



Instituto Politécnico Nacional

Escuela Superior de Ingeniería y Arquitectura
Unidad Profesional Ticomán



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS AEROBIAS AUTOCTÓNAS DE YACIMIENTOS PETROLEROS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES PARA SU APLICACIÓN EN TÉCNICAS DE MEOR

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN GEOCIENCIAS Y
ADMINISTRACIÓN DE RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

LAURA MONDRAGÓN MORA

DIRECTOR DE TESIS INTERNO: M en C. LEOBARDO SALAZAR PEÑA

DIRECTOR DE TESIS EXTERNO: DRA. ROCIO GEORGE TÉLLEZ

México, D. F.

2011



SIP-13-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 10 de Octubre del 2011

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESIA-U.Ticomán en su sesión Ordinaria No. 4 celebrada el día 26 del mes de Abril conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

MONDRAGON
Apellido paterno

MORA
Apellido materno

LAURA
Nombre (s)

Con registro:

B	0	9	1	6	9	9
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: MAESTRIA EN GEOCIENCIAS Y ADMINISTRACION DE LOS RECURSOS NATURALES

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado: "Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas aerobias autóctonas de yacimientos petroleros productoras de biosurfactantes para su aplicación en técnicas de meor".

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:
Microbiología, física, química orgánica, química inorgánica, geología.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
DRA. ROCIO GEORGE TELLEZ (Director Externo) y M. en C. LEOBARDO SALAZAR PEÑA (Director Interno)

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:
México, D.F.

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dra. Rocio George Téllez

M. en C. Leobardo Salazar Peña

Aspirante

Ing. Laura Mondragón Mora

Presidente del Colegio

Ing. Julio E. Morales de la Garza



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 14:30 horas del día 29 del mes de Julio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESIA-U.Ticomán para examinar la tesis titulada:
"Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas aerobias autóctonas de yacimientos petroleros productoras de biosurfactantes para su aplicación en técnicas de meor".

Presentada por el alumno:

Mondragón Mora Laura
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)
Con registro:

B	0	9	1	6	9	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRIA EN GEOCIENCIAS Y ADMINISTRACION DE LOS RECURSOS NATURALES

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

M. en C. Leobardo Salazar Peña

Dra. Rocio George Téllez

Dr. Daniel Romo Rico

M. en C. Rodrigo Mondragón Guzmán

Dr. Cayetano Miguel García Reyes

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Ing. Julio E. Morales de la Garza



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 14 del mes Octubre del año 2011, el (la) que suscribe Laura Mondragón Mora alumno (a) del Programa de Maestría en Geociencias y Administración de Recursos Naturales con número de registro B091699, adscrito a SEPI-ESIA unidad Ticomán, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de M. en C. Leobardo Salazar Peña y Dra. Rocio George Téllez y cede los derechos del trabajo intitulado “AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS AEROBIAS AUTOCTÓNAS DE YACIMIENTOS PETROLEROS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES PARA SU APLICACIÓN EN TÉCNICAS DE MEOR”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección laumondragon@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Nombre y firma

AGRADEC I M I ENTO S:

Manifiesto mi sincero agradecimiento al Instituto Polit ecnico Nacional y al Instituto Mexicano del Petr oleo por coadyuvar en mi desarrollo profesional.

Con gran estimac i on agradezco a mis asesores de tesis la Dra. Rocio George T ellez y al M. en C. Leobardo Salazar Pe na por su dedicac i on y apoyo en la realizac i on de esta tesis.

Al Dr. Eugenio A. Flores por su enorme participac i on y colaborac i on en la realizac i on de esta tesis.

Agradezco infinitamente a mis padres Graciela y Erasmo por apoyarme en este viaje y enseñarme que el trabajo duro siempre da buenos frutos.

Sobre todo agradezco a Dios por darme la oportunidad de disfrutar de la vida.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS AEROBIAS AUTOCTONAS DE YACIMIENTOS PETROLEROS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES PARA SU APLICACIÓN EN TÉCNICAS DE MEOR

