principal función biológica de los biotensoactivos es su capacidad para solubilizar sustratos hidrofóbicos, tales como hidrocarburos, lípidos, aceites, fármacos y otros (Morikawa *et al.* 1993; Zeng *et al.*, 2005).

Parámetros para medir la eficacia de un biosurfactante

La efectividad de un surfactante se puede establecer en base a distintos parámetros, todos ellos relacionados con su capacidad de solubilizar compuestos hidrofóbicos y disminuir la tensión superficial y/o interfacial. Uno de los parámetros a tener en cuenta es la Concentración Micelar Crítica, y la disminución de la tensión superficial e interfacial:

La **tensión superficial (TS)** (presente en la interfase líquido-aire), los surfactantes disminuyen la tensión debido a que interfieren en la formación de puentes de hidrógeno y otras fuerzas involucradas en la adhesión entre moléculas (Figura 1.4) (Raiger y López, 2009).

La **tensión interfacial (TIF)** entre dos líquidos depende de la fuerza de cohesión entre las moléculas de cada líquido y de la fuerza de adhesión entre las moléculas de un líquido y el otro. De esta manera, la tensión interfacial entre dos líquidos está relacionada con la tensión superficial de cada líquido saturado en el otro. (Donahue y Bartell, 1952). Para disminuir la TIF, los surfactantes actúan como un “puente” formando una tercera fase de “microemulsión” que favorece la interacción entre la fase acuosa y la del hidrocarburo o compuesto hidrofóbico (Ayirala y Rao, 2006).

La **CMC (concentración micelar crítica)** es la concentración mínima de un agente surfactante capaz de formar micelas (Figura 1.4). Estas micelas se producen cuando la parte hidrofóbica del surfactante, al ser incapaz de formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. Una manera de aliviar este aumento, es aislar la región hidrofóbica interaccionando con otras superficies, asociándose a otros compuestos hidrofóbicos o formando vesículas (micelas) en las que la región lipofílica se sitúa en el centro y la hidrofílica hacia fuera, formando los puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. Cuanto menor sea la CMC, más eficiente es el surfactante en cuestión. 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. Tanto la TS, TIF y CMC dependen del pH, de la temperatura y de los solutos presentes en el medio acuoso. (Raiger y López, 2009).

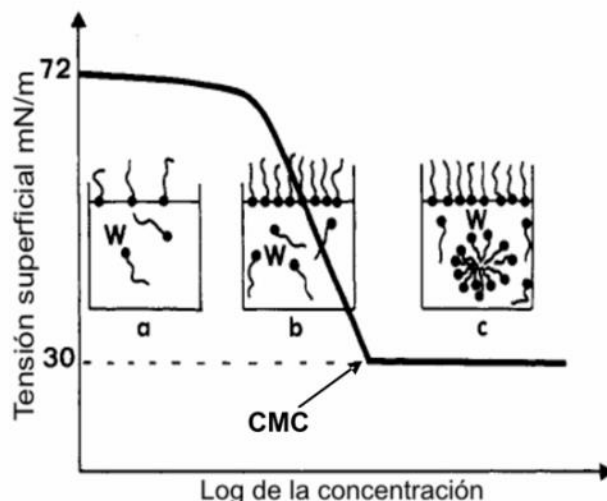


Figura 1.4 Efecto de la concentración de surfactante en la tensión superficial, **a**, **b** y **c** muestran la ubicación de los surfactantes en la interfase y la formación de micelas a medida que aumenta la concentración del agente tensioactivo.

La Tabla 1.2 muestra la disminución de la tensión superficial del agua destilada en presencia de distintos surfactantes naturales o químicos y la CMC de estos agentes en agua destilada.

Tabla 1.2 Efecto de diferentes biosurfactantes y surfactantes químicos sobre la tensión superficial del agua destilada.

| Surfactante | Tensión superficial (mN/m) | CMC (mg/l) | Referencias |
|----------------------|----------------------------|------------|---------------------------------|
| Agua | 72 | Nd | Christofi y Ivshina, 2002 |
| Glicolípido | 26.8 | 54 | Christofi y Ivshina, 2002 |
| Trehalosa | 43 | 0.7 | Kretschmer <i>et al.</i> , 1982 |
| Dicorinomicolato | | | |
| Trehalosa tetraester | 24.1 | 25 | Tuleva <i>et al.</i> , 2009 |
| Ramnolípidos | 28.8 | 110 | Chayabutra <i>et al.</i> , 2001 |
| Soforolípidos | 30-60 | 5-80 | Lang <i>et al.</i> , 2000 |
| Surfactina | 27 | 23 | Christofi y Ivshina, 2002 |
| Viscosina | 28 | 54 | Saini <i>et al.</i> , 2008 |
| SDS | 37 | 2120 | Christofi y Ivshina, 2002 |
| Tween | 30 | 600 | Christofi y Ivshina, 2002 |

*Nd= No detectado

Optimización de la producción de biosurfactante

La viabilidad económica en la producción a gran escala de diversos metabolitos mediante procesos biotecnológicos suele tener como cuello de botella las etapas de biosíntesis o purificación. En el caso particular de los biosurfactantes, se ha determinado que la biosíntesis es el paso limitante para su producción a gran escala (Jiménez *et al.*, 2010).

En la actualidad, los costos de producción de la mayoría de los biosurfactantes no compiten con los de los surfactantes químicos. Se han propuesto diferentes estrategias para hacer que el proceso sea más rentable, incluyendo: (1) el desarrollo de bioprocesos más eficientes, incluida la optimización de las condiciones de fermentación y los procesos de recuperación posteriores, (2) el uso de sustratos baratos y sustratos residuales (Thavasi *et al.* 2007, 2008; Raza *et al.* 2009), (3) desarrollo de cepas sobreproductoras mutantes o recombinantes, para aumentar los rendimientos (Fig. 1.5, Banat *et al.*, 2010).

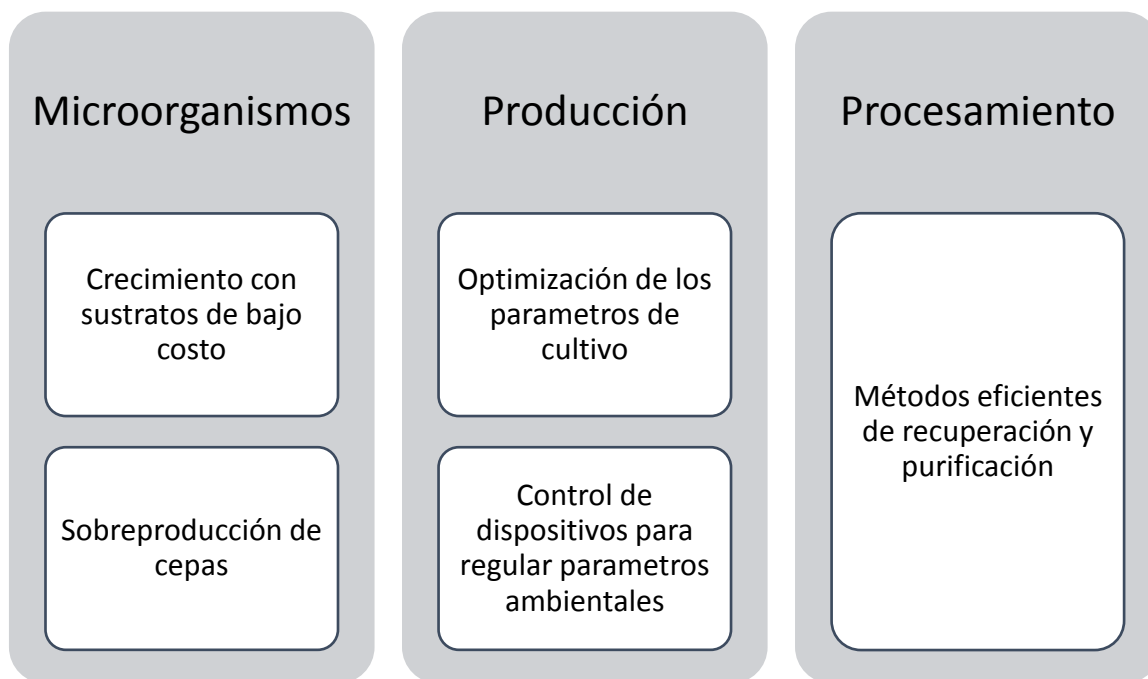


Figura 1.5 Estrategias de reducción de costos para la producción de compuestos de superficie microbianos.

Usos y aplicaciones de los biosurfactantes en las diferentes industrias

- Industria alimentaria

Además de su papel como agentes que disminuyen la tensión superficial e interfacial que facilita la formación y estabilización de las emulsiones, los biotensoactivos son utilizados para controlar la acumulación de glóbulos de grasa, la estabilización de los sistemas aireados.

Los biosurfactantes también ayudan a mejorar la textura y vida útil de los productos que contienen almidón, modificando las propiedades reológicas de la masa de trigo y la textura de los productos a base de grasa (Kachholz y Schlingmann, 1987; Vijayakumar y Saravanan, 2015).

En las formulaciones de panadería y helados, los biosurfactantes actúan controlando la consistencia, disminuyendo el fraguado y solubilizando los aceites de sabor. La mejora de la estabilidad de la masa, volumen, textura y la conservación de los productos de panadería se obtiene mediante la adición de surfactantes ramnolípidos, así como la mejora de las propiedades de la crema de mantequilla y los productos de confitería congelados. (Van Haesendonck y Vanzeveren, 2004).

- Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos

Un método que mejora la eficacia de la biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos es el uso de biosurfactantes. Estos compuestos pueden mejorar la biorremediación de hidrocarburos por dos mecanismos:

El primero incluye el aumento de la biodisponibilidad del sustrato para los microorganismos, mientras que el otro implica la interacción con la superficie celular, lo que aumenta la hidrofobicidad de la superficie permitiendo que los sustratos hidrófobos se asocien más fácilmente con las células bacterianas (Mulligan y Gibbs, 2004). Al reducir las tensiones superficiales e interfaciales, los biosurfactantes aumentan las áreas superficiales de los compuestos insolubles, lo que lleva a una mayor movilidad y biodisponibilidad de los hidrocarburos. En consecuencia, los biosurfactantes mejoran la biodegradación y la eliminación de hidrocarburos. La adición de biosurfactantes mejora la biodegradación de hidrocarburos mediante la movilización, solubilización o emulsificación de estos compuestos (Figura 1.6 Pacwa-Płociniczak et al., 2011.) (Nguyen *et al.*, 2008; Déziel *et al.*, 1996; Nieves *et al.*, 2008)

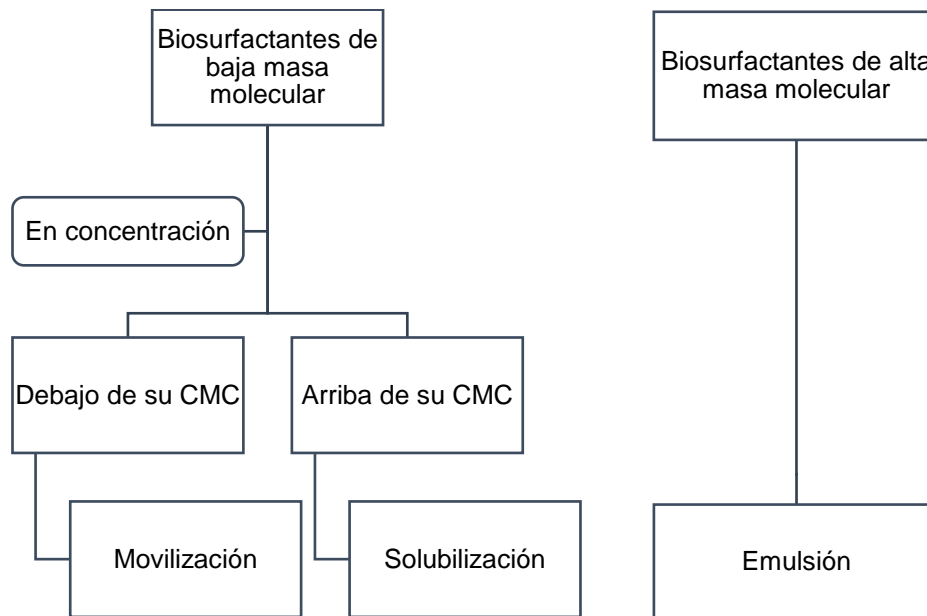


Figura 1.6 Mecanismos que contribuyen a la eliminación de hidrocarburos por biosurfactantes en función de su masa molecular y concentración.

El mecanismo de **movilización** se produce en concentraciones por debajo de la CMC del biosurfactante. A tales concentraciones, los biosurfactantes reducen la tensión superficial e interfacial entre los sistemas aire / agua y suelo / agua. Debido a la reducción de la fuerza interfacial, los biosurfactantes en el sistema roca / aceite reducen la fuerza capilar en el sistema.

Por encima de la CMC del biosurfactante se lleva a cabo el proceso de **solubilización**. A estas concentraciones, las moléculas de biosurfactante se asocian para formar micelas, lo que aumenta dramáticamente la solubilidad del aceite. Los extremos hidrófobos de las moléculas de biosurfactante se conectan entre sí dentro de la micela, mientras que los extremos hidrófilos se exponen a la fase acuosa en el exterior. En consecuencia, el interior de una micela crea un entorno compatible para las moléculas orgánicas hidrófobas. El proceso de incorporación de estas moléculas en una micela se conoce como solubilización (Urum y Pekdemir, 2004).

La **emulsificación** es el proceso en el que en dos fases líquidas inmiscibles, una de las fases se dispersa a través de la otra en forma de gotas muy pequeñas. Los biosurfactantes de alto peso molecular son agentes emulsionantes eficientes. A menudo se aplican como aditivos para estimular la biorremediación y la eliminación de sustancias oleosas de los ambientes (Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2011).

- Biorremediación de metales por biosurfactantes

La utilidad de los biosurfactantes para la biorremediación de suelos o sistemas contaminados con metales pesados se basa principalmente en su capacidad para formar complejos con metales. Los biosurfactantes aniónicos crean complejos con metales mediante enlaces iónicos. (Figura 1.7) (Pacwa-Plóciniczak *et al.*, 2011).

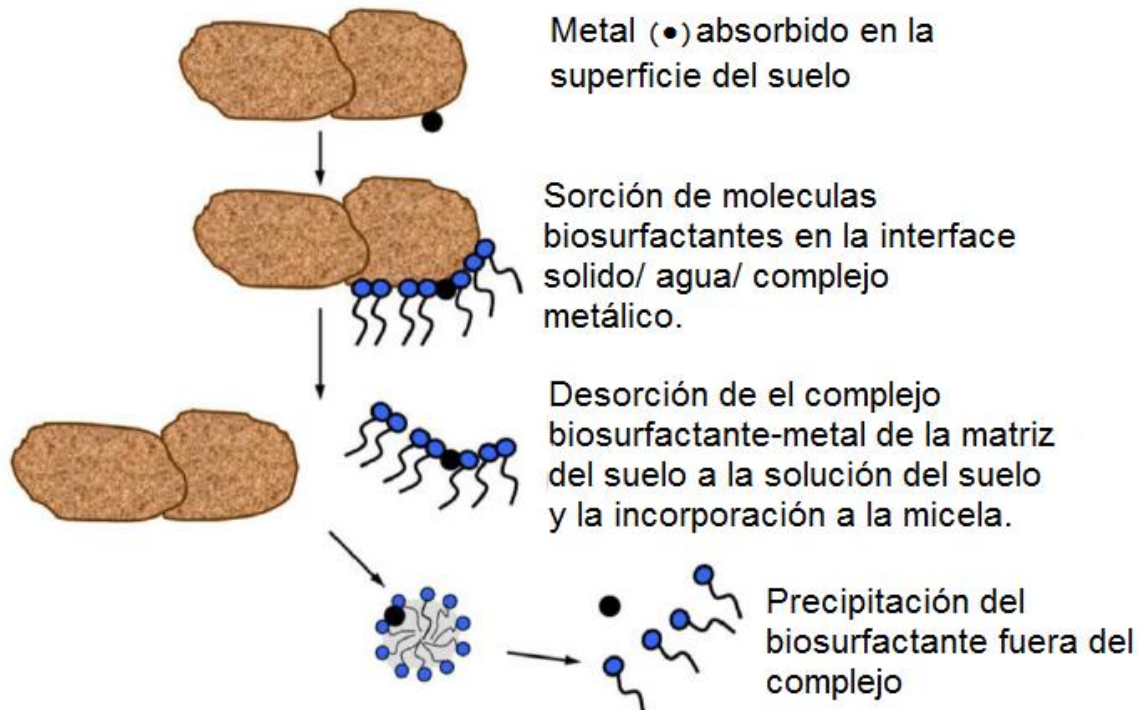


Figura 1.7 Mecanismo de actividad de los biosurfactante en suelos contaminados con metales.

- Aplicación de los biosurfacatantes en medicina

Dentro del área biomédica también se han llevado a cabo algunos estudios sobre aplicaciones relacionadas con los biosurfactantes. Algunos de ellos son alternativas adecuadas a los medicamentos sintéticos y antimicrobianos (Tabla 1.3) y pueden utilizarse como agentes terapéuticos seguros y efectivos (Rodriguez *et al.*, 2006b).

Tabla 1.3 Ejemplos de aplicaciones de biosurfactantes en el campo médico.

| Microorganismo | Biosurfactante | Actividad/aplicación | Referencia |
|-------------------------------|--------------------------------------|--|---|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ramnolipidos | <ul style="list-style-type: none"> • Actividad antimicrobiana contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> • Actividad antiadhesiva contra muchas cepas de bacterias y levaduras aisladas de prótesis de voz | Gerard <i>et al.</i> , 1997; Rodrigues <i>et al.</i> , 2006b; Lang, S. y Wullbrandt, 1999; Maier y Soberon-Chavez, 2000 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | surfactina | <ul style="list-style-type: none"> • Actividad antimicrobiana y antifúngica • Inhibición de formación de coágulos de fibrina • Hemólisis y formación de canales iónicos en membranas lipídicas | Vollenbroich <i>et al.</i> , 1997a; Vollenbroich <i>et al.</i> , 1997b; |
| <i>Bacillus pumilus</i> | pumilacidina (análogo de surfactina) | <ul style="list-style-type: none"> • Actividad antiviral contra el virus del herpes simple 1 (HSV-1) • Actividad inhibitoria contra H⁺, K⁺ -ATPasa y protección contra úlceras gástricas <i>in vivo</i> | Naruse <i>et al.</i> , 1990 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | iturina | <ul style="list-style-type: none"> • Actividad antimicrobiana y actividad antifúngica contra micosis profundas. • Efecto sobre la morfología y estructura de membrana de las células de levadura. • Incremento de la conductividad eléctrica de las membranas lipídicas biomoleculares. | Ahimou <i>et al.</i> , 2001; Besson <i>et al.</i> , 1976; |

| | | | | |
|-----------------------------------|------------------------------|--|---|--|
| <i>Bacillus licheniformis</i> | lichenisina | | <ul style="list-style-type: none"> • Adyuvante inmunológico no tóxico y no pirogénico • Actividad antibacterial | <p>Tanaka <i>et al.</i>, 1997;</p> <p>Thimon <i>et al.</i>, 1995;</p> <p>Mittenbuhler <i>et al.</i>, 1997</p> |
| <i>Candida antartica</i> | lípidos de manosil erytritol | | <ul style="list-style-type: none"> • Propiedades quelantes que podrían explicar el efecto de la ruptura de la membrana de los lipopéptidos • Propiedades antimicrobianas, inmunológicas y neurológicas. | <p>Jenny <i>et al.</i>, 1991;</p> <p>Lin <i>et al.</i>, 1994;</p> <p>Yakimov <i>et al.</i>, 1995;</p> <p>Grangemard <i>et al.</i>, 2001</p> |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> | Lípidos de trehalosa | | <ul style="list-style-type: none"> • Inducción de la diferenciación celular en la línea celular de leucemia promielocítica humana HL60 • Inducción de la diferenciación neuronal en células PC12. • Actividad antiviral contra HSV y virus de influenza. | <p>Kitamoto <i>et al.</i>, 1993;</p> <p>Isoda <i>et al.</i>, (1999a);</p> <p>Isoda <i>et al.</i>, (1999b);</p> <p>Shibahara <i>et al.</i>, 2000;</p> <p>Zhao <i>et al.</i>, 1999; Zhao <i>et al.</i>, 2000;</p> <p>Wakamatsu <i>et al.</i>, 2001</p> |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | glicolípidos | | <ul style="list-style-type: none"> • Actividad antiadhesiva contra varias cepas bacterianas y de levadura aisladas de prótesis de voz. | Uchida <i>et al.</i> , 1989ayb |
| <i>Streptococcus mitis</i> | No identificado | | <ul style="list-style-type: none"> • Actividad antiadhesiva contra <i>Streptococcus mutans</i> | <p>Busscher <i>et al.</i>, 1994;</p> <p>Busscher <i>et al.</i>, 1997;</p> |

| | | | |
|---------------------------|-----------------|--|---|
| | | | Busscher <i>et al.</i> , 1999; Rodrigues <i>et al.</i> , 2004b; Rodrigues <i>et al.</i> , 2006c |
| <i>Lactobacillus</i> | surfactina | •Actividad antiadhesiva contra varios patógenos incluyendo bacterias entéricas. | Pratt-Terpstra <i>et al.</i> , 1989; Van Hoogmoed <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Lactococcus lactis</i> | No identificado | •Actividad antiadhesiva contra varias cepas bacterianas y de levadura aisladas de prótesis de voz. | Velraeds <i>et al.</i> , 1996a; Velraeds <i>et al.</i> , 1996b; Velraeds <i>et al.</i> , 1997; Reid <i>et al.</i> , 1984; Reid <i>et al.</i> , 1999 Rodrigues <i>et al.</i> , 2004b; Rodrigues <i>et al.</i> , 2004a |

- Recuperación mejorada de hidrocarburos vía microbiana (MEOR)

Una de las aplicaciones potenciales de los microorganismos productores de biosurfactantes es la recuperación mejorada de hidrocarburos vía microbiana, denominada por sus siglas en inglés MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery).

MEOR es una tecnología de recuperación terciaria que utiliza microorganismos y / o sus productos metabólicos finales para la recuperación de aceite residual.

En general, se acepta que aproximadamente el 30% del aceite presente en un yacimiento puede recuperarse utilizando tecnología de recuperación mejorada (EOR, por sus siglas en inglés) actual (Singer y Finnerty, 1984).

La implementación de tecnologías EOR se realiza principalmente por la baja recuperación de petróleo en los pozos productores existentes, la cual puede deberse a varios factores. El principal factor es la baja permeabilidad de algunos yacimientos o la alta viscosidad del aceite, que resultan en una movilidad pobre. Las altas tensiones interfaciales entre el agua y el aceite también pueden dar lugar a altas fuerzas capilares que retienen el aceite en la roca del yacimiento (Bubela, 1987).

Dado que la mayor parte del petróleo permanece en el yacimiento aun después de aplicar técnicas de recuperación primaria y secundaria, el interés ha evolucionado en las técnicas de recuperación terciaria o EOR (Morkes, 1993). Sin embargo, las técnicas que involucran el uso de procesos químicos o físicos, como la presurización, la inyección de agua o vapor, generalmente no son aplicables a la mayoría de los yacimientos de petróleo y por otro lado el uso de surfactantes químicos para la extracción de petróleo de los yacimientos es una práctica desfavorable, costosa y que deja residuos indeseables que son difíciles de eliminar afectando negativamente al medio ambiente.

Para mayor comprensión se continuación se explican brevemente los tipos (etapas) de extracción de aceite crudo que se llevan a cabo en los yacimientos.

Tipos de extracción de petróleo

La extracción o explotación del petróleo se hace de acuerdo a las características que presenta cada yacimiento. Dentro de los tipos de extracción que se pueden realizar se encuentran la extracción primaria, secundaria y mejorada (Rashedi *et al.*, 2012):

a) Extracción primaria:

El petróleo se encuentra presente en los poros pequeños y en las fisuras estrechas e intersticios dentro de la matriz del yacimiento. La presión natural del yacimiento hace que el aceite fluya hacia la superficie y proporciona la llamada extracción primaria. Este tipo de extracción depende de la energía interna, las características de la roca del yacimiento y las propiedades de los fluidos (hidrocarburos y agua). En algunos yacimientos, que son parte de un sistema acuífero mucho más grande, el flujo natural de aguas subterráneas puede ser la fuerza impulsora para empujar y desplazar el petróleo.

La presión inicial del yacimiento suele ser lo suficientemente alta para elevar el aceite hasta la superficie; sin embargo, a medida que avanza la extracción de petróleo, la presión del yacimiento se reduce continuamente hasta un punto en el que se requiere una elevación o bombeo artificial para mantener una tasa de producción de petróleo económica. En otros yacimientos, puede haber otros mecanismos de recuperación, como la expansión del gas disuelto durante el descenso de la presión. A medida que la presión del yacimiento cae por debajo del punto de burbuja durante la producción, algunos de los componentes más volátiles se liberan y salen de la fase líquida para formar pequeñas burbujas de gas. Inicialmente, las burbujas quedan atrapadas en los poros y luego su expansión provoca el desplazamiento del aceite (unidad de gas disuelto). Además, en algunos yacimientos, a medida que disminuye la presión, las burbujas de gas aumentan de tamaño y eventualmente se unen formando una fase gaseosa continua que fluye hacia la parte superior del yacimiento formando una tapa de gas. El tapón de gas se expande constantemente a medida que la presión del yacimiento disminuye continuamente, desplazando más petróleo (impulsor del tapón de gas) a los pozos de producción.

b) Extracción secundaria:

A medida que la presión del yacimiento disminuye durante la producción primaria, se alcanza un punto crítico, en este momento es necesario proporcionar energía externa para que el yacimiento logre una recuperación adicional de petróleo, lo que se denomina recuperación secundaria. La energía extra se puede introducir inyectando gas y / o agua (inundación de agua).

La inyección de gas generalmente solo se aplica a los yacimientos que tienen una tapa de gas en donde la conducción del gas sería un mecanismo de desplazamiento eficiente. La inyección de agua, en la actualidad es uno de los métodos más comunes de recuperación de petróleo, mantiene la presión del yacimiento alrededor del punto de burbuja, evitando así que los poros se bloqueen por los gases disueltos. Además, según la termodinámica de hidrocarburos, en el punto de burbuja, el aceite tendrá su viscosidad más baja. De modo que, para un gradiente de presión específico, la cantidad máxima de aceite se desplazará bajo esta condición. Después de algunos años de operación en un campo, debido a la heterogeneidad del yacimiento, los fluidos inyectados (agua o gas) fluyen preferentemente a lo largo de capas altamente permeables que hacen que estos fluidos eviten las áreas saturadas de petróleo en el yacimiento. Por lo tanto, una cantidad cada vez mayor de agua o gas aumenta con respecto al petróleo, y al disminuir la proporción entre petróleo y agua, eventualmente se vuelve antieconómico continuar el proceso y el campo debe abandonarse.

El uso sucesivo de la recuperación primaria y la recuperación secundaria en un yacimiento de petróleo produce alrededor del 15% al 40% del petróleo original existente en el lugar (Schlumberger, 2018).

c) Extracción terciaria o recuperación mejorada de petróleo (EOR, Enhanced Oil Recovery, por sus siglas en inglés):

En general, la recuperación de petróleo terciaria o mejorada implica la extracción de petróleo residual después de las fases primaria y secundaria de producción. En esta etapa, se emplean métodos modernos y técnicamente avanzados para modificar las propiedades de los fluidos del yacimiento y/o rocas, con el objetivo de obtener eficiencias de recuperación adicionales a las obtenidas por los métodos de recuperación convencionales (primaria y secundaria). Esto se puede lograr basándose en diferentes mecanismos, como reducir la tensión interfacial entre el aceite y el agua, reducir la viscosidad del aceite (métodos térmicos), crear un desplazamiento miscible y aumentar la viscosidad del fluido de desplazamiento para que sea más viscoso que el aceite. El método EOR es aplicado dependiendo de las especificaciones de cada yacimiento, requiere de muestras de rocas y fluidos además de investigaciones de laboratorio.