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

EVENTOS O CONGRESOS

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

INTRODUCCIÓN 1

CAPITULO 1. ASPECTOS GENERALES DE SURFACTANTES Y BIOSURFACTANTE ... 3

1.1. SURFACTANTES..... 3

1.1.1. CLASIFICACIÓN DE SURFACTANTES 3

SURFACTANTES ANIÓNICOS 5

SURFACTANTES CATIÓNICOS 6

SURFACTANTES NO IÓNICOS 7

SURFACTANTES ZWITTERIÓNICOS 7

1.1.2. EL EFECTO HIDROFÓBICO Y LA FORMACIÓN DE MICELAS 8

1.1.3. USO DE SURFACTANTES EN LA INDUSTRIA PETRÓLERA 10

1.2. BIOSURFACTANTES..... 11

1.2.1. TIPOS DE BIOSURFACTANTES 12

GLICOLÍPIDOS 12

LÍPOPEPTIDOS Y LIPOPROTEÍNAS 14

ÁCIDOS GRASOS Y LÍPIDOS NEUTROS 15

BIOSURFACTANTES POLIMÉRICOS 15

1.2.2. PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES 17

FACTORES AMBIENTALES 18

FACTORES NUTRICIONALES 18

FUENTE DE CARBONO 19

FUENTE DE NITRÓGENO 19

IONES Y ELEMENTOS TRAZA 20

1.2.3. VENTAJAS DEL USO DE BIOSURFACTANTES 21

CAPITULO 2. PROCESOS DE RECUPERACIÓN MEJORADA DE HIDROCARBURO... 23

2.1. EOR..... 23

2.1.1. PROCESOS QUÍMICOS 25

INYECCIÓN DE POLÍMEROS 25

INYECCIÓN DE POLIMERO MICELAR 25

INYECCIÓN DE SURFACTANTE 25

2.1.2. DESPLAZAMIENTO MISCIBLE 26

2.1.3. PROCESOS TÉRMICOS 26

2.1.4. PROCESO DE MOBILIDAD CONTROLADA 26

2.2. MEOR	27
2.2.1. LIMPIEZA DEL YACIMIENTO	27
2.2.2. BIOESTIMULACIÓN DEL YACIMIENTO	28
2.2.3. ESTRATEGIAS Y FACTORES QUE AFECTAN LOS PROCESOS DE MEOR.....	29
2.2.4. REALIZACIÓN DE PRUEBAS PILOTO COMO FACTOR DECISIVO EN MEOR	31
2.2.5. TÉCNICAS DE MEOR EMPLEANDO BIOSURFACTANTES	31
2.2.6. CASOS DE APLICACIÓN DE MEOR A NIVEL MUNDIAL	32
2.2.7. APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE MEOR EN CHICONTEPEC	34
CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS	37
3.2 OBTENCIÓN DE CONSORCIOS PRODUCTORES DE BIOSURFACTANTE.....	37
3.3 ENSAYO PRELIMINAR.....	39
3.4 AISLAMIENTO DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTE	40
3.5 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.....	40
3.6 PREPARACIÓN Y OBSERVACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	40
3.6.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	40
3.6.2 CONDICIONES DE TRABAJO.....	41
3.6.3 OBSERVACIÓN.....	41
3.7 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	42
3.7.1 EXTRACCIÓN DE DNA.....	42
3.7.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR	42
3.7.3 SECUENCIACIÓN	43
3.8 PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE EN MEDIO PPGAS	43
3.9 CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE.....	44
3.10 PRUEBA DE DISPERSIÓN DE GOTA.....	45
3.11 MEDICIÓN DE TENSIÓN SUPERFICIAL.....	45
3.12 PRUEBA DE ESTABILIDAD TÉRMICA	45
3.13 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO	46
3.13.1 EXTRACCIÓN DEL BIOSURFACTANTE.....	46
3.13.2 LIOFILIZACIÓN	46
3.13.3 OBTENCIÓN DEL BIOSURFACTANTE	48
3.13.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LIOFILIZAR.....	48
3.13.5 PROCEDIMIENTO DE LIOFILIZACIÓN	48
3.14 DETERMINACIÓN DE LA CMC	49
3.15 PURIFICACIÓN PARCIAL DEL BIOSURFACTANTE	49
3.16 DETERMINACIÓN DE UNIDADES DE RAMNOSA	50
3.17 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL BIOSURFACTANTE	50
CAPITULO 4.RESULTADOS Y ANÁLISIS	52
4.1 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS	52
4.2 OBTENCIÓN DE CONSORCIOS PRODUCTORES DE BIOSURFACTANTE.....	53
4.3 ENSAYO PRELIMINAR.....	57
4.4 AISLAMIENTO DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTE.....	64
4.5 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.....	66
4.6 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS CONSORCIOS.....	72

4.7 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	77
4.8 PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE EN MEDIO PPGAS	85
4.9 CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE.....	87
4.10 MEDICIÓN DE TENSIÓN SUPERFICIAL.....	91
4.11 PRUEBA DE ESTABILIDAD TÉRMICA	92
4.12 DETERMINACIÓN DE LA CMC	93
4.13 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOSURFACTANTE.....	96
4.14 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL BIOSURFACTANTE	98
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	100
BIBLIOGRAFÍA	102
ANEXO I	

RESUMEN

En este estudio se describe el aislamiento e identificación de consorcios microbianos productores de biosurfactante provenientes de un campo petrolero mexicano (Chicontepec). Estos aislados fueron capaces de crecer a una temperatura de 30, 40 y 60°C utilizando tres diferentes fuentes de carbono (glicerol, keroseno y melaza). Se obtuvo una máxima producción de biosurfactante con uno de los aislados incubado a 40°C. Estos aislados exhiben características bioquímicas, morfológicas y fisiológicas de *Pseudomonas aeruginosa*. Por otra parte, la secuenciación parcial del gen 16S del ácido desoxiribonucleico ribosomal asigna a los aislados seleccionados dentro del grupo bacteriano anteriormente mencionado.

El biosurfactante producido a partir de estos aislados microbianos reduce significativamente la tensión superficial del medio de cultivo, de 60 a 40 mN/m con una Concentración Micelar Crítica de 1 112.5 mg/L. La producción de biosurfactante purificado fue de 26 mg de ramnolípidos/L. El biosurfactante resulto ser termoestable al exponerlo a un rango de temperatura entre 50 a 121°C durante 1h. El análisis de espectroscopía de infrarrojo revelo que la mezcla de biosurfactante es de naturaleza de polisacárido.

Finalmente, las cepas bacterianas evaluadas en este trabajo podrían ser aplicadas en métodos de Recuperación Mejorada de Hidrocarburo Vía Microbiana dentro de yacimientos maduros.

ABSTRACT

In this study, the isolation and identification of a biosurfactante producer microbial consortium from the oil reservoir of a Mexican oil field (Chicontepec) is described. These isolates were able to grow up at 30, 40 and 60 °C with three different carbon sources (glycerol, kerosene and molasses). One of the isolates grew at 40°C with the maximum production of biosurfactant. These isolates exhibited biochemical, morphological and physiological characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa*. Moreover, the partial sequencing of the 16S ribosomal deoxyribonucleic acid gene of the selected isolates assigned them to the above mentioned group.

The biosurfactant produced by these isolates significantly reduced surface tension of the culture media, from 60 to 40 mN/m with a Critical Micelle Concentration of 1112.5 mg/L. The purified biosurfactant production yield was 26 mg of ramnolipids/L. The biosurfactant was exposed to different temperatures from 50 to 121°C during 1 h, and was found to be thermostable. The infrared spectroscopy technique revealed that the partial structural characterization of the biosurfactant mixture of the compounds was composed of polysaccharides in nature.

Finally, bacterial strains evaluated in this work can be applied in methods of microbial enhanced oil recovery at mature oil wells.

EVENTOS O CONGRESOS

Los avances de este trabajo fueron presentados en el siguiente evento:

XIV Congreso nacional de Biotecnología y Bioingeniería del 19 al 24 de Junio del 2011 en el formato de cartel con el tema “Aislamiento y Caracterización de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* autóctonas de yacimientos petroleros productoras de biosurfactante”. (ANEXO I).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la ubicación de los 29 campos petroleros correspondientes al Activo Aceite Terceario del Golfo.

Figura 2. Frascos para la liofilizadora, en donde se muestra la posición inclinada para que la muestra sea congelada.

Figura 3. Sistema de liofilización, matraz con muestra congelada acoplado al sistema de secado del equipo.

Figura 4. Cinética de producción de biosurfactante evaluado mediante el resultado de la prueba de dispersión de gota en el consorcio LCH3 en medio de cultivo A a 40°C.

Figura 5. Cinética de producción de biosurfactante evaluado mediante el resultado de la prueba de dispersión de gota dispersa en el consorcio LCH3 en medio de cultivo B a 40°C.

Figura 6. Cinética de producción de biosurfactante evaluado mediante el resultado de la prueba de dispersión de gota dispersa en los consorcios LCH1, LCH2 y LCH3 en medio de cultivo C a 40°C.

Figura 7. Cinética de crecimiento microbiano y producción de biosurfactante del consorcio LCH3 en medio de cultivo A. El crecimiento microbiano se monitoreó cada 2 h mediante la lectura de la absorbancia del cultivo a 625 nm y la evaluación de la producción de biosurfactante se determinó mediante la prueba de dispersión de gota.

Figura 8: Cinética de crecimiento microbiano y producción de biosurfactante del consorcio LCH1 en medio de cultivo C. El crecimiento microbiano se monitoreó cada 2 h mediante la lectura de la absorbancia del cultivo a 625 nm y la evaluación de la producción de biosurfactante se determinó mediante la prueba de dispersión de gota.

Figura 9: Aislamiento microbiano realizado por la técnica de dilución por extinción y estría cruzada a partir del consorcio LCH1, se obtuvieron 4 diferentes morfologías coloniales identificadas como a) 1A, b) 1B, c) 1C y d) 1D.

Figura 10. Aislamiento microbiano realizado por la técnica de dilución por extinción y estría cruzada a partir del consorcio LCH3, se obtuvieron 3 diferentes morfologías coloniales identificadas como a) 3A, b) 3B y c) 3C.

Figura 11. Morfología microscópica de los aislados obtenidos a partir del consorcio LCH1 a) 1A, b) 1B, c) 1C y d) 1D, se observa que todos son bacilos Gram negativos.

Figura 12. Morfología microscópica de los aislados obtenidos a partir del consorcio LCH3 a) 3A, b) 3B y c) 3C, se observa que todos son bacilos Gram negativos.

Figura 13. Micrografías electrónicas obtenidas a partir del consorcio LCH1C, en donde se observan bacilos de aproximadamente 1 μm de largo, además se tiene presencia de material extracelular que pudiera ser biosurfactante o lipopolisacárido.

Figura 14. Micrografías electrónicas obtenidas a partir del consorcio LCH3A, en donde se observan bacilos de aproximadamente 1 μm de largo, además se tiene presencia de material extracelular que pudiera ser biosurfactante o lipopolisacárido.

Figura 15. Micrografías electrónicas de las cepas aisladas a partir del consorcio LCH1C, a) 1A, b) 1B, c) 1C y d) 1D en donde se observan bacilos de aproximadamente 1 μm de largo.

Figura 16. Micrografías electrónicas de las cepas aisladas a partir del consorcio LCH3A, a) 3A, b) 3B y c) 3C en donde se observan bacilos de aproximadamente 1 μm de largo,

Figura 17. Secuencia obtenida tras la amplificación de parcial del gen 16S RNAr de la cepa 1A.

Figura 18. Secuencia obtenida tras la amplificación de parte del gen 16S RNAr de la cepa 1B.

Figura 19. Secuencia obtenida tras la amplificación de parte del gen 16S RNAr de la cepa 1C.

Figura 20. Secuencia obtenida tras la amplificación de parte del gen 16S RNAr de la cepa 1D.

Figura 21. Secuencia obtenida tras la amplificación de parte del gen 16S RNAr de la cepa 3A.

Figura 22. Secuencia obtenida tras la amplificación de parte del gen 16S RNAr de la cepa 3B.

Figura 23. Secuencia obtenida tras la amplificación de parte del gen 16S RNAr de la cepa 3C.

Figura 24. Observación del crecimiento microbiano de las cepas sembradas por separado en medio de cultivo PPGAS modificado, en los matraces se presenta turbidez del medio de cultivo y formación de espuma que un indicador no específico de la producción de biosurfactante. a) Blanco, b) Medio de cultivo inoculado con las cepas 1A, 1B, 1C y 1D y c) Medio de cultivo inoculado con las cepas 3A, 3B y 3C.

Figura 25. Cinética de crecimiento microbiano y producción de biosurfactante de la cepa 1B en medio de cultivo C. El crecimiento microbiano se monitoreo cada 2 h mediante la lectura de la absorbancia del cultivo a 625 nm y la evaluación de la producción de biosurfactante se determinó mediante la prueba de dispersión de gota. La fase lag se presenta durante 4 h, posterior a esta continúa la fase log hasta las 24 h con ya un incremento considerable de la producción de biosurfactante, el cual alcanza un máximo en la fase estacionaria a las 36 h.

Figura 26. Prueba de dispersión de gota realizada durante la cinética de crecimiento y producción de biosurfactante con el aislado 1B en medio de cultivo PPGAS, se tienen incrementos en el diámetro del halo de emulsión desde las 12 h de inoculación.

Figura 27. Gráficos obtenidos para determinar que el biosurfactante producido por la cepa 1B presenta una CMC de 1112.5 mg/L. a) Gráfico de concentración de biosurfactante en relación a la tensión superficial, b) Gráfico de concentración contra primera derivada de la tensión superficial y c) Gráfico de concentración en relación a la segunda derivada de la tensión superficial y cálculo de la CMC.

Figura 28. Curva de calibración de absorbancia a 396 nm en relación a la concentración de ramnosa en g/L, en ésta se obtuvo un valor de R cuadrado de 0.971.

Figura 29. Espectro de infrarrojo obtenido a partir del extracto crudo de biosurfactante producido por la cepa 1B de *Pseudomonas aeruginosa*.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los surfactantes de acuerdo con sus características iónicas, se dividen en aniónicos, catiónicos, no iónicos y zwitteriónicos.

Tabla 2. Clasificación general de los surfactantes de acuerdo con su grupo hidrofílico.

Tabla 3. Principales tipos de biosurfactantes producidos por microorganismos de importancia en la industria petrolera, además se enlista el rango al cual disminuyen la tensión superficial del agua, el valor de la CMC y valor de tensión interfacial.

Tabla 4. Clasificación y efectos de los procesos empleados en recuperación mejorada de hidrocarburo.

Tabla 5. Principales campos de la región norte activo Aceite Tercero del Golfo, de acuerdo con el volumen de reservas probadas y factores de recuperación de hidrocarburo.

Tabla 6. Composición del medio de cultivo A empleado para la selección de consorcios bacterianos productores de biosurfactante a partir de muestra obtenidas del campo Chicontepec.

Tabla 7. Composición del medio de cultivo B empleado para la selección de consorcios bacterianos productores de biosurfactante a partir de muestras obtenidas del campo Chicontepec.

Tabla 8. Composición del medio de cultivo C empleado para la selección de consorcios bacterianos productores de biosurfactante a partir de muestra obtenidas del campo Chicontepec.

Tabla 9. Serie de reacciones realizadas durante el proceso de identificación molecular mediante PCR.

Tabla 10. Condiciones y número de ciclos efectuados durante el proceso de amplificación de PCR.

Tabla 11. Composición del medio líquido PPGAS modificado con la adición de melaza, para la selección de aislados productores de biosurfactante y realización de la cinética de crecimiento y producción.

Tabla 12. Resultados de las pruebas preliminares de selección de consorcios productores de biosurfactante mediante la inoculación de las muestras LCH1, LCH2 y LCH3 en los medios de cultivo A, B y C a una temperatura de incubación de 30°C. No se obtuvieron consorcios productores de biosurfactante.

Tabla 13. Resultados de las pruebas preliminares de selección de consorcios productores de biosurfactante mediante la inoculación de las muestras LCH1, LCH2 y LCH3 en los medios de cultivo A, B y C a una temperatura de incubación de 40°C. Se seleccionaron cinco consorcios productores de acuerdo al halo de emulsión producido en la prueba de dispersión de gota.

Tabla 14. Resultados de las pruebas preliminares de selección de consorcios productores de biosurfactante mediante la inoculación de las muestras LCH1, LCH2 y LCH3 en los medios de cultivo A, B y C a una temperatura de incubación de 60°C. No se obtuvieron consorcios productores de biosurfactante.