En general, los procesos EOR se pueden clasificar en cuatro categorías principales:

- Métodos térmicos
- Métodos químicos
- Inyección de miscibles o disolventes
- Métodos microbianos (implementación de cepas bacterianas, hongos o levaduras)

Dentro del proceso MEOR intervienen los microorganismos o sus metabolitos, incluidos los biosurfactantes, biopolímeros, biomasa, ácidos, solventes, gases y también enzimas. Es utilizado para aumentar la recuperación de petróleo de los yacimientos maduros. La aplicación de biosurfactantes en MEOR es uno de los métodos más prometedores para recuperar una proporción significativa del aceite residual. El aceite residual a menudo se ubica en regiones del yacimiento a las que es difícil acceder y queda atrapado en los poros por la presión capilar (Sen, 2008). Los biosurfactantes reducen la tensión interfacial entre el aceite-agua y el aceite-roca, logrando la reducción de las fuerzas capilares que evitan que el aceite se mueva a través de los poros de la roca (Figura 1.8). Los biosurfactantes también pueden unirse fuertemente a la interfaz aceite-agua y formar emulsiones. Esto estabiliza el aceite desorbido en agua y permite el flujo y movilización del aceite junto con el agua de inyección (Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2011).

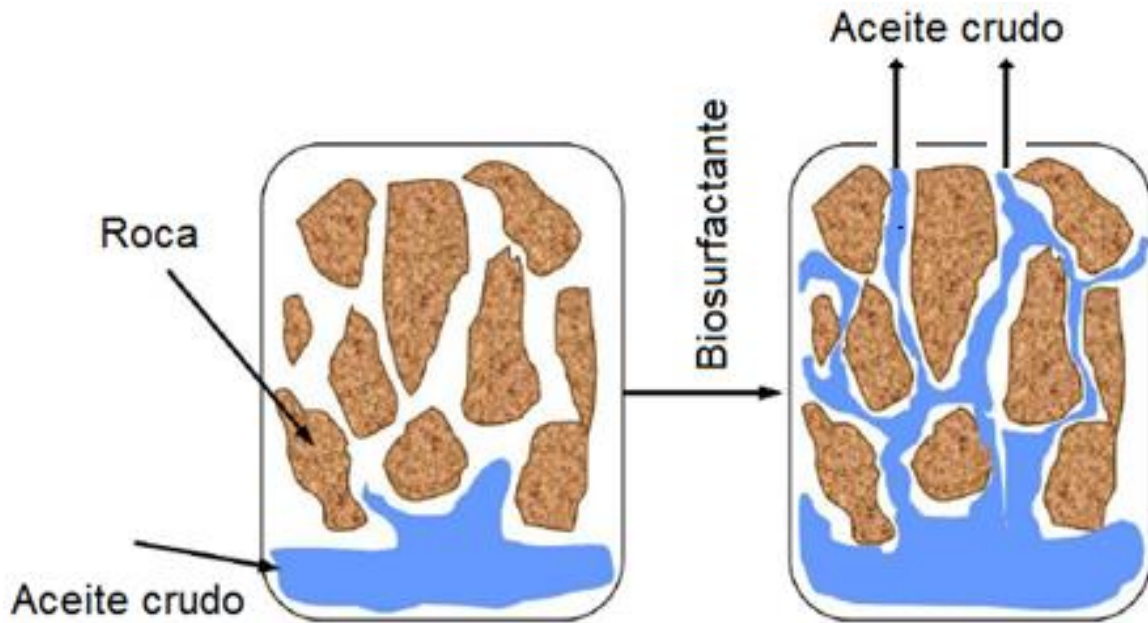


Figura 1.8 Mecanismo de recuperación mejorada de hidrocarburos por biosurfactantes.

Estrategias de aplicación de microorganismos en la recuperación mejorada de petróleo vía microbiana (MEOR)

- El primero consiste en la inyección de microorganismos que producen biosurfactantes en un yacimiento a través de un pozo, y su posterior propagación *in situ* a través de la roca del yacimiento (Bubela, 1985).
- El segundo involucra la inyección de nutrientes específicos para estimular microorganismos autóctonos presentes en el yacimiento, permitiendo su crecimiento y producción de biosurfactantes.
- El tercer mecanismo implica la producción de biosurfactantes en bioreactores *ex situ* y su posterior inyección en el yacimiento (Banat, 1995) (Figura 1.9).

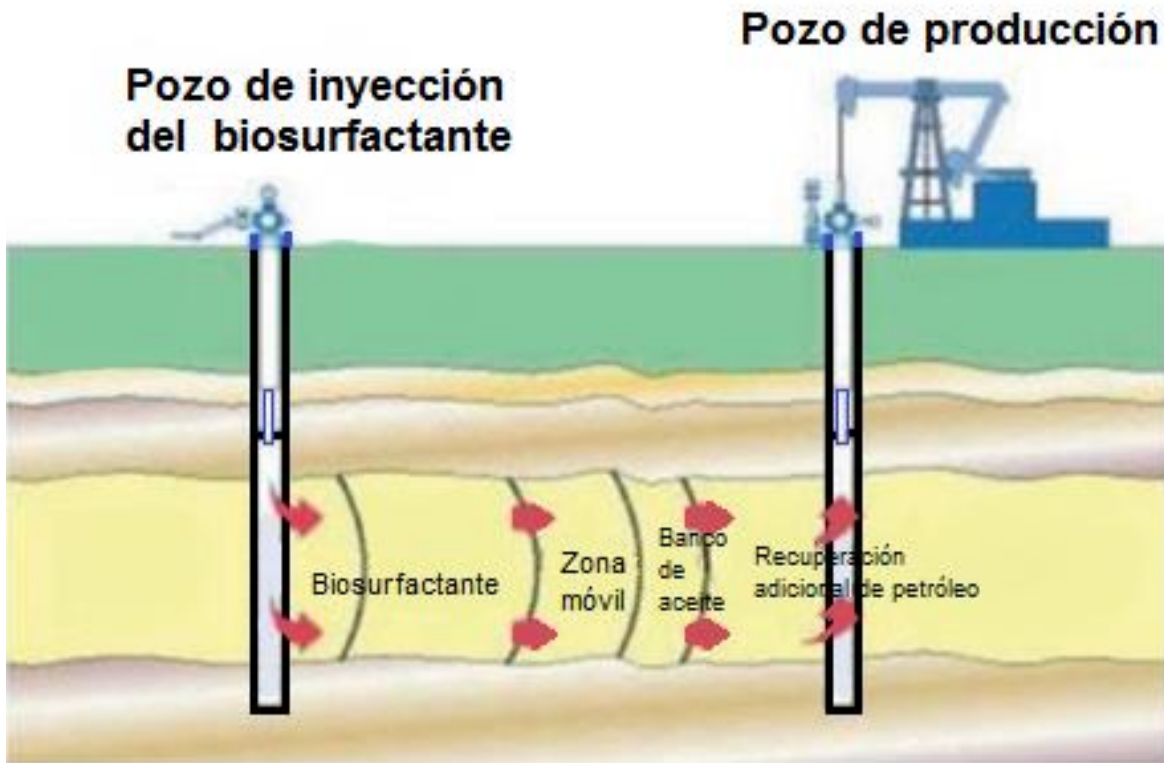


Figura 1.9 Esquema de inyección de biosurfactantes.

1.2 Antecedentes

A pesar de las características favorables de los surfactantes microbianos al medio ambiente: mayor biodegradabilidad, menor toxicidad, mejores propiedades espumantes en comparación con sus contrapartes químicas sintéticas y una mejor estabilidad a pH, salinidad y temperatura extremos, la comercialización de estos no se ha logrado en gran medida debido a sus costos de producción (Banat *et al.*, 2010).

Las técnicas de diseño experimental se han utilizado ampliamente para optimizar la producción de biosurfactantes. Mutalik *et al.*, (2008) mejoraron la producción de biosurfactante producido por *Rhodococcus spp.* MTCC 2574 en n-hexadecano, con rendimientos de biosurfactante que aumentaron de 3.2 a 10.9 gL⁻¹. Trabajando con *Gordonia sp.*, Franzetti *et al.* (2009) aumentaron la producción 5 veces de glucolípidos unidos a las células. Kronemberger *et al.* (2008) reportaron un aumento significativo en el rendimiento del biosurfactante al optimizar las condiciones de cultivo utilizando herramientas estadísticas. También informaron que los rendimientos pueden mejorarse aún más mediante el desarrollo de nuevos dispositivos de control, como el control de oxígeno.

La optimización de los componentes y condiciones de cultivo fue reportada por Rodrigues *et al.*, (2006a) concluyendo que es posible determinar las condiciones óptimas de operación para obtener un mayor crecimiento celular y por lo tanto un mayor rendimiento de la producción de biosurfactante; aumentando el rendimiento hasta 1.4 veces de BS producido por *Streptococcus thermophilus* (0.8 g de BS/L) y de *Lactococcus lactis* 53 (0.7 g de BS/L).

En los últimos años también se ha informado sobre nuevas cepas capaces de producir biosurfactantes en sustratos renovables y de bajo costo. Ruggeri *et al.*, (2009) aislaron *Rhodococcus sp.* BS32 capaz de crecer en aceite de canola para la producción de biosurfactantes extracelulares.

Respecto a la implementación de la optimización en MEOR, los estudios previamente realizados no han sido evaluados con aceites pesados, por lo que resulta importante para la industria petrolera nacional, ya que en su mayoría los yacimientos mexicanos contienen crudos pesados. Por lo anterior, es relevante su análisis para su posterior utilización en la recuperación mejorada de crudos en yacimientos mexicanos.

1.3 Hipótesis

La producción de biosurfactante se puede incrementar variando las condiciones de cultivo como: la fuente y concentración de nutrientes (nitrógeno, carbono y oligoelementos), así como los factores ambientales aireación, temperatura y salinidad. Estas condiciones pueden escalarse a nivel biorreactor para la producción del biosurfactante, el cual puede ser útil en la reducción de tensión interfacial en sistemas aceite pesado/agua.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

- Optimizar y realizar el escalamiento de biosurfactante producido por la cepa IMP-G, de nivel matraz a nivel bioreactor (3 L) para su posible aplicación en recuperación microbiana de petróleo mejorada (MEOR).

1.4.2 Objetivos específicos

- Establecer el tipo de fuente de carbono y la concentración más adecuada para el crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-G.
- Optimizar la producción de biosurfactante implementando un diseño ortogonal Taguchi L9 (3^4) variando 4 factores nutricionales (fuente de carbono, nitrógeno, magnesio y cobre).
- Establecer el efecto de factores ambientales (salinidad y temperatura) a nivel matraz sobre la actividad del biosurfactante.
- Realizar el escalamiento de la producción a nivel reactor (3 L) tomando en cuenta el diseño experimental y cinético a nivel matraz.
- Determinar la estabilidad de biosurfactante producido por la cepa IMP-G en función de su capacidad reductora de tensión superficial (TS), tensión interfacial (TIF) y su actividad emulsificante (E_{24}).
- Extraer, identificar y establecer el rendimiento del bioproducto crudo obtenido.

2. Material y métodos

2.1 Cepa

En este estudio se utilizó la cepa de *Bacillus subtilis* denominada IMP-G obtenida de la colección de Instituto Mexicano del Petróleo, conservada en tubo de ensaye con agar nutritivo y en congelación a -70 °C. Para su reactivación la cepa fue cultivada en matraz Erlenmeyer con 50 mL de caldo nutritivo a 30 °C, 110 rpm durante 24 horas.

2.1.1 Reactivación de la cepa

La reactivación de la cepa IMP-G se llevo acabo apartir de un criovial almacenado a -70 °C, el cual se inoculo en caldo nutritivo e incubó por 24 h a 30 °C. El cultivo anterior se denominó C1 y se utilizó como inóculo. Para confirmar la pureza de la cepa se realizó una siembra en caja con agar nutritivo, a partir de la muestra del cultivo C1 y se incubó a 30 °C por 18 h.

2.1.2 Caracterización morfológica de la cepa

2.1.2.1 Caracterización macroscópica

Para la caracterización de la cepa se realizaron siembras en cajas Petrí con agar nutritivo durante 18 h. Se observó la morfología de las colonias. Las características visibles que se reportaron fueron: color, elevación, tamaño, forma y borde.

2.1.2.2 Caracterización microscópica

Para identificar y comprobar la pureza de la cepa, se tomó una muestra en condiciones de esterilidad y se realizó una preparación en fresco y otra para tinción de Gram (Madigan *et al.*, 1998). Estas preparaciones fueron observadas en un microscopio óptico marca Nikon modelo E-800 con un objetivo 100x.

2.1.3 Conservación y mantenimiento

El cultivo C1 se resembró colocando 5% de inóculo en matraces Erlenmeyer con 50 mL de caldo nutritivo a 30 °C, se mantuvo en agitación constante a 110 rpm durante 24 h. Tambié se hicieron resiembras semanales en caja Petrí de las colonias aisladas e incubaron a 30 °C. Adicionalmente se conservó la cepa IMP-G en glicerol al 25 y 30 % en crioviales y se mantuvo en un congelador marca Revco a -70 °C.

2.2 Optimización del medio de cultivo para la producción de BS

2.2.1 Medio mineral base

Se empleó un medio mineral (BM) modificado indicado por Philip *et al.* (2002), adicionando una fuente de carbono soluble (mascabado). El medio se incubó a 30 °C a 110 rpm durante 24 h. Todos los productos químicos utilizados fueron de grado analítico ACS y compradas de Sigma-Aldrich.

2.2.2 Evaluación preeliminar del crecimiento y producción del biosurfactante por la cepa IMP-G

Para conocer el comportamiento del crecimiento y la producción de biosurfactante de la cepa se realizó una cinética utilizando matraces de 250 mL con 100 mL de BM y 5% de inóculo con una densidad óptica (DO) de 0.4. Se evaluó la producción de biomasa y la producción de biosurfactante mediante el descenso de tensión superficial (TS) cada 24 h durante 72 h.

2.2.3 Concentración de la fuente de carbono

Se evaluó el efecto de la concentración de la fuente de carbono sobre la producción del biosurfactante. Para establecer la concentración óptima de la fuente de carbono se llevó a cabo una cinética empleando 3 diferentes concentraciones de mascabado: 10%, 15% y 20%. Los cultivos se incubaron a 30 °C a 110 rpm durante 78 h. Se tomaron muestras para determinar la DO y TS.

2.2.4 Formulación del medio de cultivo para la producción de biosurfactante empleando un diseño Taguchi L9 (3⁴)

Con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes nutrientes, a diferentes concentraciones sobre la producción de biosurfactante, se desarrolló un diseño Taguchi L9 (3⁴) con cuatro variables a tres niveles (Tabla 2.1). Las variables y los valores de cada uno de los niveles se muestran en la tabla 2.2. Los tratamientos se inocularon con la cepa C1 utilizando matraces de 250 mL con 100 mL de BM y adicionando 1.5 mL de inóculo. Estos tratamientos se incubaron a 30 °C y 110 rpm durante 100 h. Los tratamientos se realizaron por triplicado.

Tabla 2.1 Diseño experimental Taguchi L9 (3⁴).

| No. de tratamiento | Fuente de Carbono | de | Concentración de NaNO ₃ | Concentración de MgSO ₄ | Concentración de CuSO ₄ |
|--------------------|-------------------|----|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 1 | | 1 | 1 | 1 |
| 2 | 1 | | 2 | 2 | 2 |
| 3 | 1 | | 3 | 3 | 3 |
| 4 | 2 | | 1 | 2 | 3 |
| 5 | 2 | | 2 | 3 | 1 |
| 6 | 2 | | 3 | 1 | 2 |
| 7 | 3 | | 1 | 3 | 2 |
| 8 | 3 | | 2 | 1 | 3 |
| 9 | 3 | | 3 | 2 | 1 |

Tabla 2.2 Concentración de los niveles estudiados en el diseño experimental Taguchi.

| Nivel | Fuente de Carbono (10%) | NaNO ₃ (gL ⁻¹) | MgSO ₄ (gL ⁻¹) | CuSO ₄ (gL ⁻¹) |
|-------|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1 | Mascabado | 1.0 | 0.4 | 0.0005 |
| 2 | Sacarosa | 2.0 | 0.5 | 0.001 |
| 3 | Glucosa | 2.5 | 0.6 | 0.008 |

Los resultados del diseño experimental Taguchi, fueron analizados empleando el software Statistica V.8, considerando como variable de respuesta la disminución de TS.

2.2.5 Cinética de producción del biosurfactante

A partir de los resultados obtenidos en el diseño experimental, se determinaron los tratamientos experimentales que presentaron la mayor reducción en la tensión superficial. También con el software Statistica se estableció la combinación de nutrientes óptima (combinación teórica). Con estos datos se llevó a cabo una cinética empleando las formulación(es) seleccionad(as). Los sistemas de cultivo se realizaron por triplicado, se inocularon e incubaron a 30 °C por 100 h. Se evaluó la actividad tensoactiva de la cepa, tomando como variable la disminución de TS.

2.3 Evaluación de factores ambientales que afectan la producción de la biomolécula tensoactiva

Para evaluar las condiciones de operación del biosurfactante producido por la cepa IMP-G, ésta fue sometida a diferentes condiciones ambientales (temperatura, salinidad y aireación) evaluando un intervalo definido para cada variable.

2.3.1 Evaluación de la temperatura sobre el crecimiento y producción del biosurfactante

Altmajer *et al.*, (2012) encontraron que la temperatura más usual a la que se suelen producir los BS en las bacterias mesófilas es a 20-25 °C sin embargo dependiendo de su uso comercial es necesario ser utilizado a temperaturas superiores.

Por esta razón se llevó a cabo la determinación de la producción del biosurfactante y crecimiento producido por la cepa IMP-G, realizando una cinética en matraces de 250 mL con 100 mL del medio mineral BM adicionando 5 mL de inóculo 0.4 DO, los sistemas se realizaron por triplicado y se colocaron en una incubadora orbital con agitación de 130 rpm a las diferentes temperaturas a evaluar: 30 °C, 40 °C y 60 °C durante 72 h. El crecimiento fue obtenido en base a la DO medida en espectrofotómetro a 620nm, mientras que la producción de biosurfactante se determinó de acuerdo a la TS del caldo libre de células; ambos parámetros fueron analizados cada 24 h.

2.3.2 Evaluación de la salinidad sobre el crecimiento y producción del biosurfactante

La producción del biosurfactante de la cepa IMP-G fue evaluada a 4 diferentes concentraciones salinas: 1gL⁻¹, 10 gL⁻¹, 15 gL⁻¹ y 20 gL⁻¹ en cada una de las cuales se determinó su actividad productora de BS durante un periodo de 96 h. Para cada sistema se midió la tensión superficial y biomasa por triplicado.

2.3.3 Evaluación del efecto del oxígeno sobre el crecimiento y producción de biosurfactante con la cepa IMP-G.

Esta evaluación se llevó a cabo en sistemas cerrados empleando frascos serológicos de 125 mL con un contenido de 50 mL de BM. A estos sistemas se les realizó un intercambio de atmósfera inyectando nitrógeno y sacando aire estéril con la finalidad de obtener 3 diferentes proporciones de la mezcla aire-nitrógeno (0/100%, 25/75% y 50/50%) (Tabla 2.3). Posteriormente se inocularon al 1% (0.4 DO) con el microorganismo IMP-G y se incubaron a las mismas condiciones que a nivel matraz 30 °C y 110 rpm.

Tabla 2.3 Sistemas con las diferentes atmósferas.

| Sistema | No. botellas | Aire (%) | Tiempo de suministro de N ₂ (min) | Volumen de aire a adicionar (mL) | O ₂ (%) |
|---------|--------------|----------|--|----------------------------------|--------------------|
| 1 | 5 | 0 | 10 | 0 | 0 |
| 2 | 5 | 25 | 10 | 25 | 6.7 |
| 3 | 5 | 50 | 10 | 50 | 11.5 |

Se analizaron la fase acuosa y la fase gaseosa de los sistemas de las muestras, desde el tiempo 0 y hasta las 168 h. Para la fase gaseosa, se evaluó el contenido de gases presentes, inyectando 0.5 mL del contenido de cada frasco en un cromatógrafo Gow Mac. Mientras que para la fase acuosa se determinó la biomasa a 620 nm, se observó su morfología en microscopio 100x y posteriormente con el cultivo libre de células se evaluó la producción de BS mediante las técnicas de dispersión de aceite y tensión superficial.

2.4 Evaluación de la producción de biosurfactante con la cepa IMP-G a nivel bioreactor.

2.4.1 Escalamiento a nivel reactor de 3 L.

El escalamiento se realizó en un reactor de tipo tanque agitado de 3 L con propelas tipo Rushton. El equipo fue esterilizado con el medio mineral a 121°C y 15 psi, durante 15 min, se esperó a que el caldo descendiera a temperatura ambiente y se inoculó con 1% v/v (0.4 DO) de cultivo de la cepa IMP-G.

Las condiciones de trabajo del reactor fueron: volumen operacional de 1.5 L, agitación de 175 rpm, aireación de 0.7 vvm y temperatura de cultivo de 30 °C. Estos parámetros se ajustaron y monitorearon con el controlador Applikon ADI-1030 y agitador ADI 1032 (Fig 2.1).



Figura 2.1 Tanque de bioreactor, controlador y agitador Applikon.

Se tomaron muestras de cultivo cada 24 h y hasta las 72 h para evaluar la producción de BS. Además se determinó la concentración micelar crítica (CMC), dilución micelar crítica (DMC) y dispersión de aceite (DA) del biosurfactante contenido en la espuma producida.

2.4.2 Separación y rendimiento del bioproducto.

En cuanto a la separación y rendimiento del BS, al término de la cinética se llevó a cabo la precipitación del biosurfactante presente en el caldo mediante la adición de HCl al 0.1 N y manteniendo en refrigeración a 4°C por 12 h. Para posteriormente separar el sobrenadante del precipitado, este se colocó en frascos y se congelaron a -70°C y se eliminó el agua presente por medio de sublimación empleando una liofilizadora marca Labconco (-50°C) y vacío (0.070 mBar) (Figura 2.2) durante 72 h. Una vez finalizado este periodo la muestra fue llevada a peso constante en horno a 80°C durante 72 h.

Para el caso del frasco que contenía la espuma, a este se le eliminó el agua llevándolo directamente a peso constante en horno a 80°C durante 72 h.



Figura 2.2 Liofilizadora marca Labconco freezone 2.5 L.

2.5 Métodos analíticos

2.5.1 Preparación de las muestras

Se tomaron 5 mL de las muestras (caldo de cultivo) y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min a una temperatura de 4°C. El sobrenadante fue separado de la biomasa y con éste se evaluó la TS y DA.

2.5.2 Evaluación de la tensión superficial

La presencia de biosurfactante en el sobrenadante de los cultivos libre de células fue evaluada mediante la medición de tensión superficial, usando el método de la placa propuesto por Wilhelmy en un tensiómetro Krüss (modelo K100) (Salager, 2005).

Cada medición se realizó por triplicado a 25 °C y se utilizó el medio de cultivo sin inocular como control. Así mismo y para verificar el correcto funcionamiento del equipo se midió la TS del agua, reportada en 72. 2 mN/m a 20°C (Shawn, 1992).

Este método se basa en aplicar la fuerza necesaria para vencer la tensión superficial de las muestras analizadas (Youssef *et al.*, 2007), mediante el desplazamiento vertical de una placa Wilhelmy de platino. La cual se coloca dentro del líquido y se retira verticalmente para ejercer una fuerza directamente proporcional a la tensión superficial del líquido.

2.5.3 Dispersión de aceite

Otro método para la evaluar el efecto de un biosurfactante es la prueba de dispersión de aceite (DA) (Youssef *et al.*, 2004). Esta una técnica rápida y fácil para la predicción y cuantificación de la producción de biosurfactantes.



Figura 2.3 Placa Petri con agua e hidrocarburo para dispersión de aceite.

2.5.4 Densidad óptica

El crecimiento del microorganismo fue determinado mediante la medición de la biomasa, evaluando la densidad óptica de la muestra a 620 nm con un espectrofotómetro ThermoSpectronic (modelo Biomate 35) utilizando medio sin inocular como blanco.

2.5.5 Actividad emulsificante (%E₂₄)

La presencia de agentes tensoactivos es necesaria para formar y estabilizar sistemas dispersos tales como espumas y emulsiones (Deleu *et al.*, 1999).

Se determinó la actividad emulsificante del BS ante dos tipos de crudo, empleando aceites ligeros de acuerdo a la escala de densidad brindada por el American Petroleum Institute: aceite 600F (33.39 °API), aceite 500A (22.49 °API) (ver Figura 2.4) y salinidad de 50,000 mgL⁻¹ y 30 °C y 60 °C de temperatura, de acuerdo al método descrito por Pruthi y Cameotra (1997). En el que a tubos de ensayo con 3 mL de hidrocarburo se le adicionaron 3 mL de cultivo libre de células, se agitó durante 2 min en vortex a velocidad máxima y se dejó en incubación durante 24 h.

El índice de emulsificación (%E₂₄) fue determinado en términos del porcentaje de estabilidad de la emulsión, siguiendo la siguiente ecuación.

$$\%E_{24} = \frac{E_f}{H_t} * 100$$

Donde:

% E₂₄= % índice de emulsificación a las 24 h.

E_f= altura de la emulsión formulada

H_t= altura total

El blanco utilizado fue evaluado con el medio de cultivo sin inocular o agua destilada.

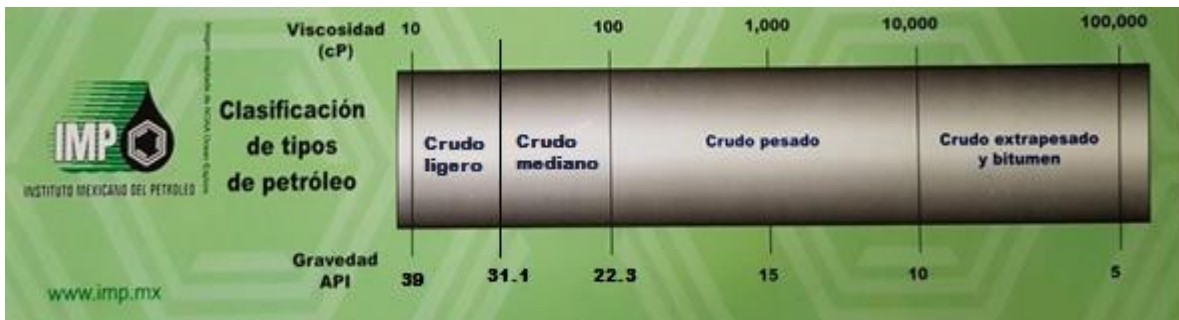


Figura 2.4 Clasificación de crudos con respecto a sus grados API. Imagen modificada de acuerdo a la clasificación de crudos del American petroleum institute.

2.5.6 Tensión Interfacial (TIF)

La tensión interfacial (TIF) de los líquidos examinados fue medida mediante la técnica de la gota pendiente usando el sistema de análisis de forma de gota DSA (Drop Shape Analyzer, por sus siglas en inglés) 100 KRUSS (Al-Bahry *et al.*, 2013) ajustando la temperatura a 30°C y 60°C. Utilizando como blanco el medio de cultivo.

La TIF se evalúa siempre entre dos fluidos, el primero es una gota de aceite y el segundo es el medio circundante (Figura 2.5). La forma de la gota dependerá entre otros factores de la naturaleza de los fluidos, la temperatura y la salinidad.

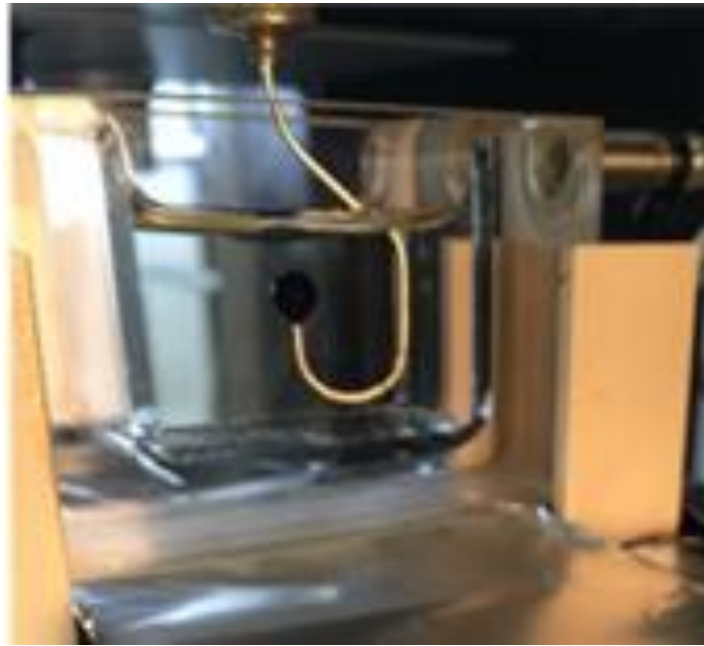


Figura 2.5 Medición de TIF empleando la técnica de la gota pendiente en sistema DSA.