Tabla 15. Comportamiento de la producción de biosurfactante del consorcio LCH1 en medio de cultivo C al variar la concentración de melaza de 15 y 30 g/L, sin embargo, en ninguna de las concentraciones de melaza evaluadas se repitió la producción de biosurfactante en comparación de las pruebas preliminares de selección de consorcios.

Tabla 16. Caracterización bioquímica empleando los kits API 20 NE Biomérieux de los aislados microbianos 1A, 1B, 1C y 1D obtenidos mediante la técnica de estría cruzada a partir del consorcio LCH1.

Tabla 17. Caracterización bioquímica empleando los kits API 20 NE Biomérieux de los aislados microbianos 3A, 3B y 3C obtenidos mediante la técnica de estría cruzada a partir del consorcio LCH3.

Tabla 18. Resultados obtenidos mediante identificación molecular de las cepas productoras de biosurfactante, todas pertenecen al género *Pseudomonas aeruginosa*, con un porcentaje de similitud de entre 98 a 99.

Tabla 19. Resultados obtenidos en el BLAST en la secuencia de nucleótidos correspondientes a la cepa 1A.

Tabla 20. Resultados obtenidos en el BLAST en la secuencia de nucleótidos correspondientes a la cepa 1B.

Tabla 21. Resultados obtenidos en el BLAST en la secuencia de nucleótidos correspondientes a la cepa 1C.

Tabla 22. Resultados obtenidos en el BLAST en la secuencia de nucleótidos correspondientes a la cepa 1D.

Tabla 23. Resultados obtenidos en el BLAST en la secuencia de nucleótidos correspondientes a la cepa 3A.

Tabla 24. Resultados obtenidos en el BLAST en la secuencia de nucleótidos correspondientes a la cepa 3B.

Tabla 25. Resultados obtenidos en el BLAST en la secuencia de nucleótidos correspondientes a la cepa 3C.

Tabla 26. Pruebas preliminares de producción de biosurfactante efectuadas para los aislados 1A, 1B, 1C, 1D, 3A, 3B y 3C en medio de cultivo PPGAS modificado. Solamente la cepa 3B no es capaz de producir biosurfactante a las 24 y 48 h de incubación.

Tabla 27. Determinación de la tensión superficial durante la cinética de crecimiento de la cepa 1B en medio de cultivo PPGAS, donde se presenta una disminución de este valor después de las 24 h de incubación y se mantiene a las 48 h, correspondiendo a un 33.3 % de disminución en relación al testigo negativo.

Tabla 28. Resultados de la prueba de estabilidad térmica del biosurfactante producido por la cepa 1B en un rango de 50 a 121°C.

Tabla 29. Determinación de la tensión superficial a varias concentraciones de biosurfactante con el fin de obtener la CMC.

Tabla 30. Absorbancias obtenidas a 396 nm del biosurfactante parcialmente purificado digerido mediante el método de Dische al Shettles (1948) para determinar indirectamente la concentración de biosurfactante de tipo ramnolípido.

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ATCC: American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)
ATG: Aceite Terceario del Golfo
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta Básica de Búsqueda Local de Alineamientos)
cm: Centímetros
CMC: Concentración Micelar Critica
CTAB: Cetil Trimetil Amonio
DNA: Desoxiribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucleico)
DNAr: Ribosomal Desoxiribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucleico Ribosomal)
EDTA: Etilen Diamino Tetracético
EOR: Enhanced Oil Recovery (Recuperación Mejorada de Hidrocarburo)
g : Gramos
h: Horas
IR: Infrarrojo
Kg: Kilogramos
L: Litros
LIA: Lysine Iron Agar (Agar hierro lisina)
Lb: Libras
MEOR: Microbial Enhanced Oil Recovery (Recuperación Mejorada de Hidrocarburo Vía Microbiana)
MIO: Movilidad, Indol y Ornitina
mg: Miligramos
 μM : Micromoles
 m^3 : Metros cúbicos
min: Minutos
mm: Milímetros
mmbpce: Miles de millones de barriles de petróleo crudo equivalente
mL: Mililitro
 μL : Microlitros
nm: Nanometros
PBS: Buffer de fosfatos
pb: Pares de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

PEMEX: Petróleos Mexicanos

pH: Potencial de hidrógeno

RM-VP: Rojo de Metilo-Voges-Proskauer

RNAr: Ribosomal Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico Ribosomal)

rpm: Revoluciones por minuto

TAE: Tris-acetato EDTA

TSI: Triple Sugar Iron (Agar hierro triple azúcar)

U: Unidades

UAM: Universidad Autónoma Metropolitana

% : Por ciento

°C: Grados centígrados

INTRODUCCI ON

Hist3ricamente la industria del petr3leo ha utilizado procesos mec3nicos y qu3micos para combatir los problemas de producci3n y recuperaci3n de crudo y gas. Principalmente se emplean tres mecanismos b3sicos llamados: Primario, Secundario y Terciario; las cuales aumentan el rendimiento final pero elevan los costos de producci3n. La etapa de extracci3n primaria es la m3s econ3mica y se realiza aprovechando la presi3n natural del reservorio, durante la vida productiva del yacimiento la presi3n descender3 y entonces es donde se requiere hacer la recuperaci3n secundaria, que es la inyecci3n de gas, agua o vapor para compensar la p3rdida de presi3n para extraer parte del hidrocarburo residual atrapado dentro de los poros de las rocas. Aunque esta segunda extracci3n aumenta la recuperaci3n del hidrocarburo residual, queda una remanencia del mismo de alrededor del 60%. Existe entonces, una tercera etapa de extracci3n, denominada Recuperaci3n Mejorada de Hidrocarburo o EOR por sus siglas en ingl3s, Enhanced Oil Recovery. Esta t3cnica utiliza distintos m3todos para aumentar la presi3n en el reservorio y/o disminuir la viscosidad del hidrocarburo con base en la inyecci3n de qu3micos como pol3meros, surfactantes, t3rmicos (estimulaci3n con vapor y combusti3n en sitio), miscibles (hidrocarburos solventes) (Pel3ez, 2009). Dentro de este tipo de t3cnicas, se encuentra la Recuperaci3n Mejorada V3a Microbiana, denominada MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery) (Raiger y L3pez., 2009).

Las tecnolog3as de MEOR (Microbial enhanced oil recovery) utiliza microorganismos aut3ctonos y/o sus metabolitos para incrementar la recuperaci3n de hidrocarburo. Existen tres mecanismos por los cuales los microorganismos pueden contribuir al incremento en la recuperaci3n del hidrocarburo: a) microorganismos pueden producir biosurfactantes y pol3meros en la superficie celular, b) los microorganismos son capaces de producir 3cido y gases para recuperar el hidrocarburo atrapado y c) los microorganismos pueden taponear selectivamente los canales altamente permeables dentro del reservorio (Salehizadeh *et al.*, 2009).

En M3xico existen yacimientos agotados, donde la recuperaci3n de crudo residual por m3todos convencionales es incosteable. El declive de nuestras reservas, condiciones climatol3gicas adversas y la baja probabilidad de encontrar nuevos campos, son circunstancias oportunas para implementar nuevas tecnolog3as en la industria del

petróleo. Para ello se propone conocer y utilizar selectivamente a diversos microorganismos autóctonos productores de biosurfactantes que favorezcan las condiciones del crudo o bien de la roca permitiendo llevar a cabo una extracción económica y eficiente. Una vez identificados los cultivos o microorganismos productores de biosurfactantes, se debe explorar la factibilidad de producirlos ex situ, con la finalidad de aplicarlos directamente en los pozos petroleros. Para realizar esto se necesita conocer las características de los cultivos (cinéticas de crecimiento y producción de metabolitos), así como evaluar diferentes condiciones de cultivo que permitan optimizar su producción.

El objetivo de este proyecto radicó principalmente en el aislamiento y caracterización de bacterias productoras de biosurfactante a partir de muestras de hidrocarburo provenientes de campos petroleros de Chicontepec, así mismo, se realizó una caracterización química parcial del biosurfactante. Esto como parte de las pruebas preliminares ex situ realizadas cuando se desea implementar como alternativa un sistema de MEOR en pozos petroleros.

El diseño experimental involucró:

- Aislamiento de consorcios aerobios a partir de muestras de hidrocarburo.
- Recuperación de cepas capaces de producir biosurfactante en medio de cultivo PPGAS modificado.
- Identificación molecular de dichas cepas por PCR.
- Caracterización morfológica y bioquímica de las cepas productoras de biosurfactante.
- Caracterización y cuantificación parcial mediante espectroscopía de infrarrojo.

Este trabajo está organizado en cuatro capítulos, en el capítulo 1 se presenta las características generales de surfactantes químicos y biosurfactantes, en el capítulo 2 se enmarcan los diferentes procesos de Recuperación Mejorada de Hidrocarburo, haciendo hincapié en la que nos concierne en particular que es la realizada a través de microorganismos (MEOR). En el capítulo 3 se describen todos los métodos realizados para cumplir con el objetivo planteado y por último en el capítulo 4 se presentan los resultados obtenidos y la discusión de los mismos en base a comparación entre estos y los recabados bibliográficamente.

CAPÍTULO 1. ASPECTOS GENERALES DE SURFACTANTES Y BIOSURFACTANTES

1.1. SURFACTANTES

Los surfactantes son moléculas alifáticas con un grupo hidrofílico e hidrofóbico, esta característica les permite reducir la tensión superficial y la tensión interfacial y formar microemulsiones donde el hidrocarburo puede solubilizarse en el agua o bien, el agua puede solubilizarse dentro del hidrocarburo.

Estas características le confieren que actúen como excelentes detergentes, emulsificantes, espumantes y dispersantes (Desai *et al.*, 1997), empleados ampliamente dentro de la industria cosmética, farmacéutica, alimenticia y petrolera (Mohammad *et al.*, 2008).

1.1.1. CLASIFICACIÓN DE SURFACTANTES

Los surfactantes son clasificados de acuerdo con su carga iónica en catiónicos, aniónicos, no iónicos y zwitteriónicos y se encuentran caracterizados por su balance hidrofílico-lipofílico (HLB), los compuestos solubles en agua presentan un alto HLB, mientras los compuestos solubles en aceite presentan un bajo HLB. Algunos ejemplos de surfactantes aniónicos, catiónicos, no iónicos y Zwitteriónicos se mencionan en la tabla 1.

El grupo hidrofílico puede ser iónico o altamente polar, de tal manera que éste pueda actuar como funcionalidad de la solubilización en solventes polares. Los principales grupos hidrofílicos que se encuentran en los surfactantes se mencionan en la tabla 2.

Tabla 1. Clasificación de surfactantes (Schramm, 2000).

Clase	Ejemplo	Estructura
Aniónico	Estereato de sodio	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}^-\text{Na}^+$
	Dodecil sulfato de sodio	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^-\text{Na}^+$
	Dodecil vencion sulfonato de sodio	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3^-\text{Na}^+$
Catiónicos	Laurilamina hidrociorada	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$
	Cloruro de trimetil dodecil amonio	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$
	Bromuro de trimetil cetil amonio	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$
No iónicos	Alcohol polioxietileno	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{OH}$
	Alquilfenol etoxilato	$\text{C}_9\text{H}_{19}-\text{C}_6\text{H}_4^-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$
Zwitteriónicos	Dodecil betaino	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{COO}^-$
	Cocoamino-2-hidroxi-propil-sulfobetaino	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{SO}_3^-$

Tabla 2. Grupos hidrofílicos más comunes en los surfactantes (Sustersick, 2004)

Nombre	Grupo hidrofílico
Sulfonato	$R-SO_3^-M^+$
Sulfato	$R-OSO_3^-M^+$
Carboxilato	$R-COO^-M^+$
Fosfato	$R-OPO_3^-M^+$
Amonio	$R_xH_yN^+X^-$ ($x= 1-3, y= 4-x$)
Amonio cuaternario	$R_4N^+X^-$
Betaínas	$RN^+(CH_3)_2CH_2COO^-$
Sulfobetaínas	$RN^+(CH_3)_2CH_2CH_2SO_3^-$
Polioxietileno	$R-OCH_2CH_2(OCH_2CH_2)_nOH$
Polipéptido	$R-NH-CHR-CO-NH-CHR'-CO---CO_2H$
Poliol	Sorbitan, glicerol ($C_3H_8O_3$), etilenglicol ($C_2H_6O_2$)
Poliglicidil	$OCH_2CH(CH_2OH)CH_2)_n---$ $R-(OCH_2CH(CH_2OH)CH_2OH$

R: Grupo hidrofílico, M: Especie inorgánica, X: Haluro, acetato, etc

SURFACTANTES ANI ONICOS

Los surfactantes ani onicos presentan grupos polares cargados negativamente como carboxilatos, sulfonatos, sulfatos o fosfatos, unidos a una cadena hidrocarbonada hidrofóbica. Si la cadena de carbonos es muy corta, el surfactante presenta una alta solubilidad en agua y se adsorbe fácilmente a la roca y en caso contrario, cuando la cadena es muy larga el compuesto tendrá baja hidrosolubilidad con mayor capacidad de formación de micelas y podrá emplearse en sistemas no acuosos como aceites lubricantes. Las sales de sodio y potasio de ácido grasos de cadena recta de menos de 10 átomos de carbono son muy solubles para actividad superficial, pero con más de 20 átomos de carbono son insolubles para utilizarse en medio acuoso.

Los derivados de los alquilbencensulfonatos lineales son un tipo especial de surfactantes que presentan una distribución de anillos bencénicos al azar a lo largo de una cadena lineal: La longitud de la cadena de la mayoría de los compuestos es de 12 átomos de carbono. Son solubles en agua y se ionizan completamente, la solubilidad no se ve afectada por el pH o por la dureza del agua. Son resistentes a la hidrólisis en ácidos y álcalis calientes. Sus sales de sodio no son solubles en disolventes orgánicos excepto los alcoholes.