Esta técnica se basa en que en ausencia de otras fuerzas (por ejemplo en gravedad cero), los líquidos tienen una tendencia natural a formar estructuras esféricas y minimizar el área interfacial por unidad de volumen de líquido, para reducir al mínimo el exceso de energía de la interfaz. La forma de una interfaz en un campo gravitatorio (Figura 2.5) depende de la competencia entre las fuerzas capilar y gravitacional y se pueden describir por la ecuación de Bashforth- Adams (Ec. 1)

$$\gamma \left(\frac{\sin\phi}{x} + \frac{1}{R_1} \right) = \frac{2\gamma}{b} + \Delta\rho g z \quad (\text{Ec. 1})$$

La ecuación 1 se expresa frecuentemente en forma adimensional como la ecuación 2:

$$\frac{\sin\phi}{x/b} + \frac{1}{R_1/b} = 2 + \frac{\Delta\rho g b^2}{\gamma} \frac{z}{b} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde γ es la tensión interfacial; $\Delta\rho = \rho_A - \rho_B$ es la diferencia entre la densidad de los fluidos; R_1 es el radio de curvatura; x es el radio de rotación del punto S alrededor del eje z ; ϕ es el ángulo del vector R_2 con el eje de simetría; b es el radio de curvatura en el vértice y g es la aceleración debida a la gravedad. La figura 2.5 muestra los detalles de la geometría de la gota.

En un método simple, dos parámetros de la gota colgante que deben determinarse experimentalmente son el diámetro ecuatorial (D) y el diámetro (d) en el cuello de la gota a la distancia (H) desde la parte superior de la gota (Fig. 2.6).

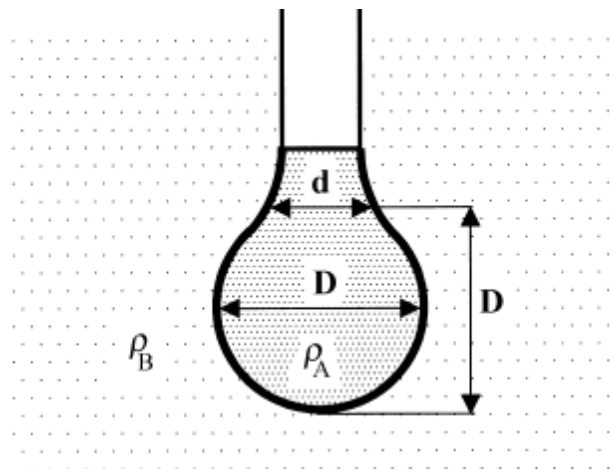


Figura 2.6 Principales dimensiones empleadas en la tensión interfacial con el método de la gota pendiente.

La tensión interfacial o superficial se calcula entonces a partir de la ecuación 3

$$\gamma = \frac{\Delta \rho g D^2}{H} \quad (\text{Ec. 3})$$

La técnica de la gota pendiente, como otras técnicas para la determinación de la tensión interfacial y/o superficial, requiere extrema pureza de los componentes con el objetivo de obtener resultados confiables y reproducibles.

3. Resultados y discusión

3.1 Cepa

3.1.1 Reactivación de la cepa

Se inoculó la cepa en caldo nutritivo en el que se presentó crecimiento bacteriano a las 24 horas, volviendo el medio turbio y de color beige, del cual se pudo extraer la muestra para hacer las resiembras en placa petrí y realizar la tinción Gram.

3.1.2 Caracterización morfológica de la cepa (microscópica y macroscópica)

El cultivo de la cepa IMP-G en caja con agar nutritivo permitió observar sus características macroscópicas, obteniendo su color, elevación, tamaño, forma, Borde y textura (Tabla 3.1 y Figuras 3.1-3.2).

Tabla 3.1 Características macroscópicas de la cepa IMP-G.

| Característica | Descripción |
|-----------------------|--------------------|
| Color | Beige |
| Elevación | Convexa |
| Tamaño | 2-3 mm |
| Forma | Circular |
| Borde | Irregular |
| Textura | Cremosa |

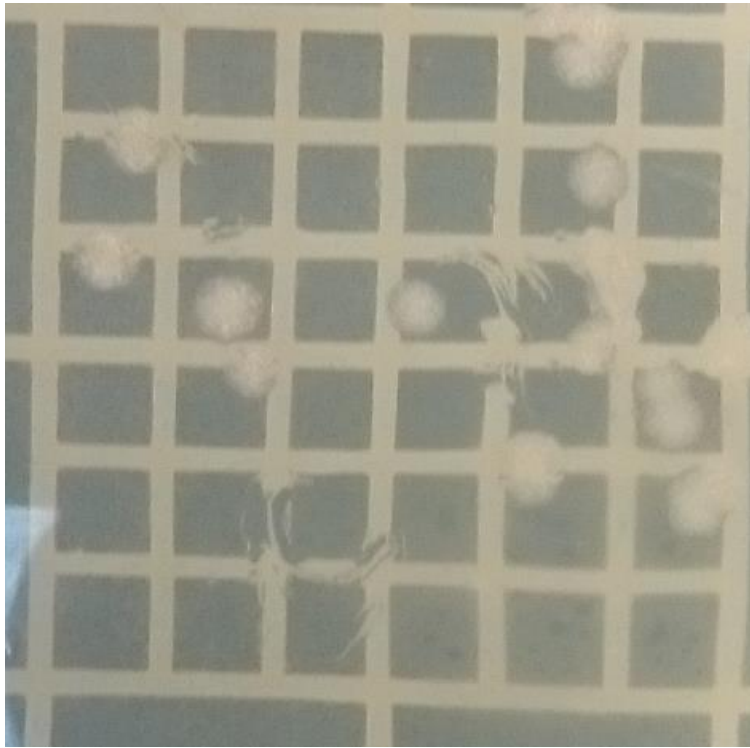


Figura 3.1 Cultivo IMP-G en caja petrí amplificado en el que se observa la morfología de las colonias aisladas.

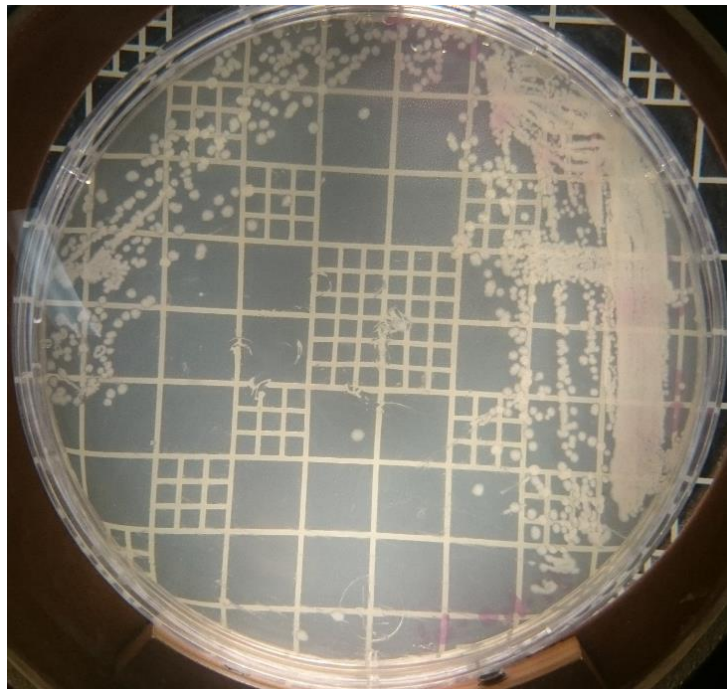


Figura 3.2 Cultivo de IMP-G en placa de Petri, en el que se observa la morfología macroscópica de la cepa.

Tanto la tinción de Gram, como la muestra en fresco confirmaron la pureza de la cepa mostrando solo bacilos (Figuras 3.3 y 3.4).

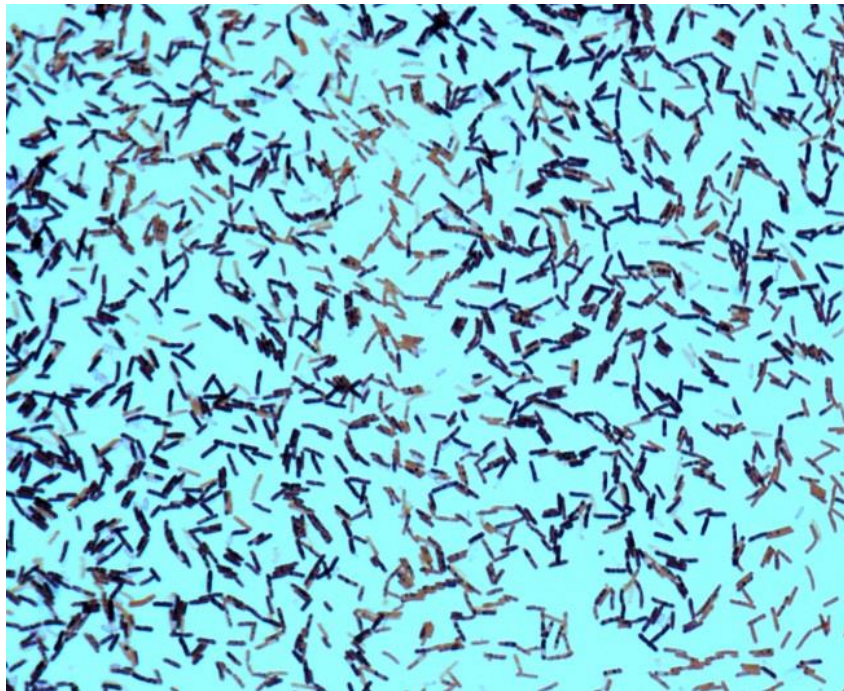


Figura 3.3 Gram de la cepa IMP-G reactivada en caldo nutritivo.

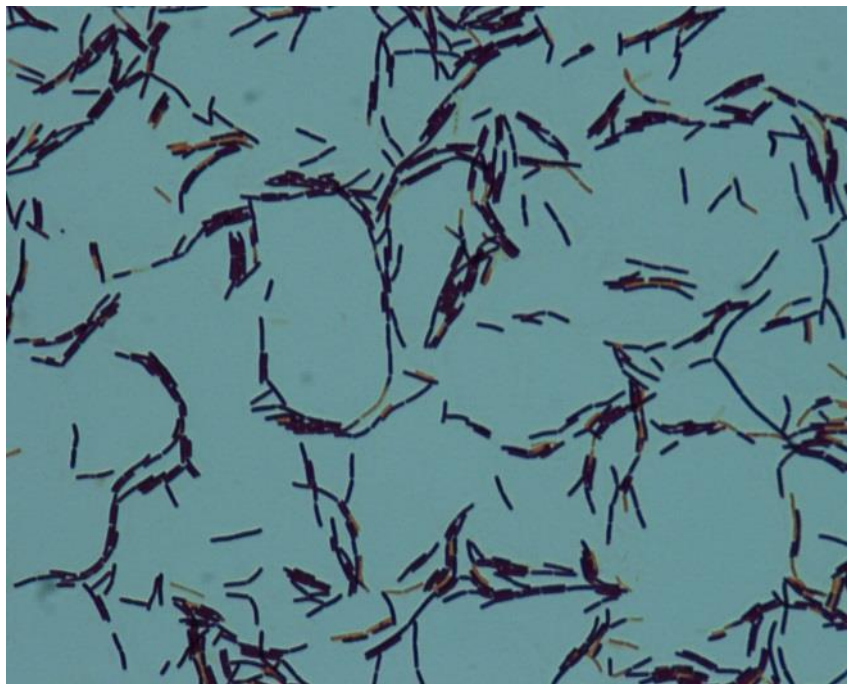


Figura 3.4 Tinción de Gram de la cepa IMP-G a partir de tubo de ensaye.

3.2 Cinética de crecimiento y producción del biosurfactante por la cepa IMP-G

La cepa fue resembrada en el medio mineral (BM) y se determinó la presencia de biosurfactante mediante la reducción de la tensión superficial (TS).

En la figura 3.5 se observa que la cepa sintetizó una sustancia con propiedades tensoactivas al lograr disminuir la TS de 72.6 mN/m a 34.5 mN/m con una reducción de 39.5 unidades a las 48 horas de incubación.

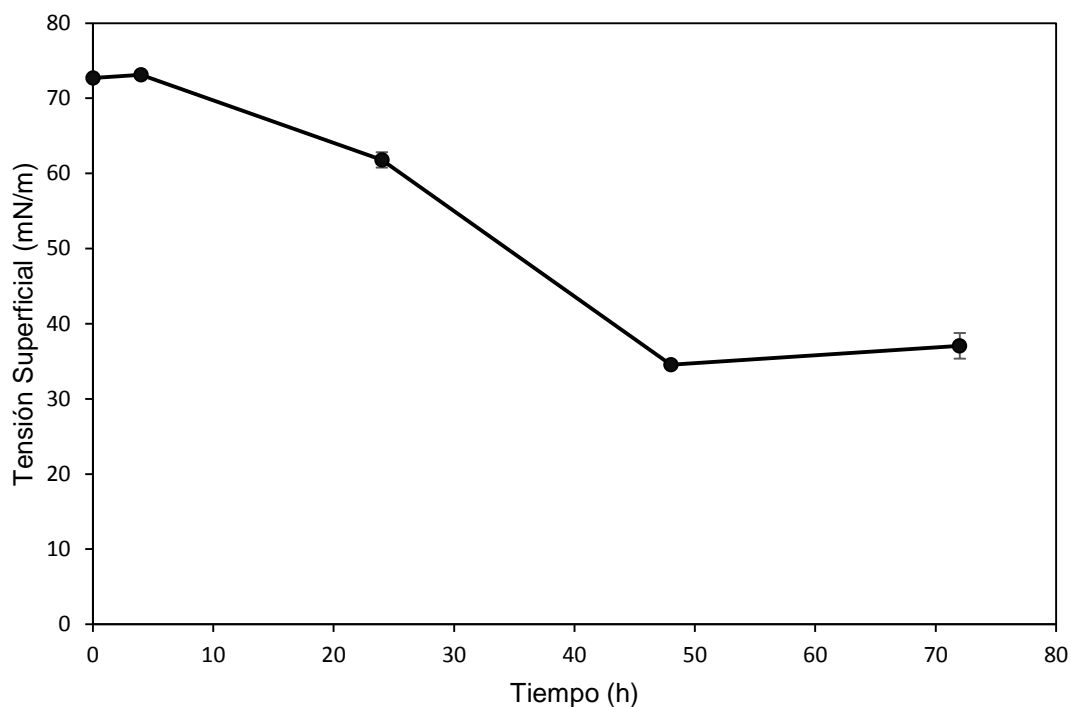


Figura 3.5 Evaluación de la actividad tensoactiva de la cepa IMP-G reactivada en medio mineral.

3.3 Medio de producción

3.3.1 Cinética con diferentes concentraciones de la fuente de carbono sobre la producción del biosurfactante

La concentración de la fuente de carbono tiene un gran impacto en la producción de metabolitos. Por esta razón es importante determinar la concentración más adecuada para cada bioproceso. En el presente trabajo se evaluaron diferentes concentraciones de mascabado (10, 15 y 20 %) para la producción de BS con la cepa IMP-G.

El tratamiento con 10% de mascabado descendió la TS 39.73 unidades mientras que el tratamiento con 20 gL⁻¹ de FC descendió la TS 40.09 unidades, y el de 15 % tuvo en desempeño semejante (Fig. 3.6). Por lo tanto se concluyó que el aumento

de la concentración del sustrato en el intervalo evaluado no presentó una diferencia significativa en el resultado, sin embargo el emplear la concentración mayor se elevan los costos por la cantidad utilizada y precio de la materia prima. En cuanto al tiempo los tres tratamientos mostraron comportamientos parecidos presentando la mayor reducción a las 30 h.

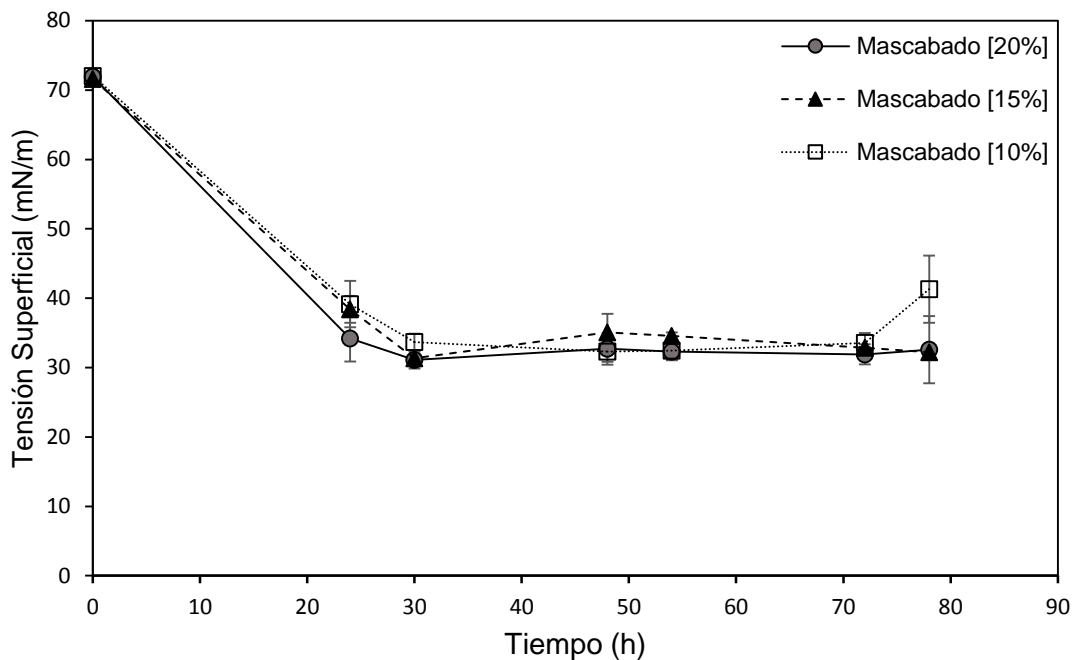


Figura 3.6 Evaluación de la reducción de tensión superficial entre los tratamientos con diferente concentración de sustrato.

3.3.2 Formulación del medio de cultivo para la producción de biosurfactante empleando un diseño Taguchi L9 (3⁴)

Según Smith (1996) los requerimientos básicos de los microorganismos son la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno disponible, los elementos inorgánicos y los factores ambientales (temperatura, aireación y pH). En el presente estudio se evaluó el efecto de diferentes nutrientes del medio BM que afectaron la producción de biosurfactante.

Utilizando el diseño ortogonal Taguchi L9 (3⁴) fueron evaluados 9 tratamientos con 4 variables: fuente de carbono (mascabado), NaNO₃, MgSO₄ y CuSO₄ a tres concentraciones diferentes baja, media y alta (Tablas 2.1 y 2.2).

En la figura 3.7 se presenta el primer grupo conformado por los tratamientos 1, 2 y 3 a los que se les adicionó mascabado como fuente de carbono, en los que se puede observar que en el caso del tratamiento 1 y 2 se da una disminución de la tensión superficial con más de 41 unidades después de las primeras 50 h. En cambio el tratamiento 3 desciende lentamente logrando alcanzar la misma tensión superficial hasta las 100 h de incubación.

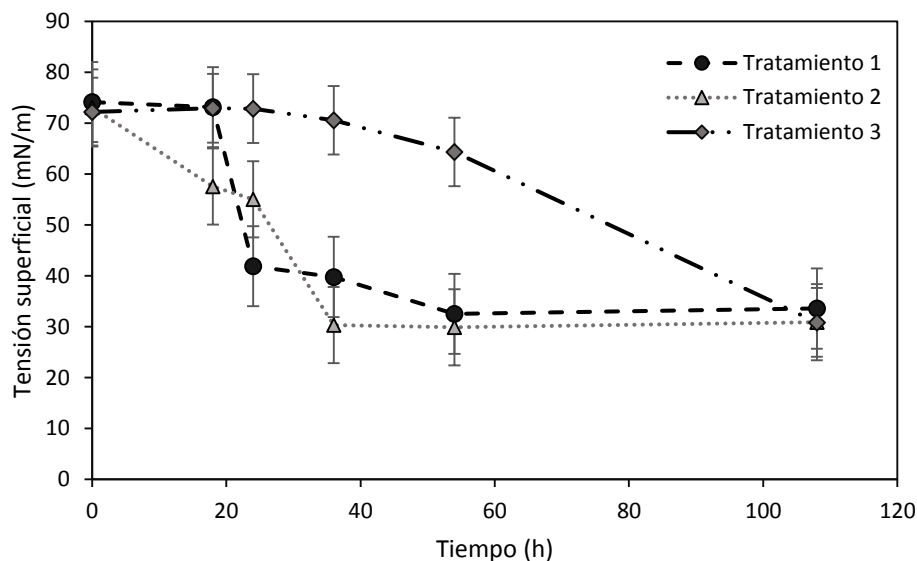


Figura 3.7 Evaluación de la reducción de tensión superficial en los tratamientos con mascabado como fuente de carbono.

En la figura 3.8 se muestra la dispersión de aceite (DA) de los tratamientos 1, 2 y 3. En el que se observa que los tres tratamientos presentan formación de halos, por la dispersión de aceite en función del tiempo de incubación.

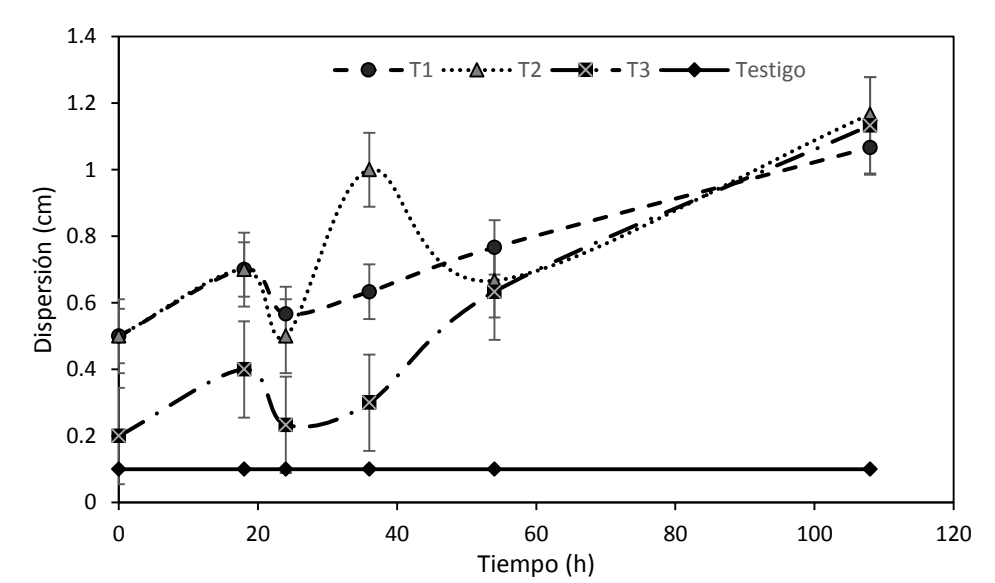


Figura 3.8 Dispersión de aceite de los sistemas 1, 2, 3 con mascabado y el testigo a diferentes periodos de incubación.

El segundo grupo se conformó por los tratamientos 3, 4 y 5 a los que se le adicionó sacarosa como fuente de carbono (Figura 3.9). Se logró observar que el tratamiento con mayor reducción de TS fue el tratamiento 6 logrando una reducción de 43 unidades, después de 50 h de incubación, siguiéndole el tratamiento 5 con 36 unidades a las 36 h y el tratamiento 4 logrando reducir tan solo 12 unidades después de 100 h de incubación.

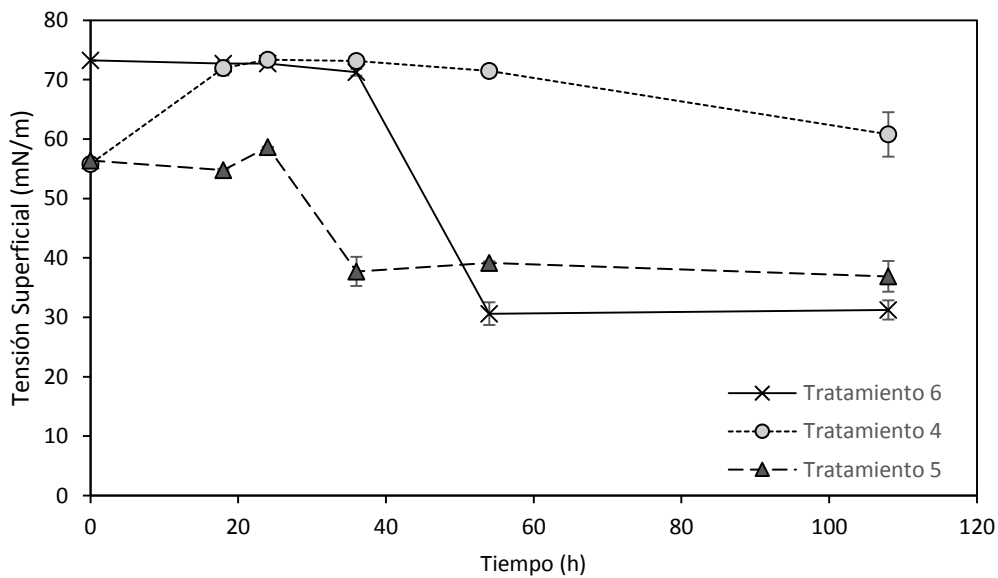


Figura 3.9 Evaluación de la reducción de tensión superficial en los tratamientos con sacarosa como fuente de carbono.

En el caso de los tratamientos con sacarosa (Figura 3.10) se observó que la formación de halos dentro del T4 fueron de menor dimensión (0.26 cm), siguiéndole el T5 (0.66 cm) y por último el T6 llegando a formar halos de 1 cm a las 108 h.

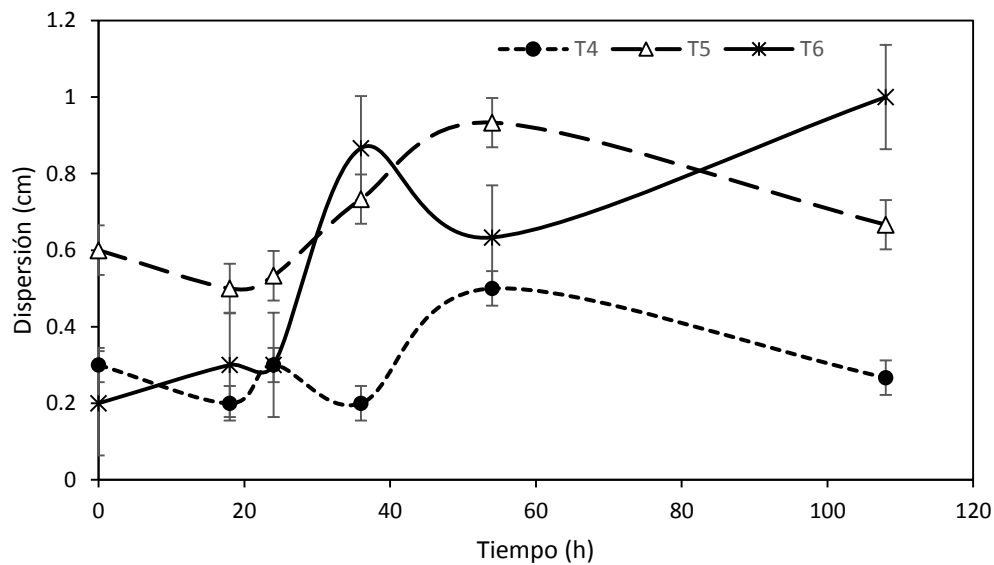


Figura 3.10 Dispersión de aceite de los tratamientos 4, 5 y 6 a diferentes periodos de incubación.

En la figura 3.11 se muestran los tratamientos 7, 8 y 9 con glucosa como fuente de carbono, de los cuales el tratamiento 9 fue el que presentó la mayor reducción de la TS hasta 40 unidades, a las 36 h; mientras que el tratamiento 7 presentó una reducción de 39.5 mN/m y para el caso del tratamiento 8 se dio una menor reducción bajando solo 14 unidades después de 100 h de incubación.