Los sulfonatos de α -olefinas se producen por la reacci3n de SO_3 con α -olefinas lineales. Estos surfactantes presentan mayor biodegradabilidad que aquellos que son derivados del benceno.

El 3ter sulfosuccinato es soluble en disolventes org3nicos, se puede utilizar en sistemas donde la cantidad de electrolitos es m3nima o nula. Una desventaja es que se hidroliza por soluciones alcalinas y 3cidas calientes, perdiendo sus facultades de disminuir la tensi3n superficial y por lo tanto su efectividad (Sustersick, 2004).

SURFACTANTES CATIONICOS

Los surfactantes cati3nicos com3nmente utilizados en detergentes, agentes limpiadores y cosm3ticos est3n compuestos por una mol3cula lipof3lica y otra hidrof3lica que contiene una carga positiva compuesta generalmente de grupos amonio terciario o cuaternario. Las sales de cadenas larga que contienen un grupo de amonio de tipo terciario, obtenidas por neutralizaci3n de las aminas con 3cidos org3nicos o inorg3nicos, son utilizadas principalmente en el tratamiento de textiles y ocasionalmente como suavizantes.

Estos surfactantes que contienen un grupo con carga positiva son compatibles con los no i3nicos y zwitteri3nicos, muchos de estos compuestos no son compatibles con surfactantes ani3nicos.

Las aminas de cadena larga y sus sales se adsorben sobre la mayor3a de superficies, son muy solubles y estables en condiciones 3cidas. Act3an como agentes emulsificantes a pH arriba de 7 y se utilizan tambi3n como inhibidores de corrosi3n en superficies met3licas. Para las aminas de cadena larga polioxietilenados no se requiere de una soluci3n 3cida para solubilizarse en agua. Las sales de bajo peso molecular son solubles en agua mientras que las de alto peso molecular son solubles en aceite. Estos compuestos muestran solubilidad inversa en agua caliente.

El derivado del 3xido de amina generalmente es el 3xido de la N-aquildimetilamina. Este compuesto forma sales con aniones los cual lo convierte en una especie m3s activa que el ani3nicos o el 3xido de amina (Sustersick, 2004).

SURFACTANTES NO I ONICOS

En contraste a sus contrapartes i onicas, los surfactantes no i onicos no se disocian en iones hidratados en medios acuosos debido a que no presentan cargas el ectricas en sus grupos hidrof ilicos. Las propiedades hidrof ilicas son provistas por hidrataci on de grupos polares como pueden ser los amido, amino, eter o hidroxilo que pueden formar puentes de hidrogeno con la mol ecula de agua y dependiendo la cantidad y tipo de estos grupos, el surfactante podra ser soluble en agua o en aceite (cuantificada en la practica mediante el indice HLB, o balance hidrof ilico - lipof ilico).

Estos compuestos son compatibles con todo tipo de surfactantes. Son materiales activos 100 % libres de electrolitos. Al no presentar carga el ectrica, pueden ser resistentes a aguas duras, a cationes met alicos polivalentes, a concentraciones altas de electrolitos. Son solubles en solventes org anicos y agua, incluyendo hidrocarburos.

Los compuestos alquifenoles polioxietilenados son derivados principalmente del disobutileno, del trimero de propileno o tetramero de propileno. La longitud del grupo alquilado sobre el fenol o del polioxietileno puede variar, lo cual da como resultado un amplio rango de productos que varian de solubilidad. Una desventaja es que son mas resistentes a la biodegradaci on que otros tipos de surfactantes no i onicos. Los alcoholes de cadena lineal y los alcoholes etoxilados son compuestos facilmente biodegradables, son mas resistentes a la hidrolisis en soluciones alcalinas calientes y son mas solubles que los correspondientes etoxilados de los acidos grasos. Los mercaptanos polioxietilenados son inestables en agentes oxidantes, tal como cloruros, hipocloritos, peroxidos y acidos fuertes, pero son estables en alcalis calientes (Sustersick, 2004).

SURFACTANTES ZWITTERI ONICOS

Los surfactantes zwitteri onicos son aquellos en donde la mol ecula puede contener ambas cargas, positiva y negativa. Estos surfactantes pueden mostrar sensibilidad a los cambios de pH, los cuales pueden comportarse como aniones a pH alcalinos y cationicas a pH acido. En el pH muy cercano de su punto isoel ectrico existen principalmente como zwitteri onicos y muestran minima solubilidad en agua y son menos espumantes y presentan poca detergencia.

Uno de los compuestos zwitteriónicos que es sensible al pH es el ácido de la β -N-alquilaminopropiónico. Su punto isoeléctrico es a un pH aproximado de 4. Es muy soluble en soluciones acuosas de ácidos y bases fuertes. Estos derivados pueden solubilizar a compuestos orgánicos e inorgánicos. Sin embargo su solubilidad es baja en disolventes orgánicos, incluyendo el etanol.

Las N-alquilbetainas son otro tipo de surfactantes zwitteriónicos que son sensibles al pH, son compatibles con toda clase de surfactantes. En soluciones acuosas y neutras son compatibles con los alcalinotérreos y otros iones metálicos (Al^{+++} , Cr^{+++} , Cu^{++} , etc) y a pHs bajos forman precipitados con los surfactantes aniónicos (Sustersick, 2004).

1.1.2. FORMACIÓN DE MICELAS EN SOLUCIONES ACUOSAS CONTENIENDO SURFACTANTES

En soluciones acuosas, los surfactantes forman agregados de moléculas denominadas micelas, en donde la parte hidrofóbica del surfactante se oculta del entorno acuoso, mientras que la parte hidrofílica queda expuesta a la fase acuosa. La formación de micelas en soluciones acuosas se da como resultado de la tendencia de las cadenas alquílicas para evitar el contacto desfavorable con el agua y la capacidad de la parte polar para mantener contacto con el ambiente acuoso.