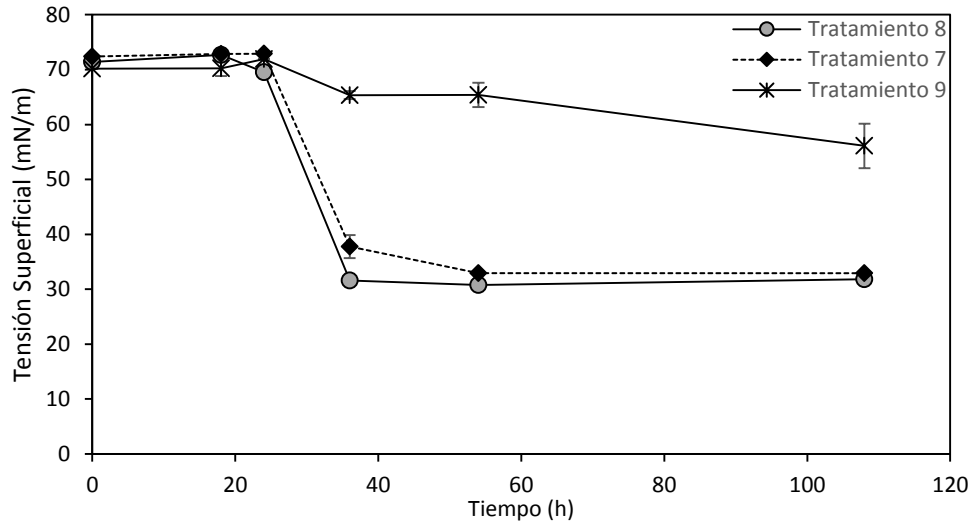


Figura 3.11 Evaluación de la tensión superficial en los tratamientos con glucosa como fuente de carbono.

Los halos de dispersión de los tratamientos con glucosa (Figura 3.12) mostraron mayor diámetro, siendo T8 el tratamiento con menor dispersión formando un halo de 0.73 cm siguiéndole el T9 con 0.8 cm y el T7 con la mayor actividad presentando un halo de 0.9 cm a las 108 h.

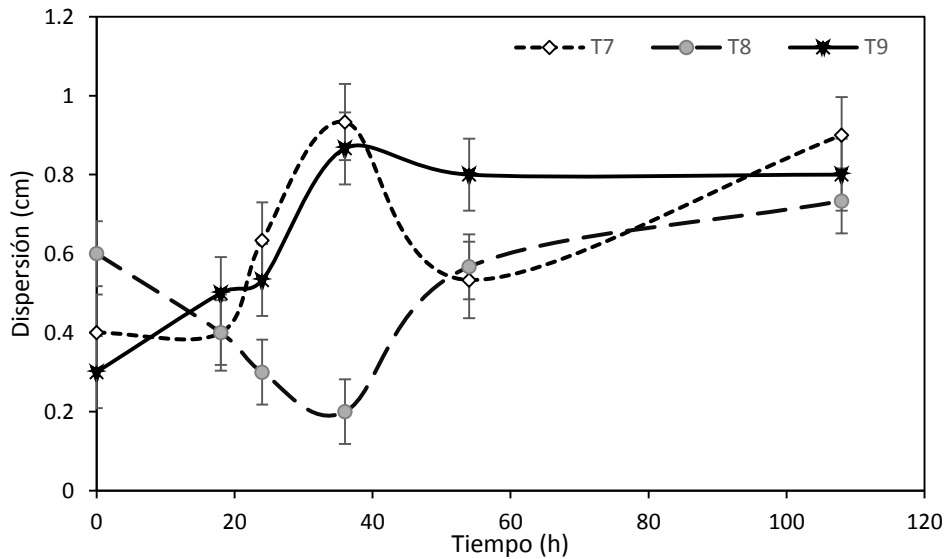


Figura 3.12 Dispersión de aceite de los tratamientos 7, 8 y 9 (sistemas con glucosa) a diferentes periodos de incubación.

En general se observaron diferencias en los resultados de tensión superficial, entre los diferentes tratamientos formulados conforme al diseño experimental (Tabla 2.1), mostrando que los cultivos en los que se empleó mascabado como fuente de carbono (tratamientos 1, 2 y 3) fueron los que presentaron mayores reducciones de TS. También se observó que los tratamientos con nivel medio de cobre (sistema 2, 6 y 7) presentaron las mayores reducciones de tensión superficial (Tabla 3.2).

En cuanto a los sistemas menos efectivos se encontró que T8 y T4 tuvieron una reducción de TS inferior a los 15 mN/m, coincidiendo ambos con una concentración alta de cobre.

Tabla 3.2 Resultado de los tratamientos del diseño experimental Taguchi L9 (3⁴).

| Tratamiento | Tensión superficial (mN/m) Inicial | Tensión superficial (mN/m) Final | Reducción de T.S (mN/m) |
|--------------------|---|---|--------------------------------|
| 1 | 74.153 | 32.53 | 41.623 |
| 2 | 73.1 | 29.9 | 43.2 |
| 3 | 72.203 | 30.844 | 41.359 |
| 4 | 73.37 | 60.788 | 12.582 |
| 5 | 73.1 | 36.875 | 36.225 |
| 6 | 73.74 | 30.62 | 43.12 |
| 7 | 72.42 | 32.92 | 39.5 |
| 8 | 70.2 | 56.11 | 14.09 |
| 9 | 71.42 | 30.75 | 40.67 |

Con el desarrollo del diseño ortogonal Taguchi L9 (3⁴) se logró realizar el mayor número de combinaciones de los 4 factores y los 3 niveles a un bajo costo. Obteniendo que los tratamientos experimentales con mayor reducción de TS y por lo tanto mayor producción de biosurfactante fueron los tratamientos 1, 2 y 9.

Al llevar a cabo una segunda cinética con los tratamientos con mayor reducción de TS se observó que el mejor tratamiento fue el número 2 logrando reducir la TS 44.87

unidades a las 48 h en comparación del tratamiento 9 que descendió 43.89 unidades hasta a las 49 h (Figura 3.13).

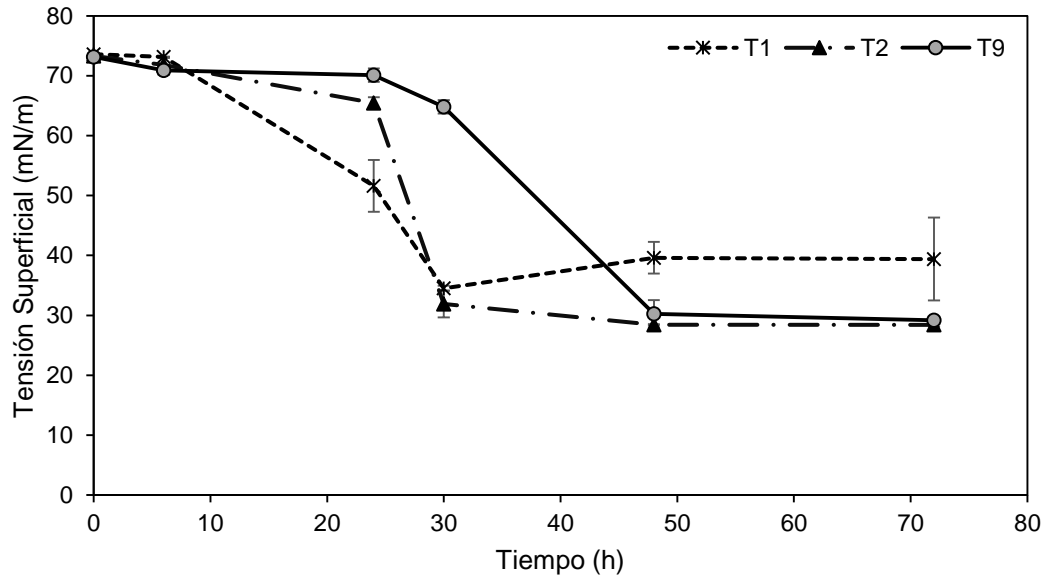


Figura 3.13 Comparativo de reducción de tensión superficial entre los mejores tratamientos experimentales.

En cuanto a la dispersión de aceite de los mejores tratamientos (Figura 3.14) el T2 obtuvo el mayor diámetro del halo de dispersión con 1.16 cm, siguiéndole el T1 con 1 cm y por último el T9 con halos de 0.8 cm el cual comenzó su disminución a partir de las 40 h y hasta las 108 h que duró la cinética.

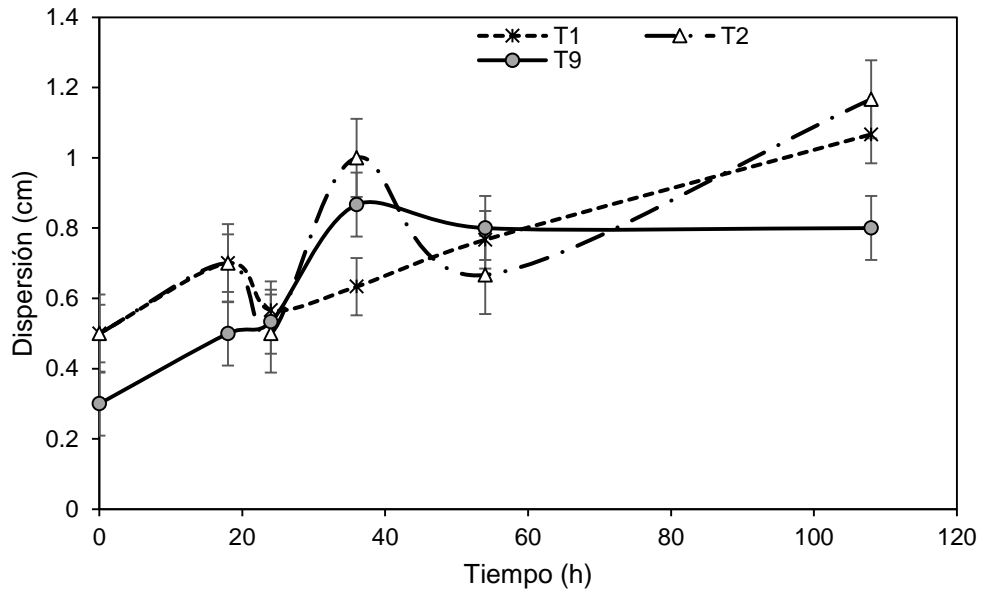


Figura 3.14 Dispersión de aceite de los tratamientos 1, 2 y 9 a diferentes periodos de incubación.

En cuanto al crecimiento celular se observó que existe una relación entre el aumento de producción de biosurfactante con el aumento de biomasa a lo largo del tiempo en los 3 casos, teniendo la máxima de producción de BS a las 48 h de incubación (Figura 3.15).

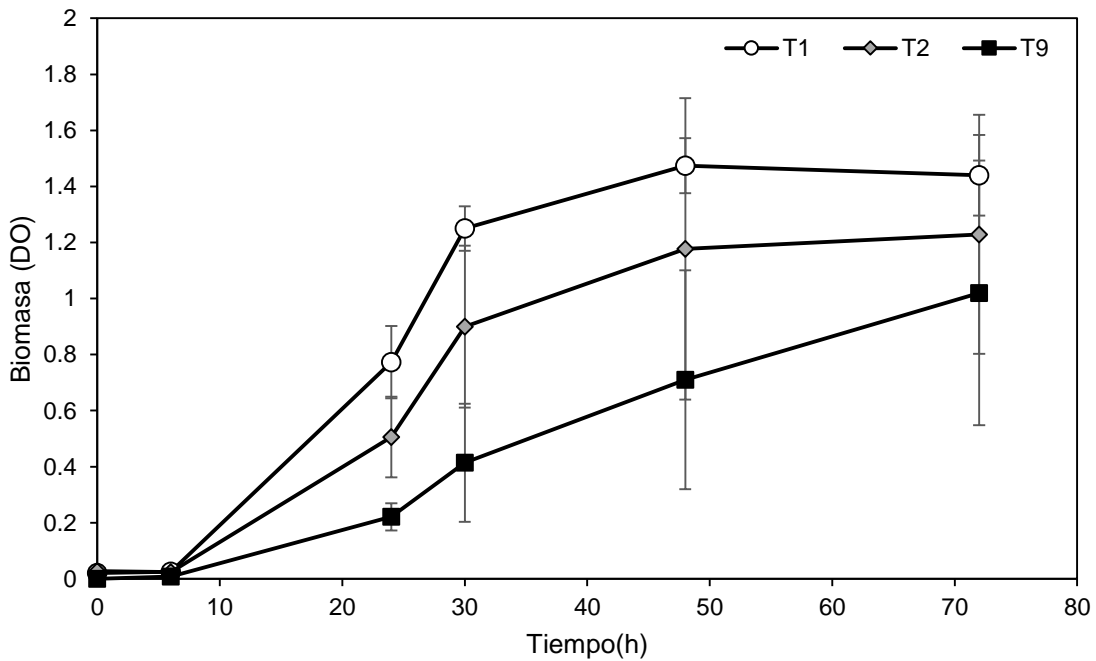


Figura 3.15 Densidad óptica obtenida con los mejores tratamientos experimentales.

El análisis estadístico del diseño realizado con el software Statistica V.8 (Figura 3.16) muestra que el factor con mayor influencia sobre la reducción de TS fue la concentración del cobre, siguiéndole la fuente de carbono y nitrógeno con valores de reducción de TS muy similares y por último la concentración de magnesio.

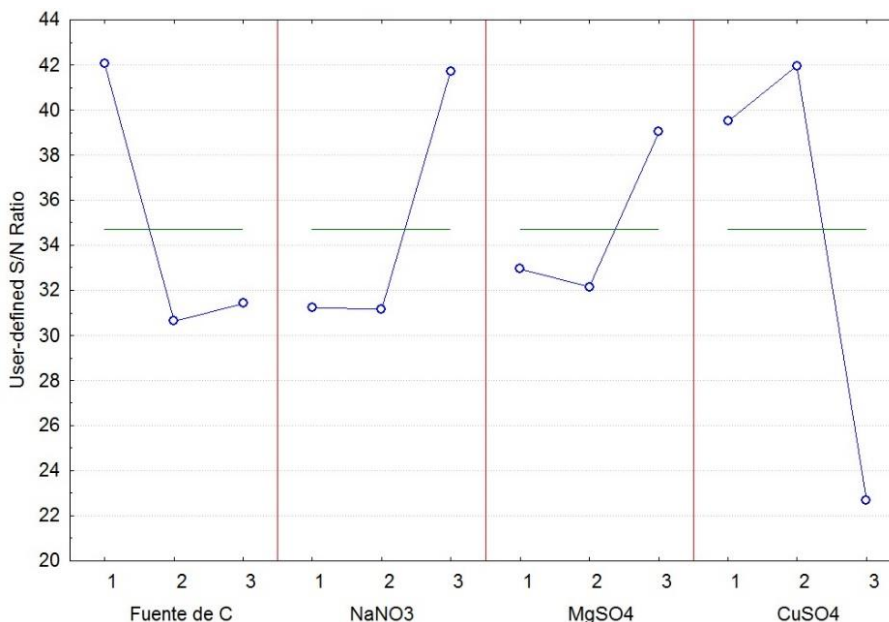


Figura 3.16 Análisis estadístico del efecto por nivel de cada una de las variables independiente en la reducción de tensión superficial.

3.3.2.1 Superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta, es un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influida por varios factores de carácter cuantitativo.

El objetivo final de esta metodología es establecer los valores de los factores que optimizan la variable respuesta (Khuri y Cornell, 1987).

En las figuras 3.17 a 3.22 se muestran las superficies de respuesta de 2 factores combinados a sus diferentes niveles así como la capacidad reductora de TS, mostrando los niveles óptimos para cada elemento.

En la figura 3.17 se representa la superficie de respuesta del efecto de la concentración del NaNO₃ y el MgSO₄ sobre la variable de respuesta (reducción de la tensión superficial). Se puede observar que conforme se incrementa la concentración de nitrógeno, es mayor la reducción de la tensión superficial, y de la misma forma para el Mg al incrementar su concentración se favorece la reducción de la TS.

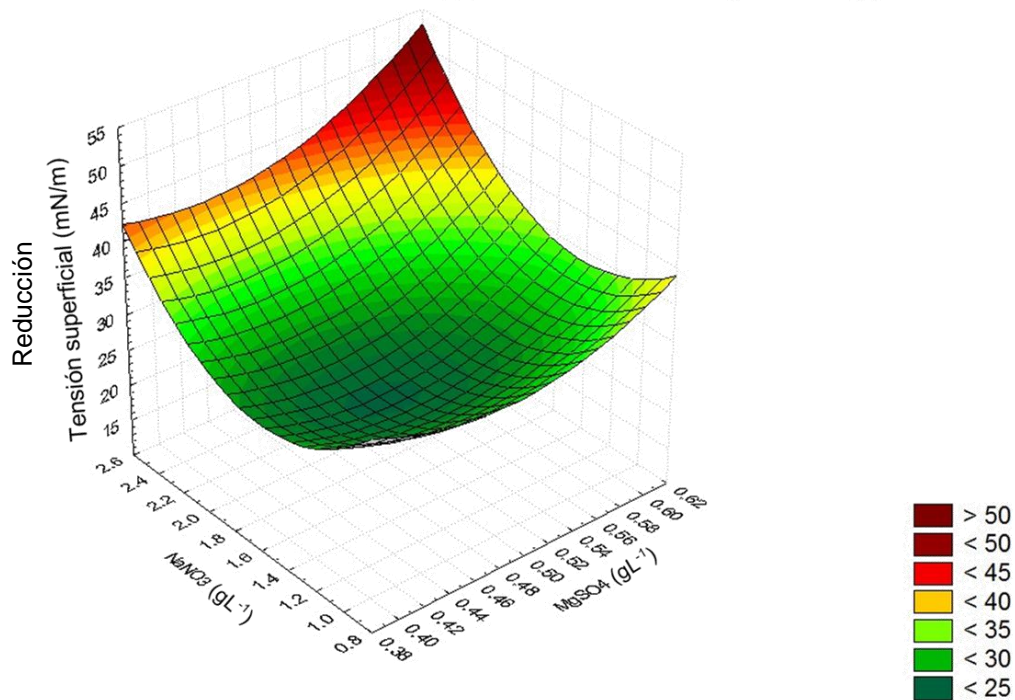


Figura 3.17 Análisis de superficie de respuesta de la reducción de tensión superficial en función de la concentración del NaNO₃ y MgSO₄ sobre el efecto de reducción de tensión superficial.

En cuanto a la interacción del MgSO₄ y la FC (Figura 3.18) se observó la reducción de tensión superficial en los tratamientos, en los que interaccionó la cepa IMP-G con una concentración alta de MgSO₄ (0.6 gL⁻¹). En la figura 3.19 se representa la interacción del NaNO₃ con los diferentes tipos de fuente de carbono (FC) y su efecto en la reducción de la tensión superficial, donde se observa que se obtuvo que el efecto del NaNO₃ afecta de mayor forma logrando una mayor reducción de tensión superficial al aumentar la concentración de NaNO₃ (3 gL⁻¹) y utilizar mascarado como fuente de carbono.

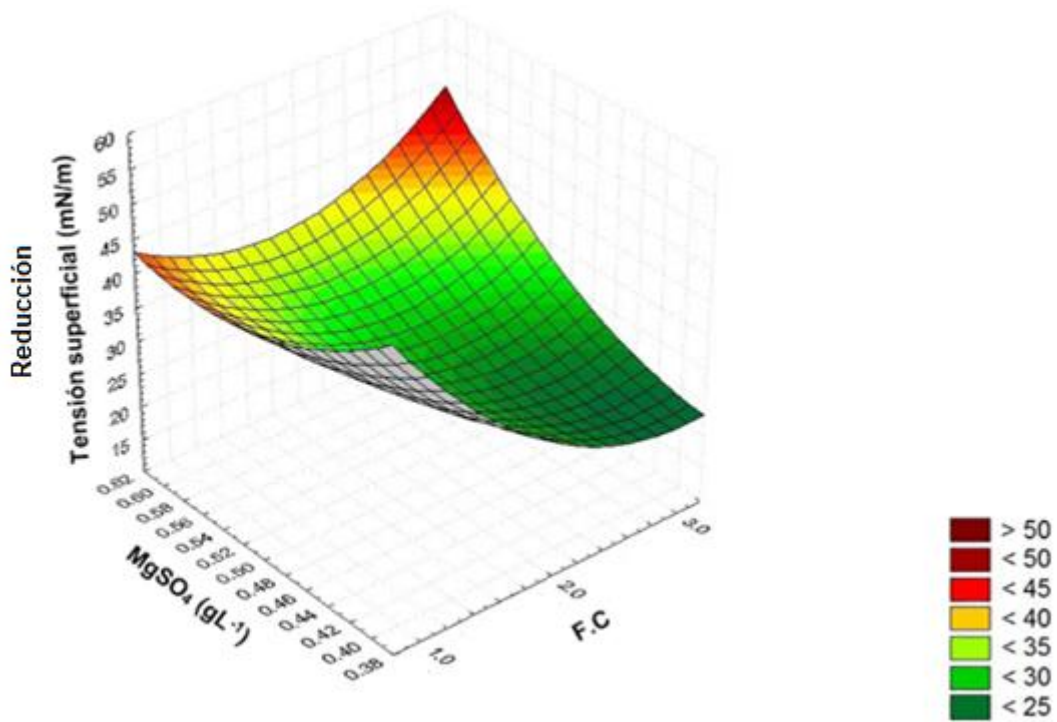


Figura 3.18 Análisis de superficie de respuesta de la reducción de tensión superficial en función de la concentración del MgSO₄ y la fuente de carbono.

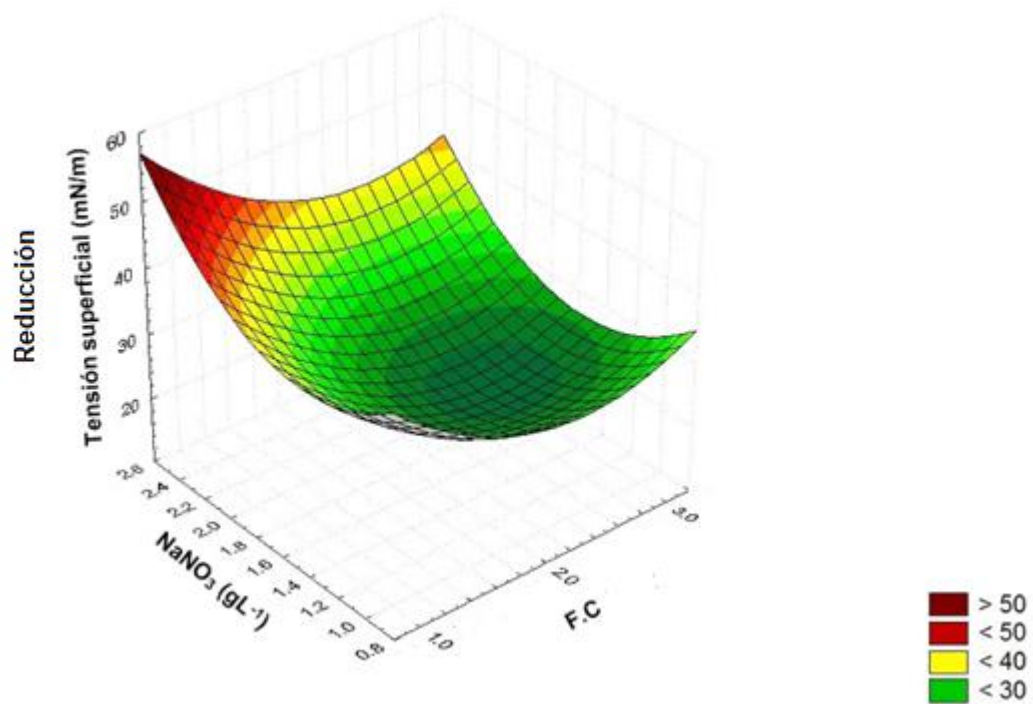


Figura 3.19 Análisis de superficie de respuesta de la reducción de tensión superficial en función de la concentración del NaNO₃ y la fuente de carbono.

En el caso de la interacción del CuSO_4 y MgSO_4 (Figura 3.20) se observó que un cambio en la concentración sulfato de cobre afecta la reducción de tensión superficial; teniendo su máximo de producción con 0.0045gL^{-1} y resultando desfavorable para la producción de BS si se administra en una dosis alta ($>0.008\text{gL}^{-1}$), mientras a mayor concentración de MgSO_4 (0.6gL^{-1}) se ve favorecida la reducción de TS.

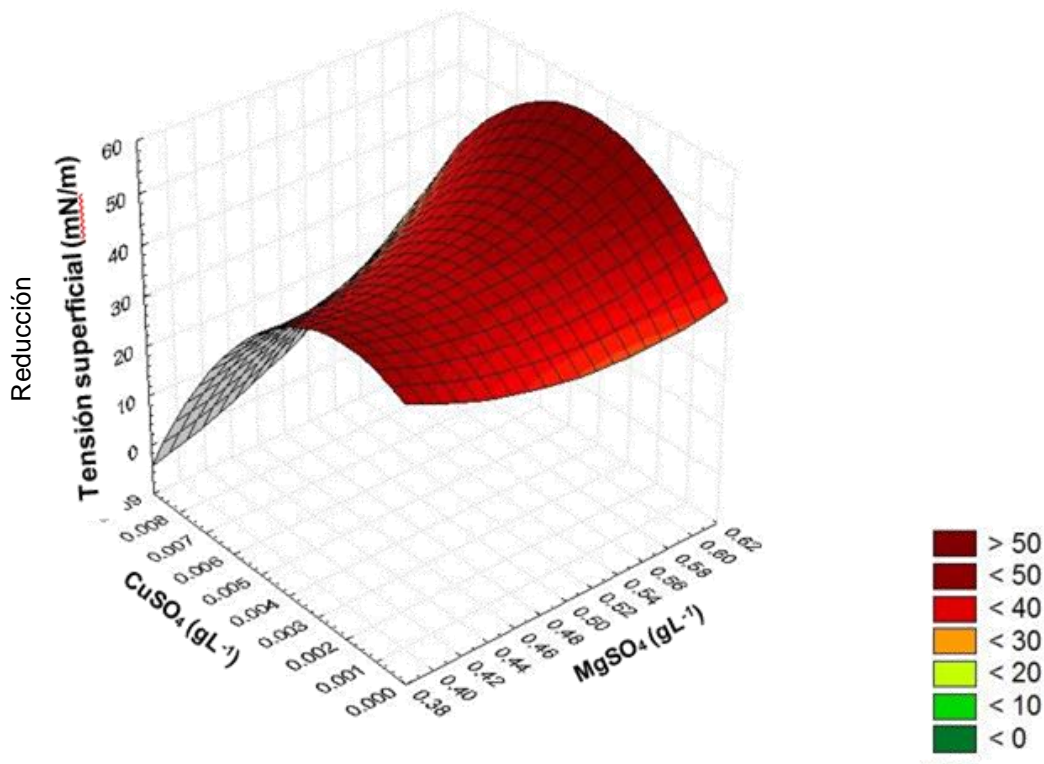


Figura 3.20 Análisis de superficie de respuesta de la reducción de tensión superficial en función de la concentración de CuSO_4 y el MgSO_4 .

La Figura 3.21 nos muestra que el valor óptimo del CuSO_4 se encuentra en el nivel 2, correspondiente a la concentración de 0.001gL^{-1} , mientras que la FC obtuvo una mayor reducción al adicionar mascabado como fuente de carbono (nivel 1) sin embargo, el efecto de la FC es menor en comparación a la concentración de Cu.

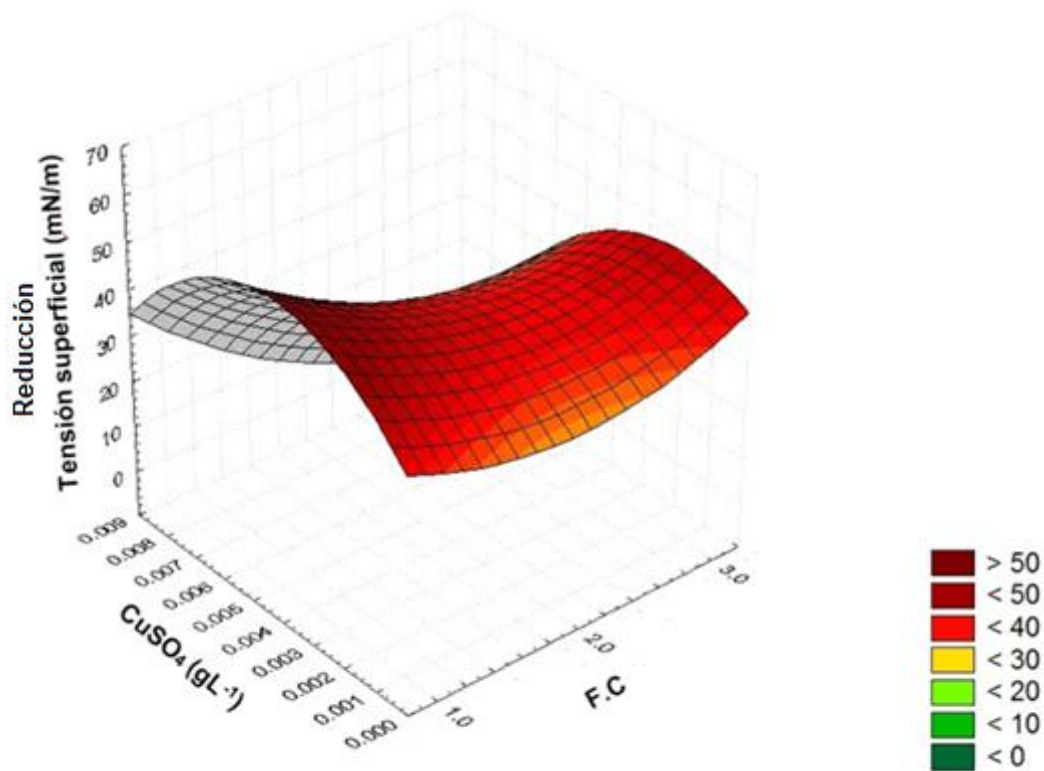


Figura 3.21 Análisis de superficie de respuesta de la reducción de tensión superficial en función de la concentración de CuSO_4 y la fuente de carbono (FC).