Una descripción termodinámica del proceso de formación de micelas incluye la contribución del efecto electrostático e hidrofóbico sobre la energía de Gibbs del sistema. El agua y los hidrocarburos no son miscibles; el límite de solubilidad de las especies hidrofóbicas en el agua puede atribuirse al efecto hidrofóbico. La energía de Gibbs puede definirse como la diferencia entre el potencial químico del soluto hidrocarburo en agua y como hidrocarburo solvente en una dilución infinita (ecuación 1.1).

$$\Delta G_t^\circ = \mu_{HC}^\circ - \mu_{aq}^\circ \quad (1.1)$$

Donde, μ_{HC}° y μ_{aq}° son los potenciales químicos del hidrocarburo disuelto en hidrocarburo solvente y en agua, respectivamente, y ΔG_t° es la energía de Gibbs para el proceso de transferencia de hidrocarburo soluto del hidrocarburo solvente al agua. En una

serie homologa de hidrocarburos (ej. n-alcanos o n-alquenos), el valor de ΔG_t° generalmente se incrementa de acuerdo con la ecuaci3n 1.2.

$$\Delta G_t^\circ = (a - bn_c)RT \quad (1.2)$$

Donde a y b son constantes para una particular serie de hidrocarburos y n_c es el n3mero de 3tomos de carbono en la cadena. La energ3a de Gibbs, ΔG_t° , puede dividirse en las contribuciones entr3picas y ent3lpicas (ecuaci3n 1.3) (Schramm, 2000).

$$\Delta G_t^\circ = \Delta H_t^\circ - T\Delta S_t^\circ \quad (1.3)$$

Donde ΔH_t° y ΔS_t° son la entalpia y la entrop3a de transferencia, respectivamente. Como en todo proceso qu3mico para que el fen3meno se produzca de forma espont3nea la variaci3n de la energ3a libre de Gibbs debe de ser negativa; es decir: el balance entre las contribuciones ent3lpica y entr3pica deber3 ser favorable. La primera de ellas est3 relacionada con la energ3a de las interacciones puestas en juego en el proceso (fundamentalmente intermoleculares), mientras que la segunda lo est3 con los par3metros estad3sticos relacionados a su vez con el grado de orden existente en el sistema (n3mero de microestados posibles asociados a una determinada energ3a). Cuando se analizan disoluciones, el balance de ambas contribuciones lleva, frecuentemente, a la dispersi3n molecular del soluto en el seno del disolvente, pero en otras esto no es posible. En tales casos el compuesto sufrir3 fen3menos de asociaci3n, que pueden acabar en una precipitaci3n dependiendo de las condiciones existentes. Sin embargo, cuando la estructura qu3mica del soluto es apropiada (posee dos partes con comportamientos qu3micos bien distintos) y el l3quido dispersante es buen disolvente para una de las partes y malo para la otra, se pueden formar micelas gracias a la tendencia a la precipitaci3n de una de las partes de la mol3cula frente a la tendencia a la disoluci3n de la otra. Si ambas partes pertenecieran a diferentes mol3culas, se producir3a una precipitaci3n de los componentes no solubles, quedando los solubles disueltos de forma normal. Sin embargo, la existencia de esa fuerte uni3n entre ambas (enlaces qu3micos) impide que se produzca la separaci3n o precipitaci3n selectiva. Como las interacciones de la parte no soluble con el disolvente presentan un balance energ3tico desfavorable, el sistema tender3 a una reorganizaci3n de las mol3culas del medio. Esta reorganizaci3n consistir3 en la uni3n de

las partes no solubles entre sí con lo que se evitan los contactos de esa parte con el disolvente y se reduce la componente desfavorable de la energía quedando alrededor de esta zona otra formada por la parte soluble. La corteza quedará en contacto con el disolvente, lo que propicia dos efectos: la protección del núcleo interior frente al disolvente y el aumento en las interacciones de la parte soluble con el disolvente, acompañados por un desprendimiento de energía. El resultado final es la dispersión del compuesto en el disolvente, pero no en partículas monomoleculares y por tanto, en realidad no se trata de una verdadera disolución sino más bien de una dispersión de propiedades especiales. Por lo tanto, el fenómeno se produce como resultado de dos fuerzas opuestas; una de ellas atractiva (entálpica) dirigida hacia la asociación de micelas y otra repulsiva (entrópica) que previene el crecimiento de ellas hasta una fase macroscópica (Katime *et al.*, 2003).

1.1.3. USO DE SURFACTANTES EN LA INDUSTRIA PETRÓLERA

La industria petrolera, el uso de biosurfactantes ha tomado grandes consideraciones en los procesos de perforación, producción y refinación del petróleo, debido a que esta industria debe enfrentar problemas provocados por los fenómenos interfaciales desde las operaciones de perforación hasta la obtención de los productos acabados.

Una aplicación importante de los surfactantes es la producción de emulsiones estables de crudos pesados en agua (tipo O/W, oil-in-water) con propósitos de extracción, transporte y almacenamiento del crudo. La formación de este tipo de emulsiones para reducir la viscosidad de crudos pesados es una alternativa a métodos convencionales tales como el calentamiento o la dilución con crudos livianos o gasóleos, los cuales implican enormes costos de inversión y de funcionamiento. Sin embargo, hay que tener en cuenta el grado de emulsión que pudiese formar el biosurfactante, ya que en algunas ocasiones el producto terminado deberá tener cierto contenido de agua y si se sale del rango establecido por la normatividad, es posible que el producto sea rechazado.

En las últimas décadas se han utilizado surfactantes no-iónicos y aniónicos para emulsionar el crudo en agua. Los surfactantes no-iónicos tienen la ventaja de ser casi insensibles a la salinidad de la fase acuosa, mientras que algunos surfactantes aniónicos tienen la ventaja de reducir más la tensión interfacial crudo/agua, y resultan más

económicos que los surfactantes no-iónicos. En una formulación comercial no sólo está presente el surfactante o una mezcla de estos, sino también otra serie de compuestos, como los co-surfactantes, álcalis o polímeros que pueden modificar las condiciones del sistema. En este sentido, recientemente se ha reportado la influencia de aminas de cadena corta como estabilizantes de emulsiones de crudo en agua (Delgado *et al.*, 2007).

1.2. BIOSURFACTANTES

La enorme demanda del mercado de los surfactantes empleados principalmente en la industria petrolera ha provocado un incremento en la preparación por síntesis de numerosos surfactantes químicos. Los rápidos avances en la biotecnología en cuanto a la producción de metabolitos a gran escala y producción de microorganismos genéticamente modificados, así como el incremento de la necesidad de proteger al medio ambiente, provee un buen futuro para considerar seriamente a los surfactantes biológicos como alternativas debido a su diversidad, naturaleza amigable al ambiente, baja toxicidad y la posibilidad de producción a través de procesos fermentativos de manera *ex situ* e *in situ* y su aplicación potencial en el cuidado a la salud, industria alimenticia y en la industria petrolera (Tugrul *et al.*, 2005).

Un importante mercado de empleo de los biosurfactantes se encuentra en la polimerización y emulsión de pinturas. Al igual, se emplean ampliamente en la formulación de asfaltos, cementos, textiles y manufacturación de fibras, adicionalmente en el tratamiento de metales, minería, tratamientos de agua. Pueden ser utilizados en la industria de los alimentos, los cosméticos y como productos de limpieza. En agricultura como diluyentes y dispersantes de fertilizantes y pesticidas (Sulbarán *et al.*; 2005).

Entre algunas aplicaciones relacionadas con la industria petrolera están los procesos de biorremediación de suelo o agua contaminada y dispersión de derrames petroleros, remoción y movilización de petróleo adherido al interior de tanques, dispersión de asfaltenos, transporte de hidrocarburo, limpieza interior de ductos transportadores de hidrocarburo y recuperación mejorada del petróleo.