Para el caso de la interacción del cobre (CuSO_4) y nitrógeno (NaNO_3) en la superficie de respuesta, se observó que el cobre tiene una fuerte influencia en la producción de biosurfactante tanto positiva como negativa, llegando a ser perjudicial en altas concentraciones (Figura 3.22). Respecto al nitrógeno, se encontró que a mayor concentración de NaNO_3 se obtiene mayor reducción de TS. La mayor reducción en la tensión superficial se encontró en la combinación con la concentración de nitrógeno de 2.8 gL^{-1} y de Cu 0.005 gL^{-1} .

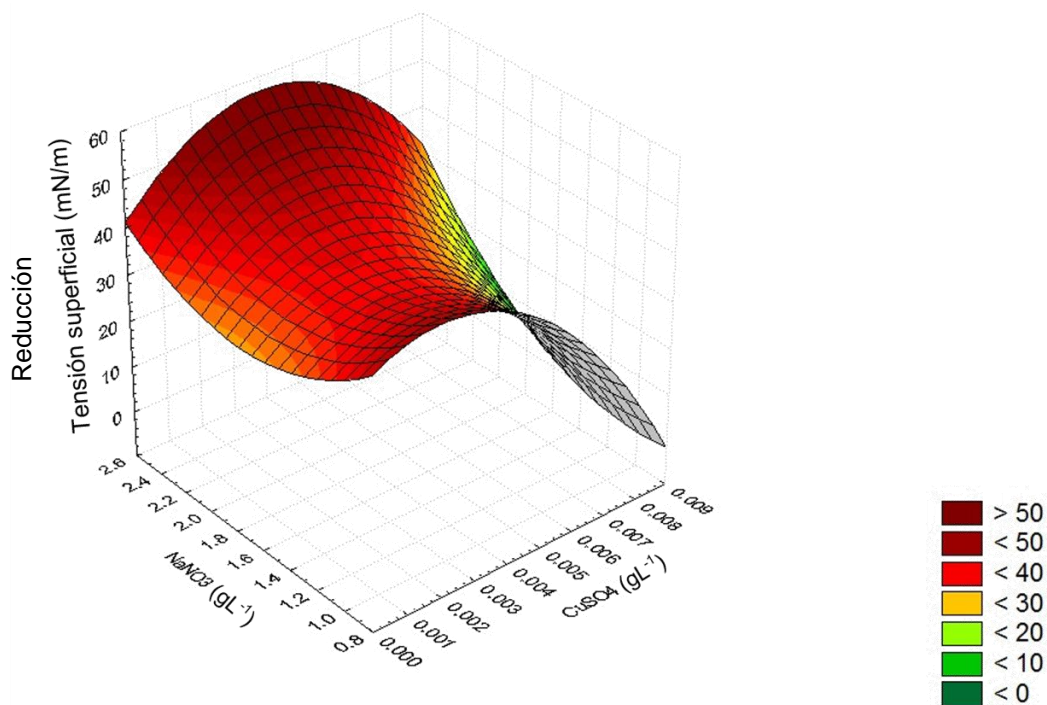


Figura 3.22 Análisis de superficie de respuesta de la reducción de tensión superficial en función de la concentración de NaNO_3 y CuSO_4 .

El análisis de los resultados del diseño experimental realizado con el software Statistic V.8 también una combinación óptima teórica, la cual se presenta en la tabla 3.3 así como el mejor tratamiento experimental.

Tabla 3.3 Factores y niveles del tratamiento experimental y tratamiento óptimo.

| Factor | Combinación estadística | Combinación experimental |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | (Tratamiento teórico óptimo) | (Tratamiento 2) |
| Fuente de carbono | 1 (Mascabado) | 1 (Mascabado) |
| NaNO_3 | 3 (2.5 gL^{-1}) | 2 (2 gL^{-1}) |
| MgSO_4 | 3 (0.6 gL^{-1}) | 2 (0.5 gL^{-1}) |
| CuSO_4 | 2 (0.001 gL^{-1}) | 2 (0.001 gL^{-1}) |

Para confirmar los valores señalados por el análisis estadístico se llevó a cabo una cinética empleando las concentraciones recomendadas en el modelo como óptimas (tratamiento teórico) y el tratamiento experimental (tratamiento 2) con mayor reducción, los cuales se presentan en la figura 3.23. En ambos tratamientos se obtuvieron comportamientos similares en cuanto a la reducción de tensión superficial con reducciones de 42.81mN/m (Tratamiento teórico) y 43.45mN/m (tratamiento experimental), difiriendo tan solo por 0.69 unidades a partir de las 36 horas y mostrándose estables hasta las 190 h.

Con base a los resultados se seleccionó el tratamiento 2, al requerir menor concentración de estos elementos, es una mejor opción de medio mineral para el cultivo de la cepa IMP-G al ser más económica.

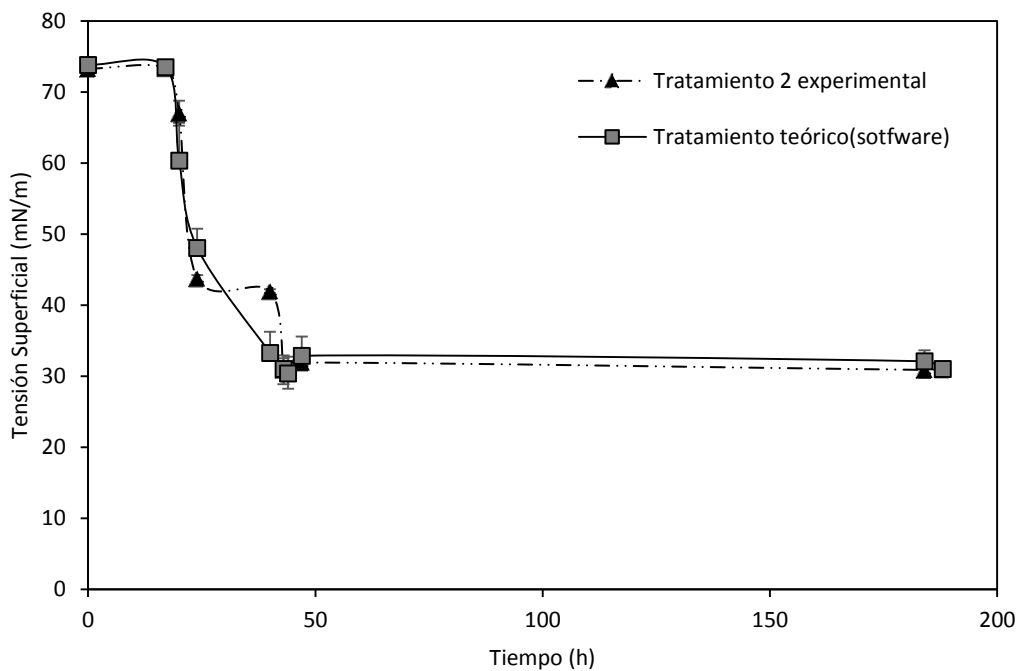


Figura 3.23 Comparativo de reducción en la tensión superficial entre el tratamiento teórico brindado por el software y el tratamiento 2 experimental.

Fuente de carbono

La FC utilizada en el cultivo de bacterias posee un efecto muy marcado en la producción de biosurfactante (Wei *et al.*, 2005). Las FC generalmente utilizadas en la producción de biosurfactante pueden dividirse en tres categorías: carbohidratos, hidrocarburos y aceites vegetales (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008). Para el caso de *B. subtilis* se tiene como referencia que produce biosurfactante en presencia de carbohidratos para formar biosurfactantes de tipo lipopéptidos (Lin *et al.*, 1994). Entre las fuentes de carbono con mayor potencial reductor de TS se encontró al mascabado y la glucosa, coincidiendo con Abdel-Mawgoud *et al.*, (2008) quienes en un estudio comparativo con *B. subtilis* entre 16 fuentes de carbono reportaron a la melaza seguida por la glucosa como las FC con mayor productividad de surfactina 1.1 g/L y 0.8 g/L, respectivamente. En el presente estudio la diferencia entre la glucosa y el mascabado no fue significativa por lo cual se seleccionó al mascabado como fuente de carbono ya que es una alternativa barata y prometedora en la producción a bajo costo.

Fuente de nitrógeno

La producción de biosurfactante se ve afectada dependiendo de la concentración de la fuente de nitrógeno utilizada en la fermentación. Para el caso de la cepa IMP-G se obtuvo que a mayor concentración de NaNO_3 se logró mayor producción de BS. Lo anterior coincide con lo reportado por Makkar y Cameotra (2002) los cuales observaron que para *B. subtilis* la concentración óptima de NaNO_3 es de 5 gL^{-1} logrando reducir la tensión superficial hasta 30 mN/m que es similar al resultado que se obtuvo en el estudio al lograr un descenso de TS a 28.4 mN/m con 2.5 gL^{-1} . También Haddad *et al.* (2009) reportaron un medio mineral para *B. subtilis* HOB2 enriquecido con 0.1 gL^{-1} de NaNO_3 en el que obtuvieron una TS final de 38.8 mN/m .

Oligoelementos

Pese a que la producción de biosurfactante se ve menos afectada por la presencia de MgSO_4 , la adición de este elemento incrementa la producción de BS. Gudiña *et al.* (2015) emplearon un medio de cultivo para *B. subtilis* MTCCC 2443, al cual se le adicionó MgSO_4 a una concentración de 2.4 mM incrementando la producción de biosurfactante de 0.34 gL^{-1} a 0.81 gL^{-1} . En cuanto al cobre se encontró que tiene una gran influencia sobre la producción de los tensoactivos aumentando su producción a una concentración de 1 mgL^{-1} , pero presenta un efecto perjudicial teniendo un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano a los 8 mgL^{-1} . Los tratamientos con dicha concentración presentaron menor crecimiento y producción del biosurfactante Codina *et al.* (2000) y Madoni y Romeo, (2006) reportaron que la ecotoxicidad del cobre es mayor que la de muchos otros metales pesados.

Baek y An (2011) realizaron un estudio del efecto toxico de nanopartículas de óxido de cobre (Cu), zinc (Zn), níquel (Ni) y antimonio (Sb) sobre *B. subtilis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y observaron que las nanopartículas del ion cobre fueron las más tóxicas para las 4 especies mostrando inhibición del crecimiento bacteriano a 2.7 mgL⁻¹. Otro estudio realizado por Codina *et al.* (2000) con *Saccharomyces cerevisiae* y *Pseudomonas fluorescens* evaluarón el efecto de la toxicidad que tiene el Cu a una concentración de 0.1 mgL⁻¹ en el que los estudios mostraron un efecto inhibitor sobre los microorganismos. Wei y Chu (2002) concluyeron en un estudio con sales de metal que el Cu² a una concentración de 0.02 mM posee un efecto inhibitor de la producción de surfactina por *B. subtilis* produciendo tan solo 0.05 gL⁻¹.

Biomasa

En el presente estudio se logró observar que la mayor producción de biosurfactante tuvo una relación con el crecimiento celular obteniendo la mayor reducción de TS a las 48 h, lo cual coincide con el crecimiento máximo de los cultivos. El comportamiento de la biomasa en el caso de los tratamientos experimentales coincide con lo reportado por Haddad *et al.* (2009). Estos investigadores que encontraron que la reducción de TS inicial se produce cerca del comienzo de la fase estacionaria. Así mismo Kim *et al.* (1997) en un estudio de la producción de lipopéptidos a partir de *B. subtilis* reportaron una relación entre la producción de biosurfactante y el crecimiento celular utilizando un medio sintético. Davis *et al.* (1999) y Suzuki *et al.* (1974) encontraron que el inicio de la producción del BS se produjo a mediados de la fase exponencial tardía.

3.4 Evaluación de los factores ambientales en la producción de la biomolécula

Una condición deseable del biosurfactante para aplicarlo en yacimientos de petróleo es que este se sintetice *in situ*, es decir en el pozo, a condiciones de alta salinidad, temperatura y en ausencia de oxígeno. Por lo anterior se realizaron ensayos para determinar el efecto de la temperatura, la salinidad y la presencia de oxígeno en el crecimiento de la cepa IMP-G y la producción de biosurfactante.

3.4.1 Evaluación de la temperatura sobre el crecimiento y producción del biosurfactante.

Respecto a la resistencia del microorganismo a altas temperaturas se observó que su máximo crecimiento se da a los 30 °C, en el cual el caldo presentó gran cantidad de biomasa, un color blanquecino y turbidez. En el caso de los sistemas incubados

a 40 °C el crecimiento se vio desfavorecido presentando también una coloración blanquecina pero con menor biomasa y turbidez; por otra parte a los 60 °C se inhibió el crecimiento bacteriano, por lo que el caldo conservó su color ambar-transparente, al igual que los controles (Figura 3.24).



Figura 3.24 Efecto macroscópico de la temperatura de incubación en la producción de biomasa de la cepa IMP-G en matraz Erlenmeyer A) Matraz inoculado y control incubados a 60°C, B) Matraz inoculado y control incubados a 40°C, C) Matrazes inoculados e incubados a 30 y 60°C.

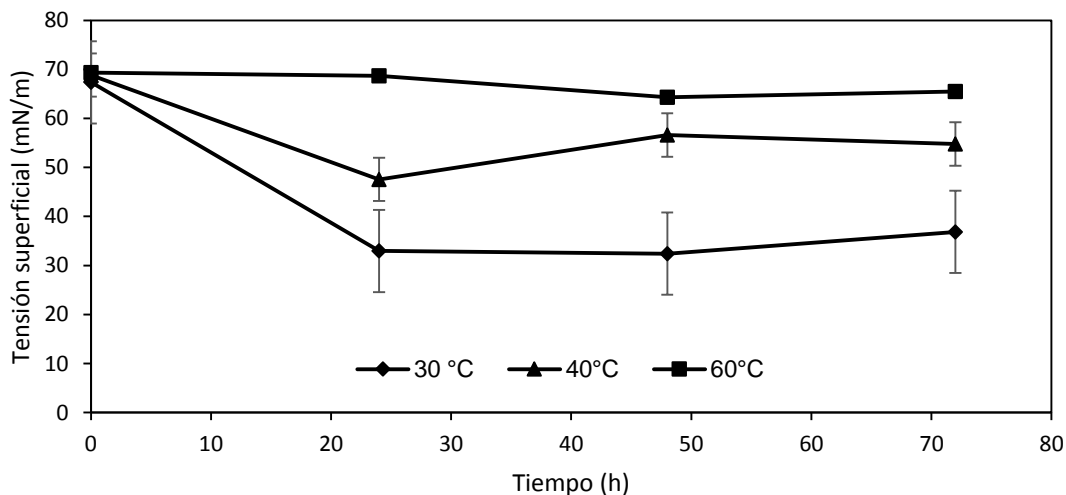


Figura 3.25 Efecto de la temperatura de incubación sobre la reducción de TS de la cepa IMP-G.

El experimento efectuado muestra que la mayor producción de BS se presentó a los 30 °C de incubación descendiendo la TS 34.93 unidades, llegando a un valor de

32.4 mN/m a las 48 h. Al incubar a 40 y 60 °C el crecimiento celular y por ende la producción de biosurfactante se vieron afectadas por el incremento de temperatura, descendiendo la TS solamente 14 y 5 unidades, respectivamente (Figura 3.25).

Estos resultados son similares a los obtenidos por Abdel-Mawgoud *et al.* (2008) que utilizando *B. subtilis* evaluaron el crecimiento de la cepa y la producción de biosurfactante (surfactina) en el intervalo de 25 a 45 °C, encontrando mayor producción y crecimiento a los 25 y 30 °C.

Así mismo Priya y Usharani (2009) en un estudio comparativo de producción de BS entre *Bacillus subtilis* (BS3) y *Pseudomona aeuroginosa* (PS3), analizaron el crecimiento de ambas cepas en un rango de 35 a 40 °C, los autores encontraron que la temperatura en la que se obtiene mayor crecimiento y producción de BS es a 37 °C y a temperaturas superiores el crecimiento celular se reduce.

3.4.2 Evaluación de la salinidad sobre el crecimiento y producción del biosurfactante

La aplicación de los biosurfactantes depende de su actividad a diferentes condiciones como lo son temperatura, pH y salinidad. Por esa razón es importante evaluar la estabilidad del biosurfactante producido por la cepa IMP-G y con ello establecer si es viable su posterior uso en MEOR.

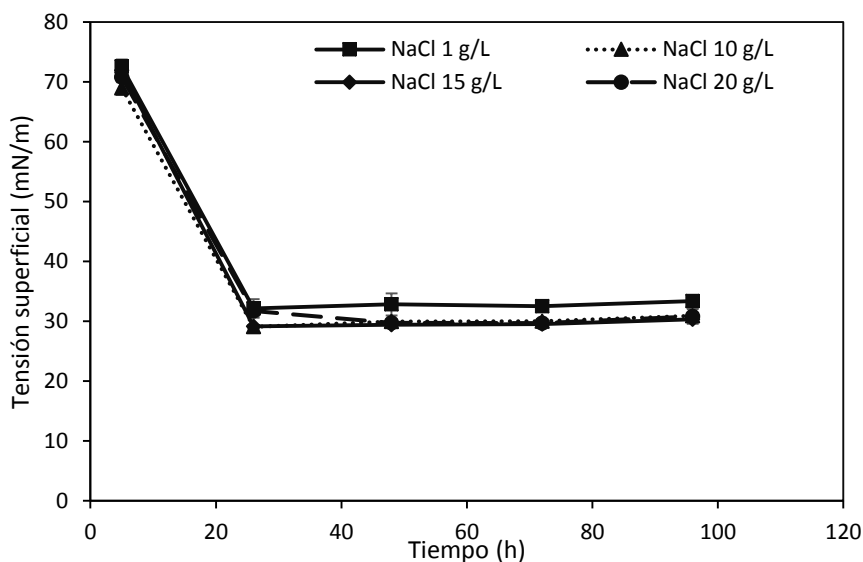


Figura 3.26 Efecto de la concentración de NaCl sobre la reducción de TS de la cepa IMP-G.

La actividad que mantuvo el biosurfactante producido por la cepa IMP-G fue estable y similar para todas las concentraciones de NaCl evaluadas, descendiendo la TS alrededor de los 30 mN/m en todos los tratamientos, demostrando que la cepa produce BS a concentraciones de 20 gL⁻¹ de NaCl (Figura 3.26).

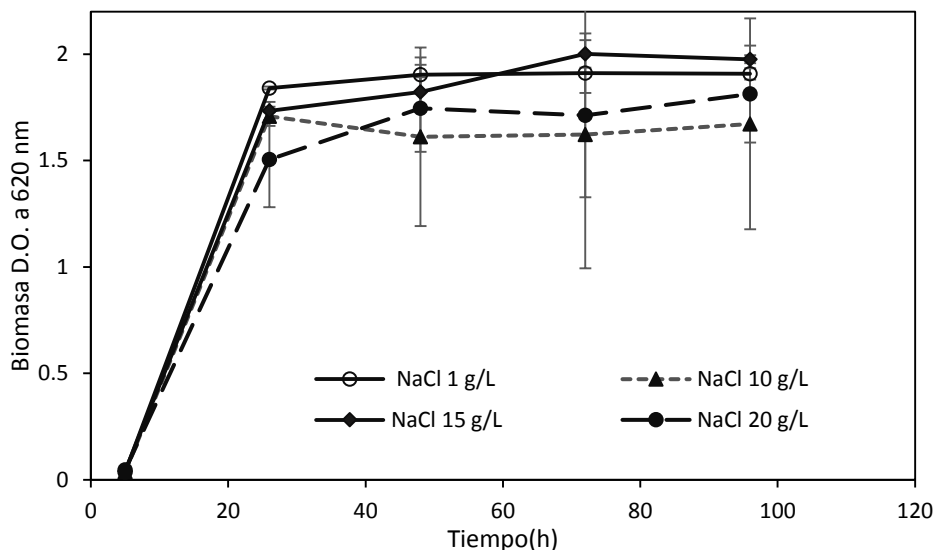


Figura 3.27 Crecimiento de la cepa IMP-G sometida a diferentes concentraciones de NaCl.

En cuanto al crecimiento de la cepa IMP-G para las diferentes concentraciones de NaCl, el comportamiento en el intervalo evaluado fue similar (Figura 3.27), iniciando el crecimiento a partir de las 26 h y manteniéndose constante hasta las 96 h.

El mayor crecimiento fue observado con el tratamiento adicionado con 15 gL⁻¹ de NaCl a las 72 h, seguido por el tratamiento de 1gL⁻¹ a las 72 h con un crecimiento muy similar y después los tratamientos de 20 y 10 gL⁻¹ con crecimiento ligeramente menor pero hasta las 96 h.

Ghojavand *et al.* (2008) utilizando *Bacillus subtilis* obtuvieron una TS de 31 mN/m en un medio de 0% NaCl y al enriquecerlo con 20% de NaCl la TS se incrementó a 34 mN/m. Así mismo la cepa HBO2 de *Bacillus subtilis* fue probada por Haddad *et al.* (2009) mostrando producción estable del BS ante concentraciones salinas de hasta 25% y obteniendo tensiones superficiales de 27.3 a 38.8 mN/m.

Durante la evaluación del crecimiento y producción del biosurfactante producido por la cepa IMP-G. Se obtuvo que la TS y el crecimiento bacteriano se mantuvieron estables hasta salinidades de 20,000 ppm, con valores de TS entre 29-32 mN/m.

3.4.3 Evaluación del efecto de la concentración del oxígeno sobre la cepa productora de biosurfactante

3.4.3.1 Producción de CO₂ con la cepa IMP-G en condiciones limitadas de aire.

Una de las formas de evaluar los microorganismos es respirometricamente en este caso se evaluó la producción de CO₂. Se analizaron 3 sistemas con diferentes relaciones de aire/nitrógeno que fueron: aire/N₂ (50/50, 25/75 y 0/100).

En la figura 3.28 se observa la producción de CO₂ en los diferentes sistemas. Para el caso de los sistemas que aerados parcialmente, el comienzo de la producción de CO₂ de los 3 cultivos se dió a las 24 h y llegando a su fase estacionaria a las 48 h. La mayor producción de CO₂ fue de 5.79 mmol CO₂ L⁻¹ h⁻¹ producida por el sistema con 25% a las 24 h.

Mientras que en el sistema anaerobio (100% nitrógeno) la producción de CO₂ inicio a las 48 h y continuó de forma ascendente hasta las 160 h; A partir de este punto se llegó a la fase estacionaria con 16.86 mmol CO₂ L⁻¹ h⁻¹ a las 190 h.

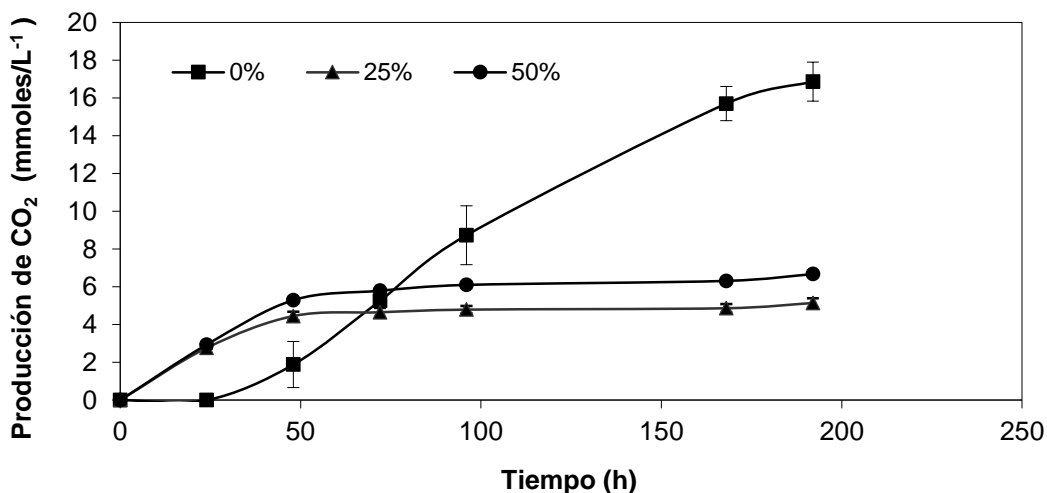


Figura 3.28 Producción de CO₂ de los tratamientos con diferentes relaciones de aire-nitrógeno.

Modelo para evaluar la producción de gas

La descripción matemática de las curvas de producción de gas permite el análisis de los datos, la comparación de los sustratos y la evaluación de diferentes ambientes de fermentación. El modelo: exponencial simple se muestra inapropiado para describir la cinética de fermentación, una vez que subestima la producción de

gas en el inicio del proceso fermentativo, ya que subestima la asíntota y no ofrece un adecuado ajuste a la fase exponencial de la curva. Por otro lado el modelo Gompertz supera todos estos problemas y ofrece un adecuado ajuste en las primeras etapas del proceso fermentativo, así como también en la fase asíntótica de la curva (Noguera *et al.*, 2004).

La producción acumulada de CO₂ fue ajustada con una modificación de la ecuación de Gompertz; la cual, es un modelo que describe el crecimiento microbiano en función del progreso de acumulación de un metabolito Lay *et al.* (1998) y Ren *et al.* (2010).

$$CO_2 = P_{max} \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_{max} e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

En donde:

- CO₂ es la producción acumulada de CO₂
- P es la producción de CO₂
- P_{max} es la producción máxima de CO₂
- R_m es la velocidad máxima de producción de CO₂
- λ es el tiempo aproximado de duración de la fase adaptativa (lag)
- e es 2.7182
- t es el tiempo de incubación

Los ajustes de la producción de CO₂ con el modelo de Gompertz, se realizaron utilizando datos experimentales obtenidos en cada prueba y se resolvieron con la herramienta Solver de Microsoft Excel 2013.

En las figuras 3.29-3.31 se muestra el ajuste de los resultados experimentales obtenidos de las 3 concentraciones de oxígeno aplicando el modelo matemático de Gompertz:

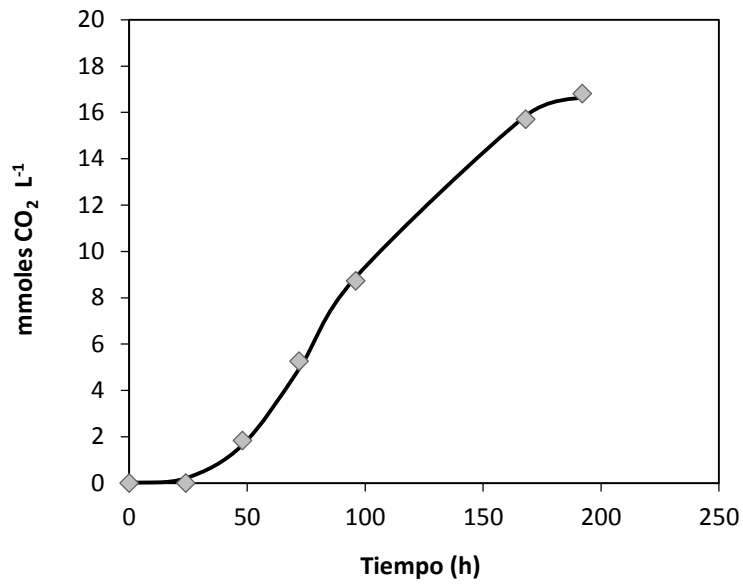


Figura 3.29 Producción de CO₂ en el tratamiento con 100% de nitrógeno. Ajuste realizado con el modelo de Gompertz.

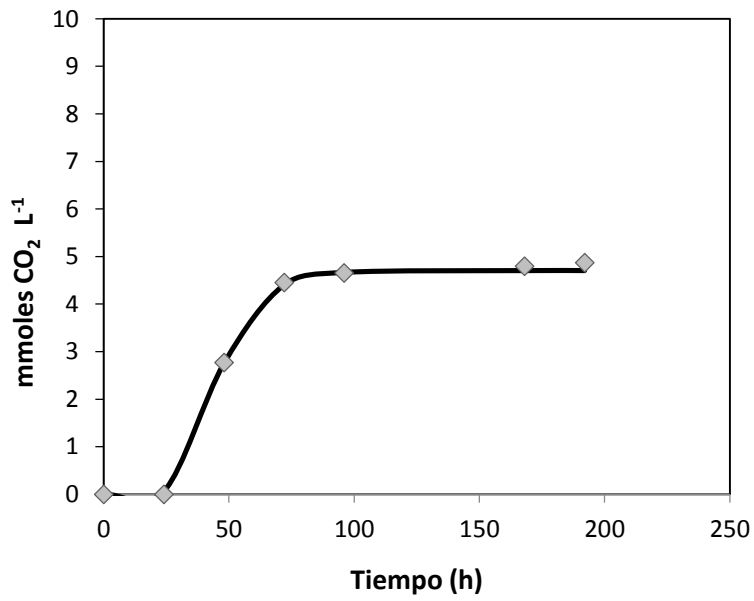


Figura 3.30 Producción de CO₂ en el tratamiento con 25% aire y 75% nitrógeno. Ajuste realizado con el modelo de Gompertz.

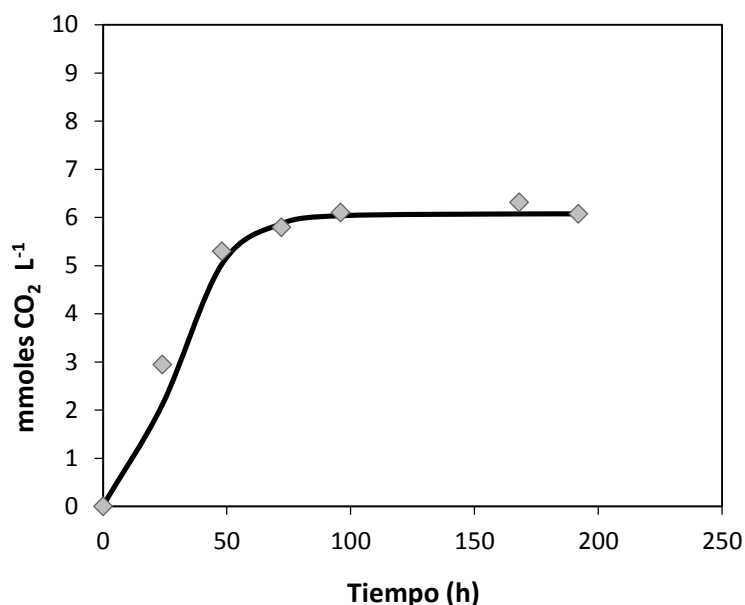


Figura 3.31 Producción de CO₂ en el tratamiento con 50% aire y 50% de nitrógeno. Ajuste realizado con el modelo de Gompertz.

Los parámetros cinéticos de la producción del CO₂ empleando el modelo de Gompertz de la tabla 3.4, muestran que el tratamiento anaerobio fue el que presentó el periodo de adaptación más largo ($\lambda = 42.7$ h) y una velocidad de producción de CO₂ (0.1677 mmol CO₂ L⁻¹ h⁻¹). Sin embargo fue el cultivo con mayor actividad. Y con respecto a los cultivos aireados se observó que los tiempos de adaptación fueron menores y que la velocidad de producción de biogás similar.

Tabla 3.4 Parámetros cinéticos de los tratamientos con diferentes relaciones de oxígeno.

| % Aire los tratamientos | Pmax (mmol CO ₂ L ⁻¹) | Rmax (mmol CO ₂ L ⁻¹ h ⁻¹) | λ (h) | r2 |
|-------------------------|--|--|---------------|--------|
| 0 | 17.6305 | 0.1677 | 42.6962 | 0.9992 |
| 25 | 4.7042 | 0.1508 | 29.3710 | 0.9994 |
| 50 | 6.0739 | 0.1603 | 10.7881 | 0.9841 |

Pmax producción máxima (mmol CO₂ L⁻¹), Rmáx velocidad máxima de producción (mmol CO₂ L⁻¹h⁻¹) y λ periodo de adaptación (h).

3.4.3.2 Producción del biosurfactante bajo condiciones limitadas de oxígeno

En cuanto a la reducción de TS (Figura 3.32), los 3 sistemas con diferentes concentraciones de aire mostraron un descenso de TS de forma paulatina hasta las 48 h, desde este punto el tratamiento sin oxígeno logró una reducción superior de TS descendiendo de 71 a 36 mN/m a partir de las 72 h. Los sistemas con oxígeno lograron reducir la TS inicial de forma poco significativa de 71 a un rango de 54-55 mN/m, sin obtener variaciones considerables.

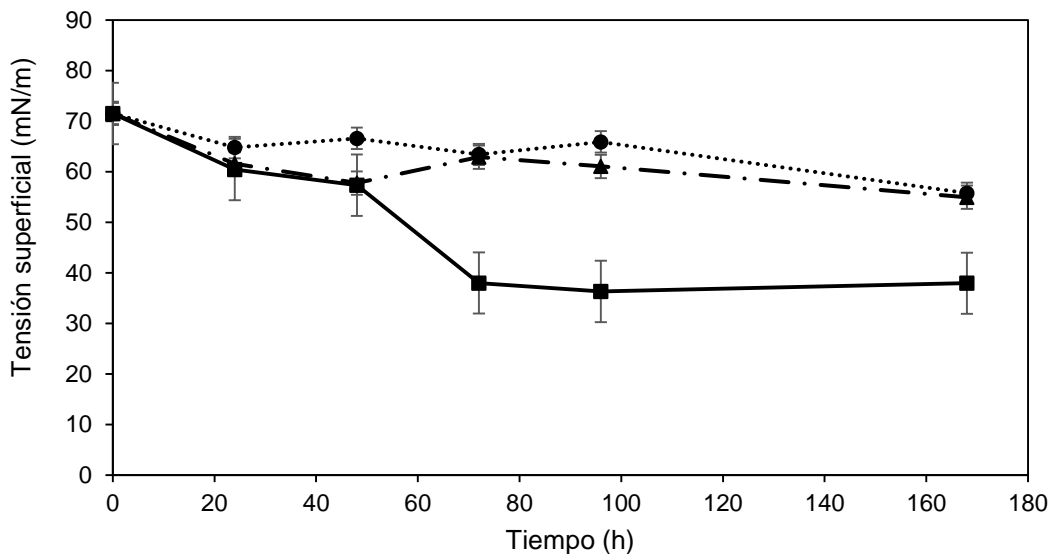


Figura 3.32 Tensión superficial del sobrenadante de los tratamientos con diferentes relaciones de aire/ nitrógeno a diferentes periodos de incubación, relación aire / nitrógeno (0-100%) (■), relación aire / nitrógeno (25-75%) (▲), relación aire / nitrógeno (50-50%) (●).

En el caso de los sistemas anaerobios se ha reportado que *Bacillus subtilis* puede emplear una ruta metabólica alternativa en ausencia de oxígeno (Davis *et al.*, 1999).

Este microorganismos es capaz de utilizar el nitrato como aceptor final de electrones, realizando respiración anaeróbica por medio de la vía nitrato reductasa, codificada por el operón narGHJ (Ramos *et al.*, 1995). De esta forma el nitrato es reducido a nitrito y el cual a su vez es transformado en amonio, por medio de la vía nitrato reductasa (Nakano *et al.*, 1998).

Sin embargo, el periodo de producción de la biomolécula y la reducción de la TS (36 mN/m) es mayor en comparación a los valores obtenidos en sistemas con matraz en la figura 3.23 se muestra que los valores de TS alcanzados a las 24 h a nivel matraz con cultivos 100% aerado fueron de 30 mN/m.

Fernandes *et al.* (2007) al cultivar a *B. subtilis* en ausencia de oxígeno y utilizar altas concentraciones de nitrato en el medio (8.5 g L^{-1}) y glucosa, lograron la producción de biosurfactantes. Consiguiendo una reducción de 54 mN/m a 30 mN/m después de 20 h de cultivo. Además estos autores reportaron que el nitrato se redujo a nitrito alcanzando su máxima concentración a las 16 h.

3.4.3.3 Evaluación de la dispersión de aceite obtenida bajo condiciones limitadas de oxígeno.

En cuanto a la dispersión del aceite de los sistemas probados, el sistema sin aire fue el que presentó los mayores halos de dispersión (0.95 cm), los cuales se obtuvieron a las 96 h. En los sistemas con oxígeno limitado se observó que a las 48 h los sistemas parcialmente aireados obtuvieron los halos de mayor diámetro, siendo el de 50% oxígeno el que presentó halos de mayor dimensiones (0.86 cm), seguido del sistema con 25% oxígeno con halos de 0.36 cm (Figura 3.33).

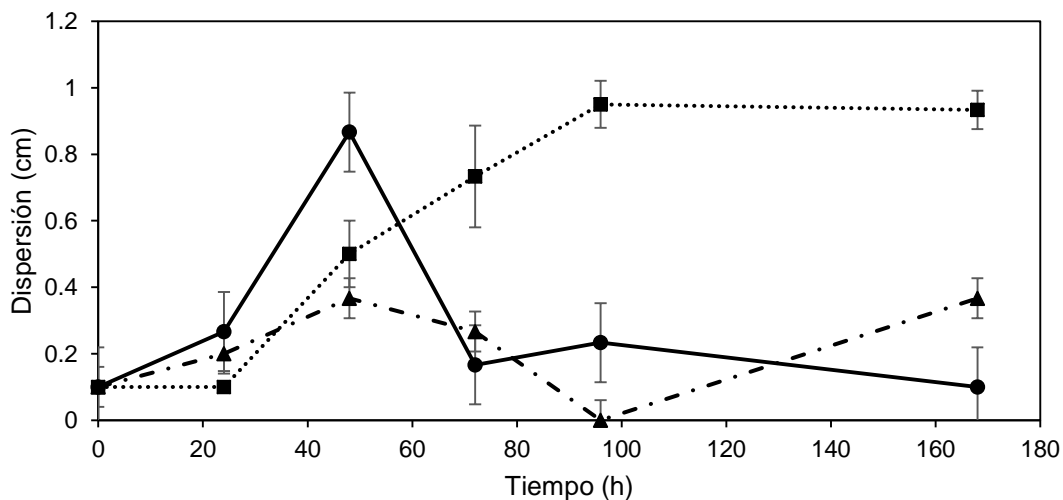


Figura 3.33 Dispersión de aceite de los tratamientos con diferentes relaciones de aire/nitrógeno en los diferentes periodos de incubación, relación aire / nitrógeno (0-100%) (■), relación aire / nitrógeno (25-75%) (▲), relación aire / nitrógeno (50-50%) (●).

Pese a que se obtuvo actividad dentro de los cultivos el crecimiento y producción de metabolitos no fue la misma que la obtenida a nivel matraz con cultivos totalmente aireados, en la que los halos de dispersión fueron de más de un centímetro después de las 48 h.

El proceso de producción de lipopéptidos se ve influenciado por condiciones ambientales como la temperatura y la disponibilidad de oxígeno (Desai y Banat, 1997). Para el caso de *B. subtilis* la síntesis de lipopéptidos como la surfactina dependen estrechamente del suministro de oxígeno (Coutte *et al.*, 2010).

La aireación del medio afecta fuertemente el crecimiento y la regulación de la síntesis de producción de biosurfactante de las células (Clarke *et al.*, 2006). Aireaciones bajas o altas conducen a una disminución de los rendimientos de la síntesis de BS (Sheppard y Cooper, 1990).

3.4 3.4 Evaluación de la producción de biomasa bajo condiciones limitadas de aire.

La producción de biomasa se determinó como densidad óptica a 620 nm. El crecimiento bacteriano entre los diferentes sistemas se dio en relación al oxígeno inicial disponible. Se observa en la figura 3.34 que los cultivos parcialmente aireados tuvieron mayor actividad a las 24 h y un crecimiento de 0.49 DO (50% aire) y 0.4 DO (25% aire), para posteriormente comenzar un decremento paulatino. Para el cultivo anaerobio su crecimiento inicio de forma lenta en las primeras 24 h y pasado este lapso su crecimiento fue exponencial hasta alcanzar su máximo crecimiento (0.61 DO) a las 96 h.

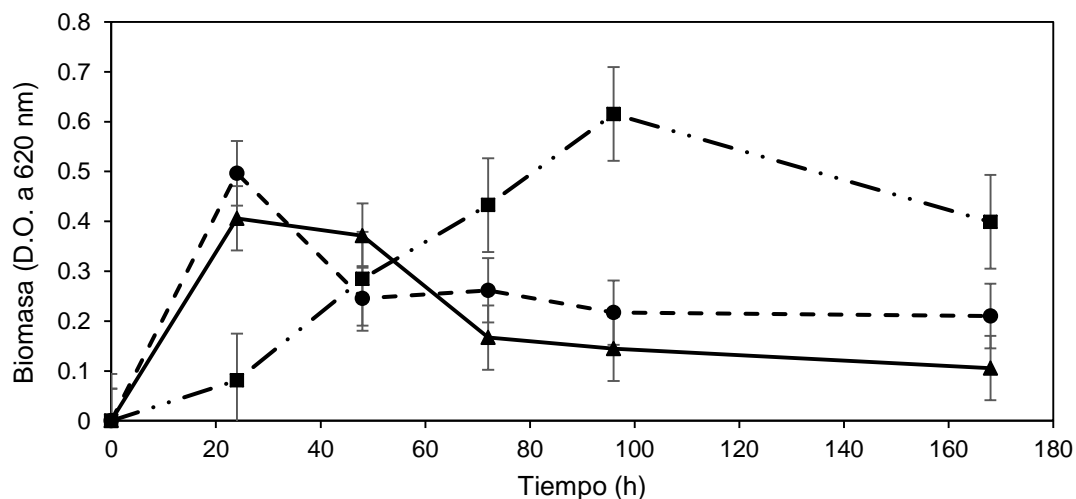


Figura 3.34 Crecimiento de los microorganismos evaluada como densidad óptica en los tratamientos con diferentes relaciones aire / nitrógeno a diferentes periodos de incubación, relación aire / nitrógeno (0-100%) (■), relación aire / nitrógeno (25-75%) (▲), relación aire / nitrógeno (50-50%) (●).

Así mismo el comportamiento del crecimiento de la cepa IMP-G a nivel macroscópico (Figura 3.35) fue similar, pudiendo observar que los sistemas aerobios (2A, 3A y 4A) presentaron mayor turbidez de las 24 h y hasta las 72 h; mientras que en el sistema anaerobio (1A) se conservó el cultivo color ámbar con poca turbidez en las primeras 24 h, pero se logró apreciar mayor turbidez y por ende crecimiento después de las 72 h.

Estas observaciones coinciden con las realizadas por Carvalho *et al.* (2010), el crecimiento, esporulación y producción de biocomponentes de *B. subtilis*. Estos autores encontraron que al cultivar el microorganismo en condiciones anaerobias y adicionar al medio de cultivo glucosa y sulfato de amonio, estos componentes permiten obtener una mayor producción de biomasa después de las 50 h. Así mismo la mayor producción de BS que lograron obtener fue a partir de las 60 h.



Figura 3.35 Efecto macroscópico de los cultivos a diferentes tiempos de incubación A) 24 h, B) 48 h, C) 72 h, D) 96 h.

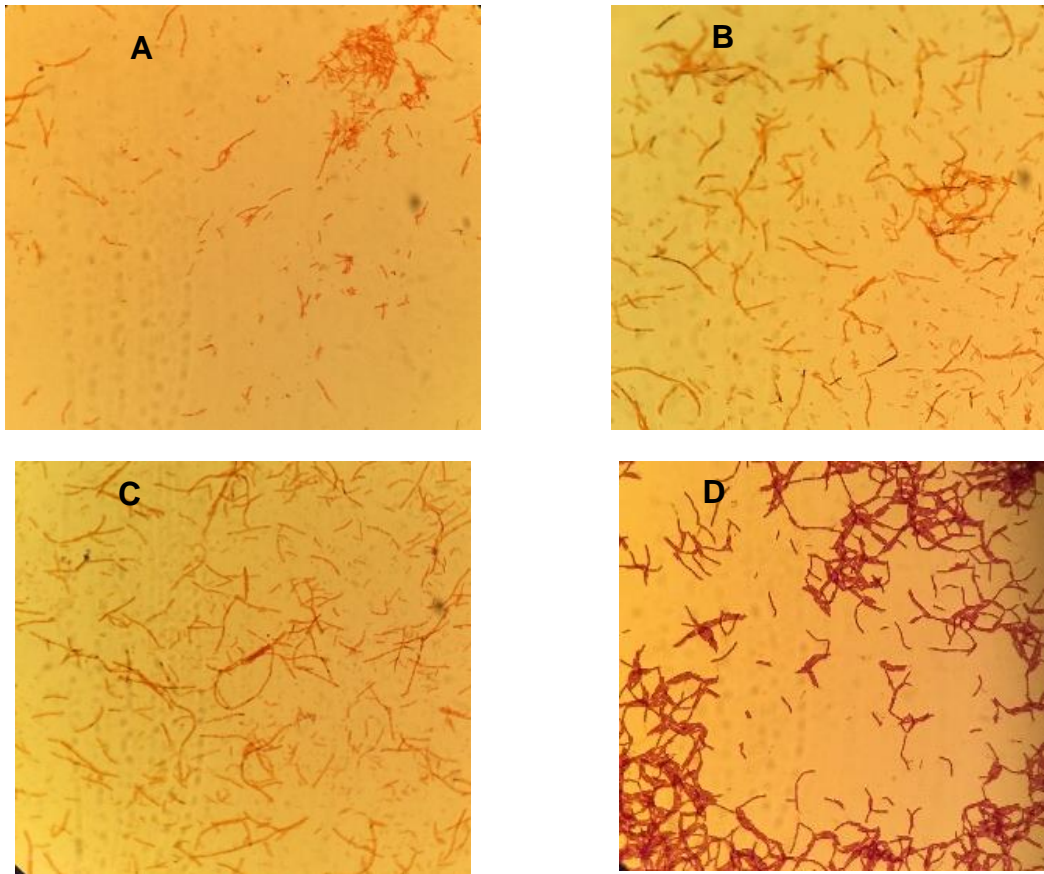


Figura 3.36 Tinción de Gram de la cepa IMP-G a las 72 h de incubación: A) 25% aire, B) 50 % aire, C) 100% aire, D) sin Oxígeno.

Al realizar una tinción de Gram (Figura 3.36) se observó la morfología de la cepa, en la que se logró apreciar que los cultivos parcialmente aireados presentaron lisis, además de menor coloración y densidad poblacional, de acuerdo a la cantidad de oxígeno inicial suministrado, para el caso del cultivo anaerobio la muestra presentó mayor coloración, no tuvo daño celular y mayor densidad poblacional; para el caso de los cultivos totalmente aireados, la muestra presentó alta densidad poblacional, coloración de menor intensidad y sin daño celular.

B. subtilis es considerada como una bacteria aerobia, pero algunos estudios con estos grupos bacterianos han demostrado que son capaces de tener crecimiento incluso en condiciones con un suministro de oxígeno severamente limitado (Nakano *et al.*, 1997).

Otra característica macroscópica que se logró observar fue que los cultivos adquirieron coloraciones distintas, esto dependiendo de su edad, si el cultivo es joven presenta coloración crema (Figura 3.37 A), mientras más viejo estaba el

cultivo, este adquiría una coloración café claro (Figura 3.37 B) hasta llegar a marrón (Figura 3.37 C).

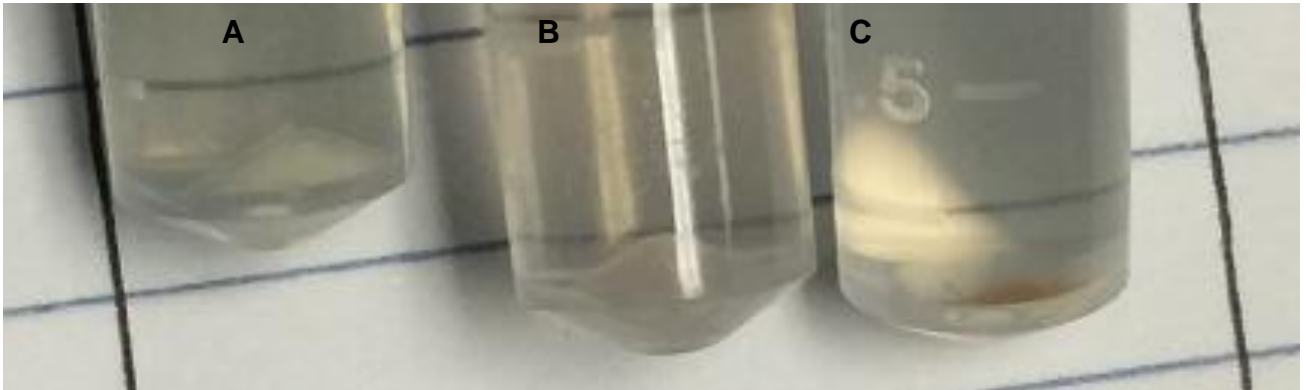


Figura 3.37 Coloración de la biomasa después de 72 h de incubación: A) 0% aire .B) 100% aire, C) 50% aire.

3.5 Efecto combinado de la temperatura y la salinidad sobre la tensión interfacial (TIF) y emulsión de aceite (% E₂₄).

Para utilizar a los biosurfactantes en los procesos MEOR, es importante comprender sus propiedades interfaciales en el equilibrio líquido-líquido. Aunque varios investigadores han estudiado la actividad superficial en las fases aire / agua, solo algunos informes presentan información sobre las propiedades de los BS en las interfaces líquido / líquido (Pereira *et al.*, 2013). Por lo tanto, es importante evaluar estas relaciones y se estudió la tensión interfacial alcanzada con el BS producido por la cepa IMP-G en un sistema de agua / aceite con dos tipos de aceite crudo.

3.5.1 Efecto de la temperatura y la salinidad sobre %E₂₄.

Como se mencionó previamente los biosurfactantes poseen muchos usos comerciales basados en sus habilidades para estabilizar una emulsión (Altmajer *et al.*, 2012). Sin embargo al realizar la medición de la actividad emulsificante con el sobrenadante libre de células los resultados obtenidos mostraron que no se presentó emulsificación en los sistemas probados con el crudo (Figuras 3.38-3.39).



Figura 3.38 Prueba de %E₂₄ sistema aceite 500A- biosurfactante.

En el caso del tipo de aceite en la figura 3.39 se observa que en el sistema con aceite ligero (600F) y biosurfactante de la cepa IMP-G, para ambas temperaturas logró formar una suspensión con microgotas de aceite integradas en la fase acuosa.

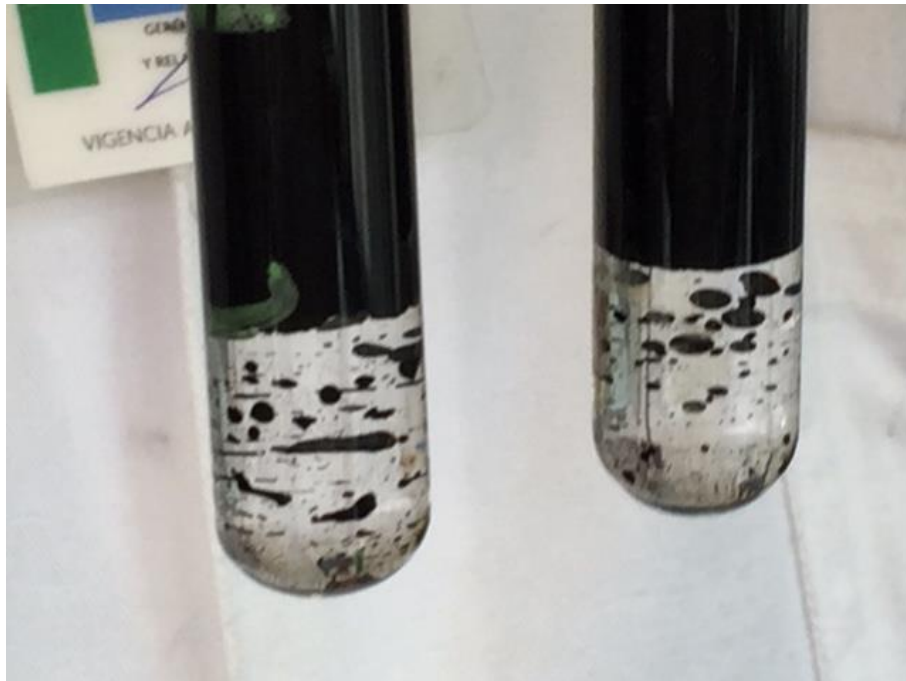


Figura 3.39 Prueba de %E₂₄ sistema aceite 600F- biosurfactante.

La mayoría de los autores en la literatura científica han reportado que las biomoléculas producidas por *B. subtilis* tienen actividad emulsificante con diversos hidrocarburos (Altmajer *et al.*, 2012).

En un estudio dirigido por Abdel-Mawgoud *et al.* (2008) con *B. subtilis* BS5 y empleando caldo de cultivo libre de células y caldo de cultivo con crudo, encontraron altos índices de emulsificación con hexadecano, keroseno y diesel; sin embargo ambas preparaciones mostraron bajo índice de emulsificación contra el aceite de motor y aceite de linaza. Es de hacer notar que estos investigadores no evaluaron el BS con crudos pesados.

Makkar y Cameotra (1998) en un estudio para producir BS con *B. subtilis* en condiciones mesófilas y termófilas reportaron emulsiones del 64.4% utilizando ciclohexano y que además de emulsificar aceite de motor.

Fernades *et al.* (2007) evaluarón la actividad microbiana de *B. subtilis* R14 con hexano observando que la mayor emulsificación la alcanzaban con un valor de 70% después de las 32 h de cultivo.

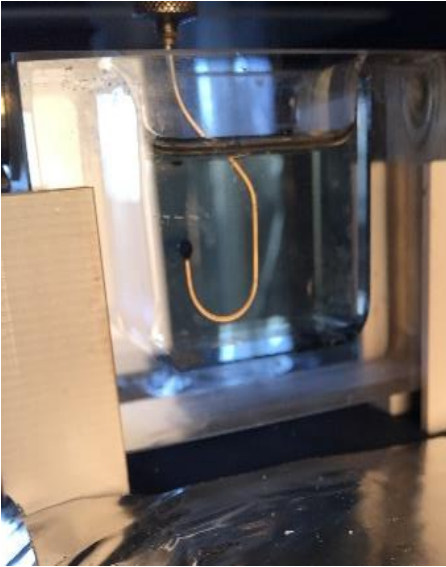
3.5.2 Efecto de la temperatura y la salinidad sobre la tensión interfacial (TIF).

Al poner en contacto dos líquidos inmiscibles, el sistema considerado estará formado por dos fases líquidas y la interface de contacto entre ellas. Estas fases estarán sometidas a fuerzas de magnitudes diferentes a las que están sometidas las moléculas del seno de cada uno de los líquidos. A esta fuerza se le denomina tensión interfacial (TIF) (Antón, 2005).

Los biosurfactantes son compuestos anfifílicos producidos que contienen restos hidrofóbicos e hidrofílicos que confieren la capacidad de acumularse entre fases fluidas, reduciendo así la tensión superficial (TS) y tensión interfacial (TIF) en la superficie y la interfaz, respectivamente (Banat *et al.*, 2010). Lo cual promueve la disminución de las fuerzas capilares, aumentando la movilidad y la liberación del petróleo residual de los yacimientos (Bryant y Lockhart, 2002). La TS y la TIF se ven afectadas por factores ambientales como el pH, la temperatura y la salinidad.

Por esta razón en este trabajo fue evaluada la disminución de la tensión interfacial del biosurfactante con crudo de diferentes características (Tabla 3.5) en sistemas con diferente temperatura (30 y 60°C) y salinidad (0, 2.5, 25 y 50 mgL⁻¹ de NaCl).

[A]



[B]

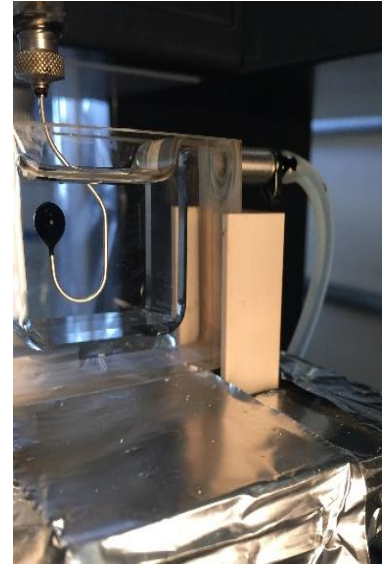


Figura 3.40 Forma de la gota pendiente sistema [A] aceite 500A/biosurfactante 30°C; [B] aceite 500A/agua destilada 30°C sin sal.

[A]



[B]



Figura 3.41 Forma de la gota pendiente sistema [A] aceite 600F/biosurfactante 30°C; [B] aceite 600F/agua destilada 30°C sin sal.

Tabla 3.5 Características de los aceites crudos empleados para evaluar la TIF en función del BS producido por la cepa IMP-G

| Aceite | Grados API | Clasificación |
|--------|------------|---------------|
| 500 A | 22.49 | Pesado |
| 600 F | 33.39 | Ligero |

Se probaron 2 aceites crudos en el estudio (500A y 600F) para evaluar la TIF alcanzada por la cepa IMP-G, emplando como medio circundante medio mineral con biosurfactante y utilizando como blanco agua destilada y medio mineral (Figuras 3.40 [A] y 3.41 [A]) de los cuales pudimos observar que para ambos tipos de crudo al emplear el BM con BS se formaron gotas de diámetro pequeño, lo que denota tensiones bajas, y el tamaño de las gotas de crudo formadas en el medio acuoso está relacionado con la TIF, a mayor tamaño mayor TIF entre los líquidos. Así mismo se pudo observar en el caso contrario con las gotas formadas por los aceites en el medio circundante de agua (Figuras 3.40 [B] y 3.41 [B]) los cuales presentarán gotas de aceite más grandes.

3.5.2.1 Comparación de los resultados del TIF en los aceites

Al realizar la evaluación de descenso de TIF empleando aceite 600F en las diferentes concentraciones salinas y temperaturas (Figura 3.42) se observó que la mayor disminución de la TIF fue de 13.69 unidades, llegando a 0.93 mN/m con el tratamiento a 60°C y una concentración del 2.5% de NaCl. No se observó una correlación entre la temperatura y salinidad puesto que en todos los casos se logró descender la TIF de entre 1.58 a 0.93 mN/M en los sistemas con BS.

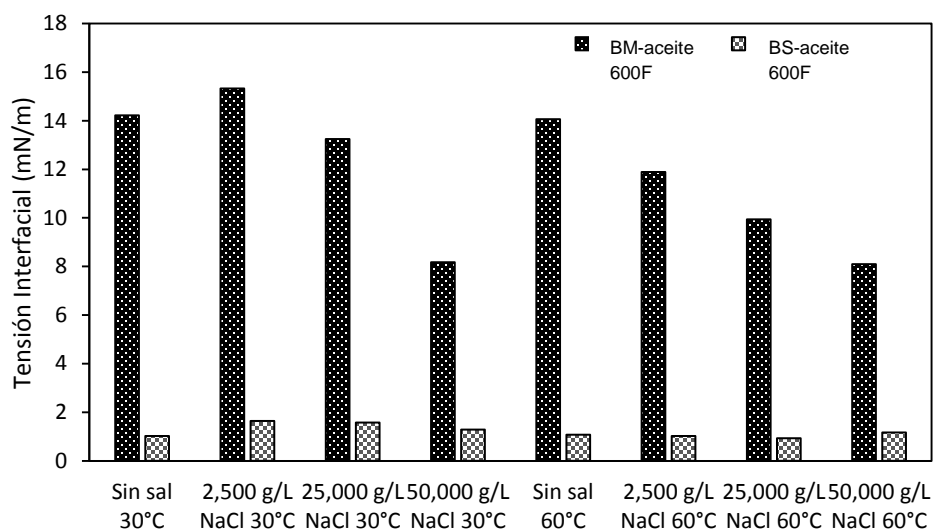


Figura 3.42 Comparación de la tensión interfacial entre los sistemas aceite 600F/biosurfactante (BS-aceite) y el control aceite 600F/medio mineral (BM-aceite) a diferentes condiciones ambientales.

Para el caso del aceite 500A (Figura 3.43) la mayor reducción a 30 y 60°C se dio en una concentración salina del 2.5% de NaCl, descendiendo a 3.39 mN/m (14.73 unidades) y 2.53 mN/m (10.38 unidades) respectivamente; En el resto de los tratamientos obtuvo un comportamiento similar presentando reducciones de 3.65 a 2.86 mN/m.

De este estudio se desprende que la TIF no solo depende de las condiciones ambientales, sino que también de los constituyentes de las fases. Como se observa para los diferentes aceites, la interacción con el biosurfactante a las mismas condiciones presentó diferentes valores de TIF.

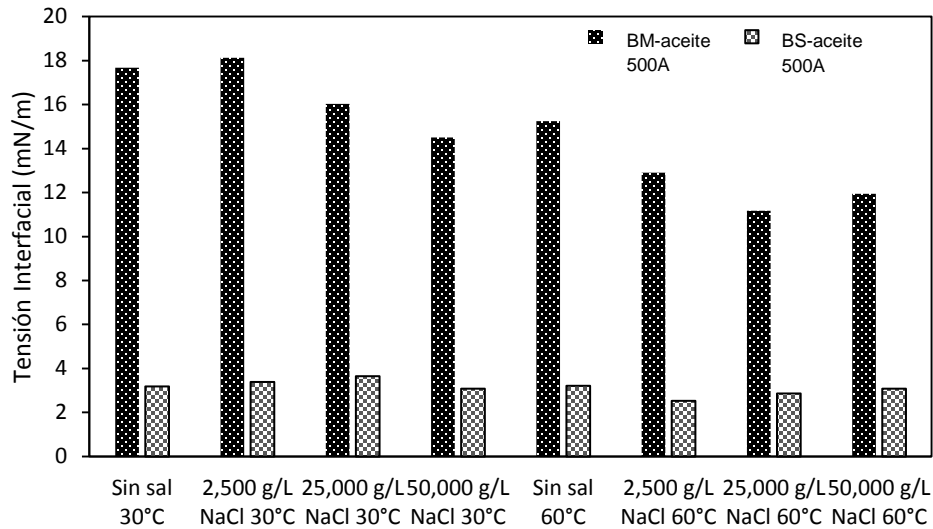


Figura 3.43 Comparación de la tensión interfacial entre los sistemas aceite 500A/biosurfactante y el control (aceite 500A/medio mineral) a diferentes condiciones ambientales.

La comparación de estos resultados coincide con Deleu *et al.* (1999) en la que en un estudio de la emulsión y tensión interfacial de *B. subtilis* lograron la reducción de la TIF hasta 1 mN/m. Así mismo Pereira *et al.* (2013) al realizar la caracterización y optimización de *B. subtilis* (#309, #311 y #573) encontraron que tienen la capacidad de reducir la TIF a valores de hasta 5 mN/m. Al-bahary *et al.* (2013) analizaron la producción de *B. subtilis* B20 a nivel matraz y lograron producir BS capaz de reducir la TIF de 27 mN/m a 5.02 mN/m.

3.6 Escalamiento de la producción de biosurfactante de nivel matraz a nivel bioreactor

Una vez comprobado el crecimiento, producción de biosurfactante y establecidos los parámetros nutritivos y ambientales del microorganismo a nivel matraz, se realizó el cambio de sistema de cultivo a un bioreactor de tipo tanque agitado de 3 L en el que se analizó la producción de BS hasta las 72 h (Figura 3.44).



Figura 3.44 Producción de biosurfactante por la cepa IMP-G en un bioreactor de tipo tanque agitado A) $T=0$ h, B) $T=24$ h y C) $T=48$ h.

Para la producción de biosurfactante a nivel bioreactor se observó que la TS en el medio de cultivo se mantuvo de los 37.99 mN/m a 50.44mN/m, siendo esta más alta que la obtenida en las cinéticas a nivel matraz (Ver Sección 3.3.2.1). También se observó que alrededor de las 20 h, el sistema producía una gran cantidad de espuma.

Joshi *et al.* (2013) señalan que al realizar el escalamiento de *Bacillus licheniformis* R2 detectaron que en la espuma se concentra el BS, por lo que diseñaron un sistema de recolección de espuma, al que tras analizar su TS descubrieron que ésta llegó hasta 28mN/m.

Sobre esta base se diseñó un sistema de recolección de espuma en la parte superior del bioreactor con un tubo adaptado con un frasco recolector (Figura 3.45). Se realizó una cinética analizando la TS de la espuma producida por el microorganismo, la cual presentó una TS de 27.07 mN/m a las 24 h y permaneciendo en 27.48 mN/m hasta las 72 h (Figura 3.46). En contraste la TS en el caldo de cultivo fue de 40.89 mN/m a las 72 h; por lo que se puede concluir que el biosurfactante producido por la cepa IMP-G en el bioreactor se concentró en la espuma.



Figura 3.45 Bioreactor con apertura superior y conexión de manguera a un frasco para la recolección de espuma.

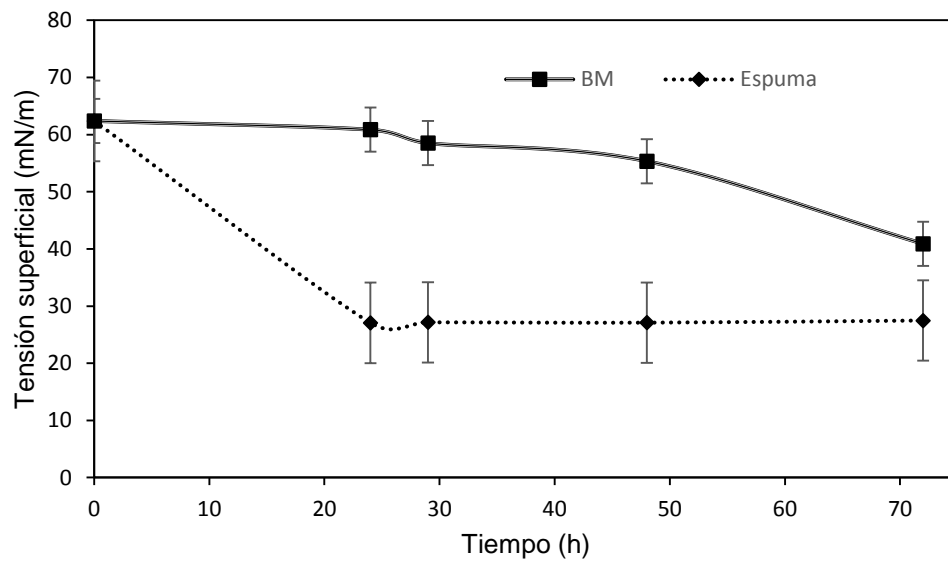


Figura 3.46 Cinética de la producción de biosurfactante en el bioreactor analizada como TS en la espuma y en el caldo de cultivo.

La espuma recolectada se capturó en un frasco y el producto fue secado y llevado directamente a peso constante en horno a 80°C durante 72 h.

3.6.1 Dispersión de aceite del biosurfactante

La técnica de dispersión de aceite mide el diámetro de las zonas claras (halos) que se forman al colocar una gota de una solución que contiene un biosurfactante en una mezcla de aceite-agua (figura 2.3) (Morikawa *et al.*, 2000). Las muestras fueron evaluadas por triplicado y se utilizó como control el medio mineral sin inocular.

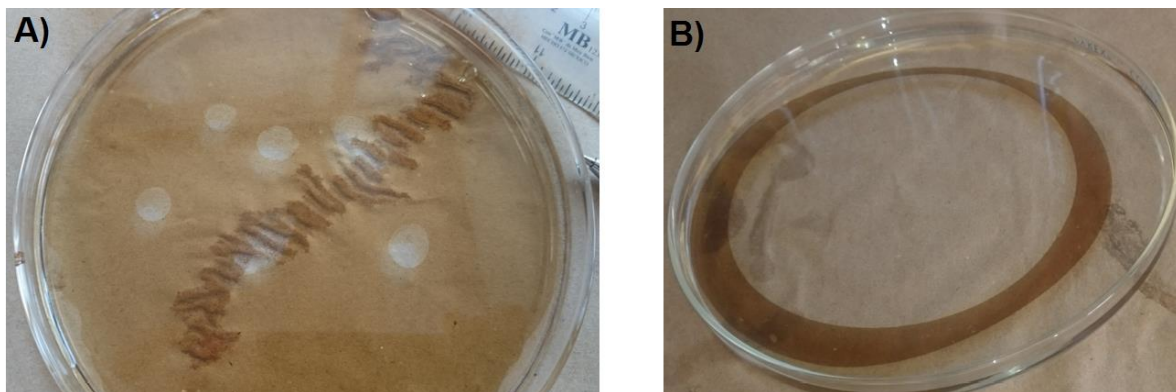


Figura 3.47 Evaluación de la dispersión de aceite con A) Biosurfactante contenido a nivel matraz B) Biosurfactante contenido en la espuma producida en el bioreactor.

En cuanto a la dispersión de DA como se observa en la figura 3.47 se detectó una gran diferencia entre los halos formados por los productos obtenidos a nivel matraz y bioreactor. El producto presente en el caldo de cultivo a nivel matraz en presentó halos con diámetros de 1 a 2 cm, mientras que con la aplicación del producto obtenido directamente de la espuma del reactor se alcanzaron halos de un diámetro de hasta 12 cm.

Santos da Silva *et al.* (2015) coinciden con que la integración del dispositivo de separación de espuma en el bioreactor se muestra como un método simple y práctico para la concentración de surfactina en *Bacillus* sp.

3.7 Rendimiento de la producción de biosurfactante de nivel matraz a nivel biorreactor

Para la aplicación a gran escala de los biosurfactantes es necesario encontrar alternativas a los problemas actuales (alto costo y bajo nivel de producción). Para producir BS en cantidad suficiente la investigación necesita centrarse principalmente en lograr mayores rendimientos y optimizar el proceso (Motta *et al.*, 2016).

La estimación del rendimiento del bioproducto se realizó inicialmente con el caldo de cultivo obtenido a nivel matraz el cual se liofilizó para eliminar el agua. En la figura 3.48 se muestra el liofilizado crudo del biosurfactante de la cepa IMP-G procesado después de la purificación con ácido clorhídrico, el cual presentó una coloración café rojiza.



Figura 3.48 Apariencia del liofilizado crudo del biosurfactante de *B. subtilis* IMP-G.

El liofilizado presentó una TS de 34 mN/m y un rendimiento de 2.83 g L⁻¹) (Tabla 3.6). Para determinar el rendimiento del BS a nivel reactor se separó y cuantifico la espuma, ésta se secó y se obtuvo un rendimiento de 1.8 g L⁻¹. Estos datos son similares los reportados por Yeh *et al.* (2006), que al mejorar el diseño de un bioreactor para la producción de surfactina con *Bacillus subtilis* ATCC 21332, lograron un rendimiento de 1.385 g L⁻¹. Es importante mencionar que en el presente trabajo, si bien el producto crudo del liofilizado fue mayor en masa, por los

parámetros evaluados, podemos determinar que su pureza fue menor a la de la espuma al presentar una TS mayor.

Tabla 3.6 Comparación de la producción a nivel reactor y matraz evaluados por su actividad tensoactiva (TS).

| Parámetro | Valor |
|---|-----------------------------------|
| TS del sobrenadante libre de células (matraz) | 30.839 ± 0.345 mN m ⁻¹ |
| TS del liofilizado | 34.0466± 0.782 mN m ⁻¹ |
| TS de la espuma | 27.49 mN m ⁻¹ |
| Rendimiento crudo a nivel matraz (liofilizado) | 2.83 g L ⁻¹ |
| Espuma seca | 1.8 g L ⁻¹ |

Yao *et al.* 2015 al producir surfactina con *Bacillus amyloliquefaciens* en un reactor industrial de 19 L con aireación de 1 vvm y 150 rpm obtuvieron un rendimiento de 4.7 gL⁻¹ después de 21 h de cultivo. Willenbacher *et al.* (2015) proponen la producción de surfactina en un bioreactor en condiciones anaerobias empleando *Bacillus subtilis* DSM10 utilizando glucosa 2.5 gL⁻¹ y nitrato de amonio. Estos autores reportan un rendimiento de 0.278 g/g.

3.8 Concentración Micelar Crítica (CMC)

En cuanto a la concentración micelar crítica se tomó una muestra del producto crudo concentrado y se diluyó en un volumen apropiado para tener una solución de 10 g L^{-1} y a partir de esta solución se realizó el cálculo para determinar de la CMC, utilizando diferentes diluciones (Figura 3.49). El valor de CMC para este producto semipurificado fue de 1430 mgL^{-1} .

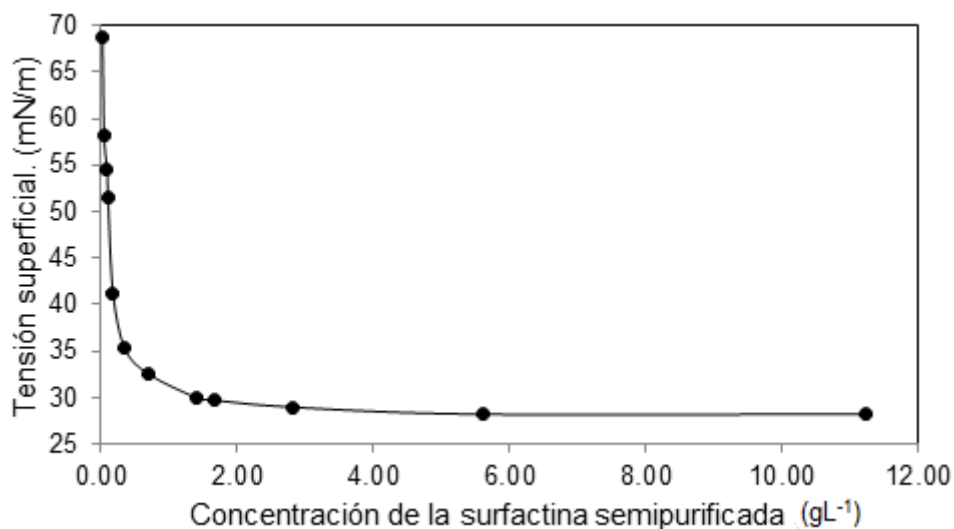


Figura 3.49 Cálculo de la CMC con el producto semipurificado.

3.9 Caracterización del biosurfactante

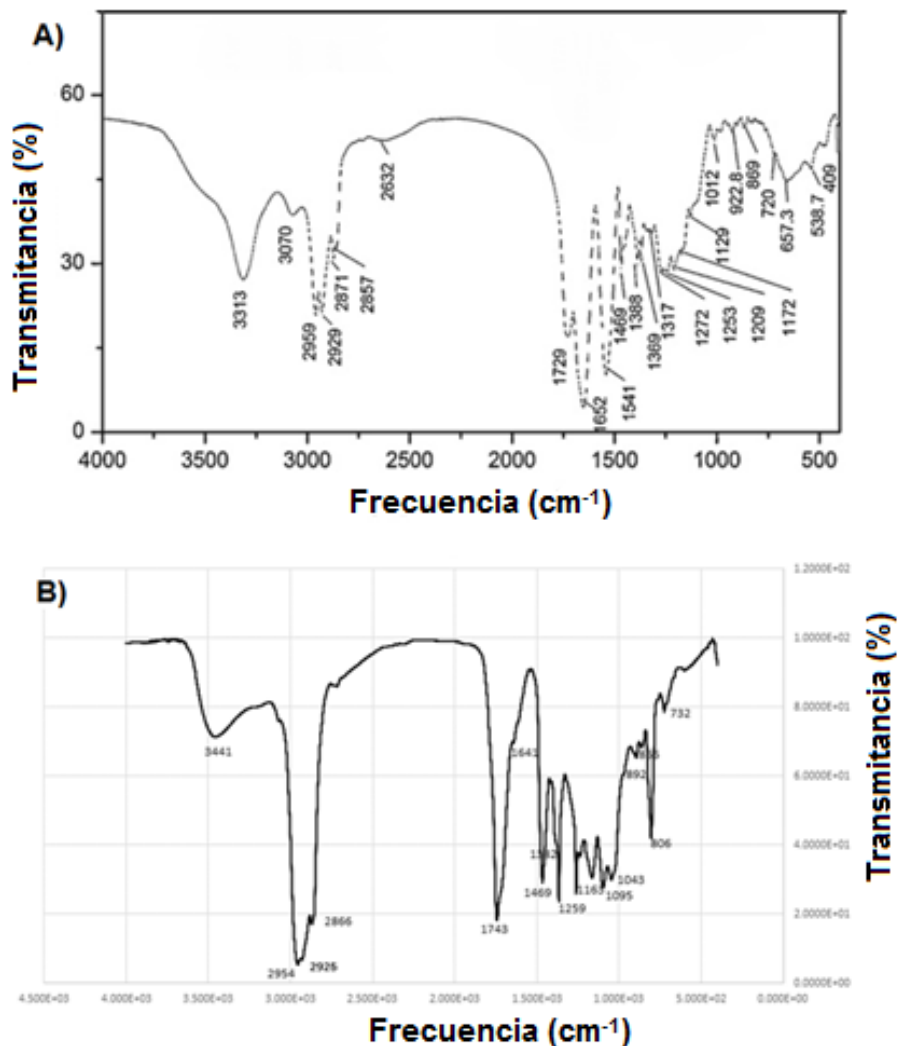


Figura 3.50 Comparación de la espectroscopia FTIR del estándar de surfactina (A) y del biosurfactante semipurificado producido por la cepa IMP-G (B).

El producto semipurificado proveniente de la espuma, fue evaluado con espectroscopia FTIR como se muestra en la figura 3.50. Al contrastar los espectros del biosurfactante semipurificado de la cepa IMP-G y los reportados en la literatura del estándar de surfactina de *Bacillus subtilis* (De Oliveira *et al.* 2013), es posible observar que en los espectros son similares en grupos funcionales. Ambos presentan bandas características de aminoácidos, como los grupos NH en la longitud de onda 3300-3440, C-O en la longitud de 1650, lo que indica la naturaleza péptida del BS, otras señales fueron C-H en la región de 1469, C-H en la región de 1700 además de cadenas de hidrocarburos alifáticos de los 300-2800. Resultados similares fueron obtenidos por El-Sheshtawy *et al.*, en el 2015 al caracterizar surfactina producida por *Bacillus licheniformis* (Figura 3.50).

4. Conclusiones

- ❖ La cepa IMP-G es capaz de producir una biomolécula con propiedades tensoactivas.
- ❖ El diseño experimental Taguchi L9 (3^4) permitió determinar la mejor combinación de nutrientes para la producción del biosurfactante: mascarado [10 gL^{-1}], NaNO_3 [2.0 gL^{-1}], MgSO_4 [0.5 gL^{-1}] y CuSO_4 [0.001 gL^{-1}].
- ❖ La fuente de carbono utilizada es un factor fundamental en la producción del biosurfactante de la cepa IMP-G. En el estudio se eligió al mascarado por su alta eficiencia y bajo costo, reduciendo con ello en gran medida los costos de producción del biosurfactante. Para el mejor tratamiento se obtuvo una reducción de TS con valores 28.44 mN/m en 48 h a nivel matraz.
- ❖ Se encontró que la producción del agente tensoactivo está ligado al crecimiento del microorganismo, a mayor producción de biomasa se obtuvo la mayor producción de biosurfactantes, por lo que se le considera un metabolito primario.
- ❖ La temperatura óptima de crecimiento y producción del biotensoactivo fue de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, a temperaturas mayores el crecimiento de la cepa IMP-G se ve desfavorecido por lo que no es recomendable su uso directo en pozo.
- ❖ El evaluar la producción de BS por la cepa IMP-G, se demostró que la cepa fue estable a niveles moderados de salinidad, puesto que presentó crecimiento y producción del BS a condiciones de 20 gL^{-1} de NaCl .
- ❖ Los resultados muestran que la cepa IMP-G tiene crecimiento en todas las concentraciones de sal evaluadas sin embargo, el mayor crecimiento celular y producción de BS fue a 1.5% de NaCl .
- ❖ La cepa IMP-G demostró ser una cepa facultativa la cual logra producir biosurfactante, incluso en condiciones anaerobias. Sin embargo su producción es más lenta comparada con los sistemas completamente aireados.
- ❖ El microorganismo es capaz emplear el nitrato para realizar respiración anaeróbica y producir biosurfactante.
- ❖ En los intervalos de temperatura y salinidad evaluados se encontró que la actividad tensoactiva de la cepa es estable.

- ❖ El biosurfactante redujó la tensión interfacial en sistemas crudo/agua alcanzando 2.53 mN/m con el aceite 500A (°API 22.49) y 0.93 mN/m con el aceite 600F (°API 33.39).
- ❖ El biosurfactante producido no presentó actividad emulsificante con los aceites crudos probados.
- ❖ El escalamiento de la producción de biosurfactante a nivel bioreactor (3 L) fue factible, además de que se adaptó un sistema de recolección de espuma que permitió una separación eficiente de biosurfactante.
- ❖ El rendimiento del biosurfactante crudo (espuma) en el bioreactor fue de 1.8 gL⁻¹ con una TS de 27.48 mN/m.
- ❖ La CMC del biosurfactante fue de 1.43 gL⁻¹.
- ❖ El espectro FTIR del biosurfactante producido por la cepa IMP-G, presenta grupos funcionales semejantes al estándar de surfactina reportada en la literatura.
- ❖ Los resultados muestran que el BS obtenido por la cepa IMP-G tiene potencial para ser usado en la recuperación mejorada de hidrocarburos al reducir la TIF de crudos pesados.

5. Referencias

- Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M. y Abdel-Haleem N. H. (2008). Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150, 305-325.
- Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S. y Nabi, A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 223(1-3), 143-151.
- Ahimou, F., Jacques, P. y Deleu, M. (2001). Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 749–54.
- Akit, J. E., Guignard, H. y Gerson, D. E (1977). Emulsifying and surface active agents from *Corynebacterium hydrocarboclastus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 19, 1285-301.
- Al-Bahry, S. N., Al-Wahaibi, Y. M., Elshafie, A. E., Al-Bemani, A. S., Joshi, S. J., Al-Makhmari, H. S. y Al-Sulaimani, H. S. (2013). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 81, 141-146.
- Altmajer, V. D., Gudiña, E. J., Alameda, E. J., Teixeira, J. A., Rodrigues, L. R. (2012). Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89, 167-174.
- Amani, H., Mehrnia, M. R., Sarrafzadeh, M. H., Haghighi, M. y Soudi, M. H. (2010). Scale up and Application of Biosurfactant from *Bacillus subtilis* in Enhanced Oil Recovery. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 510–523.
- Antón de Salager, R. E. (2005). Tensión interfacial. Cuaderno FIRP No. 203B. Escuela de Ingeniería Química. Universidad de los Andes. Venezuela.
- Arima, K., Kakinuma A. y Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31, 488–494.
- Ayirala, S. C. y Rao, D. N. (2006). Solubility, miscibility and their relation to interfacial tension in ternary liquid systems. *Fluid Phase Equilibria*, 249, 82-91.

- Baek Y-W. y An, Y-J. (2011). Microbial toxicity of metal oxide na-noparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb2O3) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Science of the Total Environment*, 409, 1603–1608.
- Ban, T. y Sato, T. (1993). Aqueous microbial biosurfactant solutions exhibiting ultra-low tension at oil-water interfaces. *Developments in Petroleum Science*, 39, 115-25.
- Banat, I. M. (1993). The isolation of a thermophilic biosurfactante producing *Bacillus sp.* *Biotechnology Letters*, 15, 591-4.
- Banat, I. M. (1995). Biosurfactants production and possible uses in Microbial Enhanced Oil Recovery and oil Pollution remediation: a review. *Bioresource Technology*, 51, 1-12.
- Banat, I. M., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M. G., Fracchia, L., Smyth, T. J. y Marchan, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 427–444.
- Batista, R. M., Rufino, R. D., Luna, J. M., de Souza, J. E. G. y Sarubbo, L. A. (2010). Effect of Medium Components on the Production of a Biosurfactant from *Candida tropicalis* Applied to the Removal of Hydrophobic Contaminants in Soil. *Water Environment Research*, 82(5), 418-425.
- Besson, F., Peypoux, F., Michel, G. y Delcambe L. (1976). Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*. *The Journal of Antibiotics*, 29, 1043–9.
- Brown, R. L. (2010). Microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 316-320.
- Bryant, S.L. y Lockhart, T. P. (2002). Reservoir engineering analysis of microbial enhanced oil recovery. *SPE Reservoir Evaluation and Engineering*, 5, 365-374.
- Bubela, B. (1985). Effect of biological activity on the movement of fluids through porous rocks and sediments and its application to enhanced oil recovery. *Geomicrobiology Journal*, 4, 313-327.
- Bubela, B. (1987). A comparison of strategies for enhanced oil recovery using in situ and ex situ produced biosurfactants. *Surfactant Science Series*, 25, 143-61.
- Busscher H. J., Van de Belt-Gritter, B., Westerhof, M., Van Weissenbruch, R., Albers, F. W. y Van der Mei, H.C. (1999). Microbial interference in the colonization of silicone rubber implant surfaces in the oropharynx: *Streptococcus thermophilus* against a mixed fungal/bacterial biofilm. In: Rosenberg E, ed. *Microbial Ecology and Infectious Disease*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 66–74.

- Busscher, H. J., Neu, T. y Van der Mei, H. C. (1994). Biosurfactant production by thermophilic dairy streptococci. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41, 4–7.
- Busscher, H. J., Van Hoogmoed, C. G., Geertsema-Doornbusch, G. I. Van Der Kuijl-Booij, M. y Van Der Mei, H. C. (1997). *Streptococcus thermophilus* and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida spp.* on silicone rubber. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3810–7.
- Calvacante, B. F. F. (2008). Produccion of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5 on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 1071-1078.
- Carvalho, A. L. U., Oliveira, F. H. P. C., Mariano, R. L. R., Gouveia, E. R. y Souto-Maior, A. M. (2010). Growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(3), 643-652.
- Chayabutra, C., Wu, J. y Ju, L. K. (2001). Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, 72, 25–33.
- Christofi, N. y Ivshina, I. B. (2002). Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 915–929.
- Cirigliano, M. C. y Carman G. M. (1984). Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 747–750.
- Clarke, K. G., Williams, P. C., Smit, M. S. y Harrison, S. T. L. (2006). Enhancement and repression of the volumetric oxygen transfer coefficient through hydrocarbon addition and its influence on oxygen transfer rate in stirred tank bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 28(3), 237-242.
- Codina, J. C., F. M. Cazorla., A. Pérez-García y De Vicente A. (2000). Heavy metal toxicity and genotoxicity in water and sewage determined by microbiological method. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 1552–1558.
- Cortés-Sánchez, A. J., Troconis-Torres, I. G. y Jaramillo-Flores, M. E. (2013). Surfactantes biológicos con aplicación potencial en tecnología de alimentos: una revisión. *Biológicas*, 15(1), 16–23.
- Coutte, F., Lecouturier, D., Yahia, S. A., Laclère, V., Béchet, M., Jacques, P. y Dhulster, P. (2010). Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 499-507.

- Davis, D., Lynch, H. y Varley J. (1999). The Production of Surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 213332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enzyme and Microbial Technology*, 25,322-329.
- De Gennes, P. G. y Taupin, C. (1982). Microemulsions and the Flexibility of Oil/Water Interfaces. *Journal of Physical Chemistry*, 86, 2294–2304.
- De Oliveira, D. W., Franca, W. L., Felix, A. K., Martins, J. J., Giro, M. E., Melo, V. y Goncalves, L. R. (2013). Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101, 34–43.
- Deleu, M., Razafindralambo, H., Popineau, Y., Jacques, P., Thonart, P., Paquot, M. (1999). Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152, 1–3.
- Desai, J. D. (1987). Microbial surfactants: evaluation, types and future applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 46, 440–449.
- Desai, J. D. y Banat I. M. . (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 47–64.
- Déziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lépine, F. y Bisailon, J. G. (1996). Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1908–1912.
- Donahue, D. J. y Bartell, F. E. (1952). The Boundary Tension at Water-Organic Liquid Interfaces. *Journal of Physical Chemistry*, 56, 480-84.
- Eliseev, S. A., Vildanova-Martsishin, R., Shulga, A., Shabo, A. y Turovsky, A. (1991). Oil-washing bioemulsifier produced by *Bacillus sp.* *Journal of Microbiology*, 53, 61-6.
- El-Sheshtawy, H. S., .Aiad, I., Osman, M. E., Abo-ELnasr, A. A. y Kobisy, A. S. (2015). Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. *Egyptian Journal of Petroleum*, 24(2), 155-162.
- Fattom, A., y Shilo, M. (1985). Production of emulcyan by *Phormidium J-1*: its activity and function. *FEMS Microbiology Ecology*, 31, 3–9.
- Fernandes, P. A. V., de Arruda I. R., Botelho, Santos. A. F. A.; de Araújo A. A., Souto, M. A. M. y Azevedo X. E. (2007). Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis R14* against multidrug-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 704-709.

- Francy, D. S., Thomas J. M., Raymond R. L. y Ward C. H. (1991). Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *Journal of Industrial Microbiology*, 8, 237–245.
- Franzetti, A., Caredda, P., Ruggeri, C., La Colla, P., Tamburini, E., Papacchini, M. y Bestetti, G. (2009). Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. *Chemosphere*, 75, 810–807.
- Gabitto, G. F. (2006). SPE 102328 presented at the Annual Technical Conference and Exhibition held in San Antonio, Texas.
- Gerard, J., Lloyd, R., Barsby, T., Haden P., Kelly M.T. y Andersen R. J. (1997). Massetolides A-H, antimycobacterial cyclic depsipeptides produced by two pseudomonads isolated from marine habitats. *Journal of Natural Products*, 60, 223–9.
- Ghojavand, H., Vahabzadeh, F., Roayaedi, E. y Khodabandeh, S. A. (2008). Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). *Journal of Colloid and Interface Science*, 324 (1-2), 172-176.
- Grangemard, I., Wallach, J., Maget-Dana, R. y Peypoux, F. (2001). Lichenysin: a more efficient cation chelator than surfactin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 90, 199–210.
- Gudiña, E. J., E. C. Fernandes, A. I. Rodríguez, Teixeira J. A. y Rodrigues L. R. (2015). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Frontiers in Microbiology*, 6 (1), 1-7.
- Haddad, N. I. A., Wang, J. y Mu, B. (2009). Identification of a Biosurfactant Producing Strain: *Bacillus subtilis* HOB2. *Protein and Peptide Letters*, 16, 7-137.
- Hommel, R. K. y Huse, K. (1993). Regulation of sophorose lipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*. *Biotechnology Letters*, 15, 853–858.
- Inoue, S. y Ito, S. (1982). Sophrolipids from *Torulopsis bombicola* as microbial surfactants in alkane fermentations. *Biotechnology Letters*, 4, 3-8.
- Isoda, H., Kitamoto, D., Shinmoto H., Matsumura, M., y Nakahara, T. (1999a). Microbial extracellular glycolipid induction of differentiation and inhibition of protein kinase C activity of human promyelocytic leukaemia cell line HL60. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61, 609–14.
- Isoda, H., Shinmoto, H., Matsumura, M. y Nakahara, T. (1999b). The neurite-initiating effect of microbial extracellular glycolipids in PC12 cells. *Cytotechnology*, 31, 163–70.

- Jenny, K., Kappeli, O. y Fietcher, A. (1991). Biosurfactants from *Bacillus licheniformis*: structural analysis and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 5–13.
- Jiménez, I. D., Medina, M. S. A. y Gracida, R. J. N. (2010). Biosurfactant properties, applications and production: a review. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 26(1), 65-84.
- Joshi, S. J., Geetha S. J., Yadav, S. y Desai, A. J. (2013). Optimization of Bench-Scale Production of Biosurfactant by *Bacillus licheniformis* R2, *APCBEE Procedia* 5, 232 – 236.
- Kachholz, T. y Schlingmann, M. (1987). Possible Food and Agricultural Applications of Microbial Surfactants: An Assessment. In: *Biosurfactants and Biotechnology*, Kosaric, N., W.L. Carns and N.C.C. Gray (Eds.). Marcel Dekker, New York, USA. 183-210.
- Kappeli, O., y Finnerty, W. R. (1979). Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. *Journal of Bacteriology*, 140, 707–712.
- Khuri, A. I. y Cornell, J.A. (1987). Response surface. Design and analyses. *Statics: Textbooks and Monographs*. 81.
- Kim, H. S., Yoon B. D., Lee, C. H., Suh, H. H., Oh, H. M., Katsuragi, T. y Tani, Y. (1997). Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84, 41–46.
- Kitamoto, D., Nakane, T., Nakao, N., Nakahara, T. y Tabuchi, T. (1992). Intracellular accumulation of mannosylerythritol lipids as storage materials by *Candida antarctica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 768-72.
- Kitamoto, D., Yanagishita, H., Shinbo, T., Nakane, T., Kamisawa, C. y Nakahara, T. (1993). Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *Journal of Biotechnology*, 29, 91–6.
- Kretschmer, A., Bock, H. y Wagner, F. (1982). Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkane. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 864–870.
- Kronemberger, F. D., Anna, L., Fernandes, A., de Menezes, R. R., Borges, C. P. y Freire, D. M. G. (2008). Oxygen-controlled biosurfactant production in a bench scale bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 147, 33–45.
- Lang, S. y Wullbrandt, D. (1999). Rhamnose lipids—biosynthesis, microbial production and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 22–32.

- Lang, S., Brakemeier, A., Heckmann, R., Spöckner, S. y Rau, U. (2000). Production of native and modified sophorose lipids. *Chimica Oggi/Chem Today*, 18, 76–79.
- Lang, S., y Wagner, F. (1987). Structure and properties of biosurfactants, p. 21–47. En N. Kosaric, W. L. Cairns, and N. C. C. Gray (ed.), *Biosurfactants and biotechnology*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Lay, J. J., Noike, T. y Li, Y-Y. (1998). Mathematical Model for Methane Production from Landfill Bioreactor. *Journal of Environmental Engineering*, 730-736.
- Lesik, O. Y., Elyseev, S. A., Polulyakh, O. V. y Karpenko, E. V. (1991). Production of a surface-active complex by the culture of carotene-synthesizing yeast *Phaffia rhodozyma* and its emulsifying properties. *Journal of Microbiology*, 53, 36-40.
- Lesik, O. Y., Karpenko, E. V., Elyseev, S. A. y Turovsky, A. A. (1989). The surface-active and emulsifying properties of *Candida lipolytica* Y-917 grown on n-hexadecane. *Journal of Microbiology*, 51, 56-9.
- Lin, S. C. (1996). Biosurfactants: recent advances. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 66, 109–120.
- Lin, S. C., Carswell, K. S., Sharma, M. M. y Georgiou, G. (1994). Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41, 281–285.
- Lu, J. R., Zhao X. B. y Yaseen M. (2007). Biomimetic amphiphiles: Biosurfactants. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 12, 60–67.
- MacDonald, C. R., Cooper, D. G. y Zajic, J. E. (1981). Surface-active lipids from *Nocardia* grown on hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 117-23.
- Madigan, M., Martinko, J., y Parker, J. (1998). *Brock Biología de los Microorganismos*. 8° Edición, traducido de *Brock Biology of Microorganisms*, Prentice Hall, Inc.
- Madoni, P. y Romeo, M. G. (2006). Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. *Environmental Pollution*, 141, 1–7.
- Maier, R. y Soberon-Chavez, G. (2000). Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 625–33.
- Makkar, R. S y Cameotra, S. S. (2002). Effects of Various Nutritional Supplements on Biosurfactant Production by a Strain of *Bacillus subtilis* at 45°C. *Journal of Surfactants and Detergents*, 5(1), 11-17.

- Makkar, R. S. y Cameotra, S. S. (1998). Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20, 48-52.
- Martínez, G. X. (2011). Producción de biosurfactantes por microorganismos aislados de sitios extremos y contaminados con hidrocarburos. (Tesis para obtener el título de ingeniero ambiental). Instituto Politécnico Nacional, México.
- McInerney, M. J., Javaheri, M. y Nagle, D. P. (1990). Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. *Journal of Industrial Microbiology*, 5, 95-102.
- Mittenbuhler, K., Loleit, M., Baier, W., Fischer, B., Sedelmeier, E., Jung, G., Winkelmann, G., Jacobi, C., Weckesser, J., Erhard, M. H., Hofmann, A., Bessler, W. y Hoffmann, P. (1997). Drug specific antibodies: T-cell epitope-lipopeptide conjugates are potent adjuvants for small antigens in vivo and in vitro. *International Journal of Immunopharmacology*, 19, 277–87.
- Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y. y Imanaka, T. (1993). A new lipopeptide biosurfactante produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *Journal of Bacteriology*, 175, 6459-66.
- Morikawa, M., Hirata, Y. y Imanaka, T. (2000). A study on the structure–function relationship of the lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488(3), 211-8.
- Morikawa, M., Ito, M. y Imanaka, T. (1992). Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-I, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, psf-1. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74, 255-61.
- Morkes, J. (1993). Oil-spills --whose technology will clean up. *Research and Development Magazine*, 35, 54-6.
- Motta, D. L. F., Coutte, F., Ravallec, R., Dhulster, P., Tournier-Couturier, L. y Jacques, P. (2016). An improvement of surfactin production by *B. subtilis* BBG131 using design of experiments in microbioreactors and continuous process in bubbleless membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, 218, 944–952.
- Mulligan C. N. y Gibbs B. F. (1989). Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(11), 3016-3019.
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133, 183–198.

- Mulligan, C. N. y Gibbs, B. F. (2004). Types, production and applications of biosurfactants. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 1, 31–55.
- Mutalik, S. R., Vaidya, B. K., Joshi, R. M., Desai, K. M. y Nene, S. N. (2008). Use of response surface optimization for the production of biosurfactante from *Rhodococcus spp.* MTCC 2574. *Bioresource Technology*, 99, 7875–7880.
- Nakano, M. M., Daily, Y. P., Zuber, P. y Clark D. P. (1997). Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *Journal of Bacteriology*, 179, 6749-6755.
- Nakano, M. M., Hoffman, T., Zhu, Y. y Jahn, D. (1998). Nitrogen and Oxygen Regulation of *Bacillus subtilis* nasDEF Encoding NADH-Dependent Nitrite Reductase by TnrA and ResDE. *Journal of Bacteriology*, 180, 5344-5350.
- Naruse, N., Tenmyo, O., Kobaru, S., Kamei, H., Miyaki, T., Konishi, M. y Oki, T. (1990). Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics: production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *The Journal of Antibiotics*, 43, 267–80.
- Neu, T. R., Dengler, T., Jann, B. y Poralla, K. (1992). Structural studies of an emulsion-stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus* strain. *Journal of general microbiology*, 138, 2531-7.
- Nguyen, T. T., Youssef, N. H., McInerney, M. J. y Sabatini, D. A. (2008) Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. *Water Research*, 42, 1735–1743.
- Nievas, M. L., Commendatore, M. G., Estevas, J. L. Bucalá, V. (2008). Biodegradation pattern of hydrocarbons from a fuel oil-type complex residue by an emulsifier-producing microbial consortium. *Journal of Hazardous Materials*, 154, 96–104.
- Nitschke, M. y Pastore, G. M. (2005). Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, 97(2), 336-341.
- Noguera, R. R., Silba, E. O. y Mauricio R. M. (2004). Comparación de modelos matemáticos para estimar los parámetros de degradación obtenidos a través de la técnica de producción de gas. *Livestock Research for Rural Development*, 16, 11.
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget Z. y Cameotra S. S. (2011). Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 633-654.

- Passeri, A. (1992). Marine biosurfactants: IV. Production, characterization and biosynthesis of an anionic glucose lipid from the marine bacterial strain MM1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37, 281-6.
- Peng, F., Liu, Z., Wang, L. y Shao, Z. (2007). An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1603-1611.
- Pereira, J. F. B., Gudiña, E.J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J.A., Coutinho, J. A. P. y Rodrigues, L. R. (2013). Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*, 111, 259–268.
- Philp, J. C., Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B., Dunbar, S. A., Christofi, N., Lang, S. y Wray, V. (2002). Alkanotrophic *Rhodococcus ruber* as a biosurfactante producer. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 318-324.
- Pratt-Terpstra, I. H., Weerkamp, A. H. y Busscher, H. J. (1989). Microbial factors in a thermodynamic approach of oral streptococcal adhesion to solid substrata. *Journal of Colloid and Interface Science*, 129, 568–74.
- Priya, T. y Usharani, G. (2009). Comparative Study for Biosurfactant Production by Using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Botany Research International*, 2(4), 284-287.
- Pruthi, V. y Cameotra, S. S. (1997). Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface-active properties by *Serratia marcescens*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(1), 133-135.
- Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., McClean, S., Marchant, R. y Banat, I. B. (2002). Rhamnolipid Biosurfactant Production by Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Using Low-Cost Raw Materials. *Biotechnology Progress*, 18(6), 1277-1281.
- Raiger, L. L. J. y López, N. I. (2009). Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Química Viva*, 8(3), 146-161.
- Ramana, K. V. y Karanth, N. G. (1989). Production of biosurfactants by the resting cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6. *Biotechnology Letters*, 11, 437–442.
- Ramos, H. C., Boursier, L., Moszer, I., Kunst, F., Danchin, A. y Glaser, P. (1995). Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and-independent regulatory mechanism. *The EMBO Journal*, 14, 5984.
- Rashedi, H., Yazdian, F. y Naghizadeh, S. (2012). Microbial Enhanced Oil Recovery, Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR) Processes and Bioremediation of Oil-Contaminated Sites, Dr. Laura Romero-Zerón (Ed.), InTech,

- Raza, Z. A., Khalid, Z. M. y Banat, I. M. (2009). Characterization of rhamnolipids produced by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant strain grown on waste oils. *Journal of Environmental Science and Health Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 44, 1367–1373.
- Reid, G., Heinemann, C., Velraeds, M., Van der Mei, H. C. y Busscher H. J. (1999). Biosurfactants produced by *Lactobacillus*. *Methods in Enzymology*, 310, 426–33.
- Reid, G., Zalai, C. y Gardiner, G. (1984). Urogenital *Lactobacilli* probiotics, reliability, and regulatory issues. *Journal of Dairy Science*, 84, 164–9.
- Reiling, H. E., Thanei-Wyss, U., Guerra-Santos, L. H, Hirt, R., Kappeli, O. y Fiechter, A. (1986). Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5), 985-989.
- Ren, N-Q., Xu, J-F., Gao, L-F., Xin, L., Qiu, J., y Su, D-X. (2010). Fermentative bio-hydrogen production from cellulose by cow dung compost enriched cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(7), 2742-2746.
- Rodrigues, L. R., Van der Mei, H. C., Teixeira, J. y Oliveira, R. (2004a). Biosurfactant from *Lactococcus lactis* 53 inhibits microbial adhesion on silicone rubber. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 306–11.
- Rodrigues, L. R., Van der Mei, H.C., Teixeira, J. y Oliveira, R. (2004b). Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4408–10.
- Rodrigues, L., Teixeira, J., Oliveira, R. y Mei van der, H. C. (2006a). Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. *Process Biochemistry*, 41, 1-10.
- Rodrigues, L. R., Banat, I. M., Van der Mei, H. C., Teixeira J. A., y Oliveira, R. (2006b). Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. *Journal of Applied Microbiology*, 100(3), 470-80.
- Rodrigues, L. R., Van der Mei, H. C., Banat, I. M., Teixeira J. y Oliveira, R. (2006c). Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 46, 107–12.
- Rosenberg E., Zuckerberg A., Rubinovitz C. y Gutnick D. L. (1979). Emulsifer of *Arthrobacter* RAG–1: isolation and emulsifying properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 402–408.

- Rosenberg, E. (1986). Microbial surfactants. *Critical Reviews in Biotechnology*, 3,109–132.
- Rosenberg, E., Schwartz, Z., Tenenbaum, A., Rubinovitz, C., Legmann, R. y Ron E. Z. (1989). A microbial polymer that changes the surface properties of limestone: Effect of biodispersan in grinding limestone and making paper. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 10, 241-250.
- Ruggeri, C., Franzetti, A., Bestetti, G., Caredda, P., La Colla, P., Pintus, M., Sergi, S. y Tamburini, E. (2009). Isolation and characterisation of surface active compound-producing bacteria from hydrocarboncontaminated environments by a high-throughput screening procedure. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63, 936–942.
- Saini, H. S., Barragán-Huerta, B. E., Lebrón-Paler, A., Pemberton, J. E., Vázquez, R. R., Burns, A. M., Marron, M. T., Seliga, C. J., Gunatilaka, A. A. y Maier, R. M. (2008). Efficient purification of the biosurfactant viscosin from *Pseudomonas libanensis* strain M9-3 and its physicochemical and biological properties. *Journal of Natural Products*, 71,1011-1015.
- Salager, R. E. (2005). “Tensión Interfacial” Cuaderno FIRP No.203B. Escuela de Ingeniería Química, (Universidad de los Andes. Venezuela).
- Santos da Silva, M. T., Faria, S. C. M., Silva, L. A. y Costapinto, S. C. (2015). Integral production and concentration of surfactin from *Bacillus* sp.ITP-001 by semi-batch foam fractionation. *Biochemical Engineering Journal*, 104, 91–97.
- Schlumberger. (2018). Oilfield Glossary. U.S.A:
https://www.glossary.oilfield.slb.com/es/Terms/s/secondary_recovery.aspx.
- Sen, R. (2008). Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, 714–724.
- Shavandi, M., Mohebbali, G., Haddadi, A., Shakarami, H. y Nuhic, A. (2011). Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(2), 477-482.
- Shawn, J. D. (1992). *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*. Ed. Butterworth Heinemann. Fourth Edition. London 64-73pp.
- Sheppard, J. D. y Cooper, D. G. (1990). The effects of a biosurfactant on oxygen transfer in a cyclone column reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 48(3), 325-336.
- Shibahara, M., Zhao, X., Wakamatsu, Y., Nomura, N., Nakahara, T., Jin, C., Nagaso, H., Murata, T. y Yokoyama, K. K. (2000). Mannosylerythritol lipid increases levels of

galactoceramide in and neurite outgrowth from PC12 pheochromocytoma cells. *Cytotechnology*, 33, 247–51.

- Shulga, A. N., Karpenko, E. V., Eliseev, S. A., Turovsky, A. A. y Koronelli, T. V. (1990). Extracellular lipids and surface-active properties of the bacterium *Rhodococcus erythropolis* depending on the source of carbon nutrition. *Mikrobiologiya*, 59, 443-7.
- Singer, M. E. Vogt y Finnerty, W. R. (1984). Microbial metabolism of straight and branched alkanes. In *Petroleum Microbiology*, ecl. R. Atlas. Collier MacMillan, New York, 1-59.
- Smith, J. E. (1996). Bioprocess/fermentation technology. En *Biotechnology* (3rd. pp 60-61) UK. Cambridge University Press.
- Suzuki, T., Tanaka, H. y Itoh, S. (1974). Sucrose lipids of *arthrobacteria*, *corynebacteria* and *nocardiae* grown on sucrose. *Agricultural and Biological Chemistry*, 38, 557-563.
- Syldatk C. y Wagner, F. (1987). Production of biosurfactants. In: *Biosurfactants and Biotechnology*. Kosaric N., Cairns W.L., Gary, N. C. C. (Eds.). Marcel Decker, Inc., NY.
- Tanaka, Y., Takashi, T., Kazuhik, U., Uno, J., Uchida, Y. y Shida, O. (1997). Method of producing iturin A and antifungal agent for profound mycosis. *Biotechnology Advances*, 15, 234–5.
- Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian T. y Banat I. M. (2007) Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake. *Letters in Applied Microbiology*, 45:686–691.
- Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T. y Banat, I. M. (2008) Production and characterization of a glycolipid biosurfactante from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 917–925.
- Thimon, L., Peypoux, F., Wallach, J. y Michel, G. (1995). Effect of lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. *FEMS Microbiology Letters*, 128, 101–6.
- Tuleva, B., Christova, N., Cohen, R., Antonova, D., Todorov, T. y Stoineva, I. (2009). Isolation and characterization of trehalose tetraester biosurfactants from a soil strain *Micrococcus luteus* BN56. *Process Biochemistry* 44:135-341.

- Tulloch, A., Spencer, J. F. T. y Deinema, M. H. (1968). A new hydroxy fatty acid sophoroside from *Candida bogoriensis*. *Canadian Journal of Chemistry*, 46, 345-347.
- Uchida, Y., Misawa, S., Nakahara, T. y Tabuchi, T. (1989a). Factors affecting the formation of succinoyltrehalose lipids by *Rhodococcus erythropolis* SD-74 grown on n-alkanes. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 765–9.
- Uchida, Y., Tsuchiya, R., Chino, M., Hirano, J. y Tabuchi T. (1989b) Extracellular accumulation of mono and di succinyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 757–63.
- Urum, K. y Pekdemir, T. (2004). Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere*, 57, 1139–1150.
- Van Haesendonck, I. P. H. y Vanzeveren, E. C. A. (2004). Rhamnolipids in bakery products. W. O. 2004/040984, International Application Patent (PCT), Washington, DC., USA.
- Van Hoogmoed, C. G., Van der Kuijl-Booij, M., Van der Mei, H. C. y Busscher, H. J. (2000). Inhibition of *Streptococcus mutans* NS adhesion to glass with and without a salivary conditioning film by biosurfactant-releasing *Streptococcus mitis* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 659–63.
- Velraeds, M, Van der Mei H. C., Reid, G. y Busscher, H. J. (1996a). Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 8, 51–61.
- Velraeds, M., Van der Mei, H. C., Reid, G. y Busscher, H. J. (1997). Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* to solid substrata by an adsorbed biosurfactant layer from *Lactobacillus acidophilus*. *Urology*, 49, 790–4.
- Velraeds, M., Van der Mei, H. C., Reid, G. y Busscher, H. J. (1996b). Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1958–63.
- Vijayakumar, S. y Saravanan, V. (2015). Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Research Journal of Microbiology*, 10 (5), 181-192.
- Vollenbroich, D., Ozel, M., Vater, J., Kamp, R. M. y Pauli, G. (1997b). Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, 25, 289–97.
- Vollenbroich, D., Pauli, G., Ozel, M. y Vater, J. (1997a). Antimycoplasma properties and applications in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology*, 63, 44–9.

- Wakamatsu, Y., Zhao, X., Jin, C., Day, N., Shibahara, M., Nomura, N., Nakahara, T., Murata, T., Yokoyama, K. K. (2001). Mannosylerythritol lipid induces characteristics of neuronal differentiation in PC12 cells through an ERK-related signal cascade. *European Journal of Biochemistry*, 268, 374–83.
- Wasko, M. P. y Bratt, R. P. (1990). Properties of a biosurfactante produced by the fuel contaminant *Ochrobactrum anthropii*. *International Biodeterioration*, 27, 265-73.
- Wayman, M., Jenkins, A. D. y Kormady, A. G. (1984). Biotechnology for oil and fat industry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61, 129–131.
- Wei, Q. F., Mather, R. R., y Fotheringham, A. F. (2005). Oil removal from used sorbents using a biosurfactant. *Bioresource Technology*, 96, 331–334.
- Wei, Y. H. y Chu, I. M. (2002). Mn² improves surfactin produccion in iron-enriched media by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, 24, 479-482.
- Wilkinson, S. G., y L. Galbraith. (1975). Studies on lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Biochemistry*, 52, 331–343.
- Willenbacher, J., Rau, J. T., Rogalla, J., Syldatk, C., Hausmann, R. (2015). Foam-free production of Surfactin via anaerobic fermentation of *Bacillus subtilis* DSM 10 T, *Amb Express*, 5(1), 1.
- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., Wray, V. y Fredrickson H. L. (1995). Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), 1706–1713.
- Yakimov, M., Timmis, K., Wray, V. y Fredrickson H. L. (1995). Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied Environ Microbiology*, 61, 1706–13.
- Yao, S., Zhao, S., Lu, Z., Gao, Y., Lv, F. y Bie, X. (2015). Control of agitation and aeration rates in the production of surfactin in foam overflowing fed-batch culture with industrial fermentation. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(4), 344-349.
- Yeh, M., Wei, Y y Chang J. (2006). Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 41, 1799–1805.
- Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M y McInerney, M. J .(2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 339-347.

- Youssef, N. H., Simpson, D. R., Duncan, K. E., McInerney, M. J., Folmsbee, M., Fincher, T. y Knapp R. M. (2007). In Situ Biosurfactant Production by *Bacillus* Strains Injected into a Limestone Petroleum Reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1239–1247.
- Zeng, G., Zhong, H., Huang, G. y Fu, H. (2005). Physicochemical and microbiological effects of biosurfactant on the remediation of HOC–contaminated soil. *Progress in Natural Science*, 15, 577–585.
- Zhao, X., Geltinger, C., Kishikawa, S, Ohshima, K., Murata, T., Nomura, N., Nakahara, T. y Yokoyama, K. K. (2000). Tretament of mouse melanoma cells with phorbol 12-myristate 13-acetate counteracts mannosylerythritol lipid-induced growth arrest and apoptosis. *Cytotechnology*, 33, 123–30.
- Zhao, X., Wakamatsu, Y., Shibahara, M., Nomura, N., Geltinger, C., Nakahara, T., Murata, T., Yokoyama, K. K. (1999). Mannosylerythritol lipid is a potent inducer of apoptosis and differentiation of mouse melanoma cells in culture. *Cancer research*, 59, 482–6.