Los biosurfactantes son producidos por diferentes grupos de microorganismos, estos compuestos generalmente son metabolitos secundarios excretados por los

microorganismos durante la fase estacionaria de crecimiento (Sulbarán *et al.*, 2005) y presentan una alta actividad de superficie y propiedades emulsificantes, su principal papel fisiológico es el de incrementar la biodisponibilidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos con el fin de permitir su biodegradación y reducir la tensión interfacial (Bagheri *et al.*, 2009).

Los microorganismos son capaces de producir una gran variedad de metabolitos con excelentes propiedades tensoactivas, sin embargo, su uso y aplicación se ha visto mermada por el costo de producción y purificación, en comparación con la correspondiente síntesis química de surfactantes (Araujo *et al.*, 2007). El costo en la producción de biosurfactante puede ser reducido por optimización en la composición del medio de cultivo de producción, utilizando sustratos económicos o a través del diseño y operación de biorreactores (Amani *et al.*, 2009). La calidad y estructura química de los biosurfactantes dependen de las condiciones de cultivo, como son fuente de carbono y nitrógeno, elementos traza, temperatura, oxígeno y pH que promueven cambios en la estructura química de la molécula, y consecuentemente, alteran sus características fisicoquímicas (Fonseca *et al.*, 2007).

1.2.1. TIPOS DE BIOSURFACTANTES

Como ya se considero con anterioridad, los surfactantes sintetizados químicamente se clasifican de acuerdo con su grupo polar, en contraste con los biosurfactantes que se catalogan considerando su composición química y a su origen microbiano. En general, su estructura incluye un grupo hidrofílico consistente de aminoácidos o péptidos aniónicos o catiónicos; mono-, di-, o polisacáridos; y un grupo hidrofóbico consistente de un ácido graso saturado o insaturado. La mayor clase de biosurfactantes incluyen glicolípidos, lipopéptidos y lipoproteínas, fosfolípidos y ácidos grasos (Desai *et al.*, 1997). En la tabla 3 se presenta un concentrado de los diferentes tipos de biosurfactantes y los principales microorganismos que los producen.

GLICOLÍPIDOS

Consisten de un mono-, di-, tri- y tetrasacáridos que incluyen la glucosa, manosa, galactosa, ácido glucurónico, ramnosa y sulfato de galactosa combinados con una cadena

alifática o ácidos hidroxialifáticos. Los glicolípidos más conocidos son los ramnolípidos, trehalípidos y soforolípidos (Desai *et al.*, 1997).

Ramnolípidos. Están constituidos por una o dos moléculas de ramnosa unidas a una o dos moléculas de ácido β -hidroxidecanoico. La producción de ramnolípidos ha sido descrita en cultivos de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis* y *Burkholderia sp* (Suwansukho *et al.*, 2008) con una disminución de la tensión interfacial a 1mN/m y tensión superficial de 25 a 30 mN/m en n-hexano. Los surfactantes L-Ramnosil-L-Ramnosil- β -hidroxidecanol- β -hidroxidecanoato y L-Ramnosil- β -hidroxidecanol- β -hidroxidecanoato, ramnolípidos 1 y 2 respectivamente, son los principales tipos de glicolípidos producidos por *P. aeruginosa* (Desai *et al.*, 1997).

La producción de ramnolípidos promueve la adhesión de células microbianas al hidrocarburo debido a una reducción en la tensión superficial, permitiendo una mayor biodisponibilidad de los nutrientes para ser metabolizados (Ali Raza *et al.*, 2006). Mediante cromatografía de líquidos acoplada con espectroscopia de masas se detectó la producción de 28 diferentes tipos de ramnolípidos, variando únicamente en la longitud de la cadena de ácidos grasos de C₈ a C₁₂ y en la posición y cantidad de insaturación (Soberón *et al.*, 2005).

Trehalolípidos. Están compuestos por el disacárido trehalosa unido al carbono C-6 y C-6' del ácido micólico, este tipo de biosurfactante generalmente se encuentra asociado a la mayoría de las especies de *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Corynebacterium* (Desai *et al.*, 1997). El ácido micólico está compuesto de una cadena larga de ácidos grasos α -ramificado- β hidroxil. Los trehalípidos producidos por diferentes microorganismos varían únicamente en el tamaño y estructura del ácido micólico, el número de átomos de carbono y el grado de insaturación (Rahman *et al.*, 2008).

Sophorolípidos. Están constituidos del carbohidrato dimérico Soforosa unido a una cadena larga hidrofóbica de ácidos grasos de 16 a 18 átomos de carbono con una o más insaturaciones. Estos biosurfactantes son una mezcla de al menos 6 a 9 diferentes soforosidos (Desai *et al.*, 1997). La soforosa es un disacárido de glucosa con una unión inusual β -1,2 acetilada en la posición 6'-y/o 6". El grupo carboxílico terminal del ácido

graso puede estar libre (ácida) o internamente esterificado en la posición 4' o en algunos casos en las posiciones 6- ó 6'-(lactónicos).

Los soforolípidos lactónicos y ácidos disminuyen la tensión interfacial entre la mezcla n-hexadecano y agua de 40 a 5 mN/m con una CMC de 40 a 100 mg/L y muestran gran estabilidad durante cambios significativos de pH y temperatura.

Los soforolípidos son sintetizados en altas concentraciones por levaduras no patógenas como son *Torulopsis magnoliae*, *Torulopsis bombicola*, *Torulopsis petrophilum*, *Candida apicola* y *Candida bogoriensis* (en contraste con los ramnolípidos, que son producidos mayormente por cepas bacterianas pertenecientes al género *Pseudomonas*). (Van Bogaert *et al.*, 2007).

LIPOPÉPTIDOS Y LIPOPROTEÍNAS

Existen una gran variedad de lipopéptidos cíclicos incluyendo decapeptidos (gramicidinas) y lipopéptidos (polimixina) producidos por *Bacillus brevis* y *Bacillus polymyxa* respectivamente, que además de funcionar como antibióticos, poseen actividad surfactante. El tipo de aminoácidos presentes en la molécula del biosurfactante, puede variar dependiendo del género microbiano que los produce, por ejemplo: lípidos conteniendo a la ornitina son producidos por cepas de *Pseudomonas rubescens* y *Thiobacillus thiooxidans*, lípidos conteniendo ornitina y taurina de *Gluconobacter cerinus* y lípidos conteniendo lisina de *Agrobacter tumefaciens* exhiben propiedades biosurfactantes (Desai *et al.*, 1997).

El lipopéptido cíclico denominado surfactina producido por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 es uno de los más poderosos biosurfactantes, el gran interés sobre la surfactina es que presenta un carácter anfífilico, el cual es capaz de reducir la tensión superficial de 72 a 29.7 mN/m a concentraciones de 0.005 % (Mohammad, 2008). *Bacillus licheniformis* produce varios biosurfactantes que actúan sinérgicamente y exhiben excelente estabilidad a rangos amplios de temperatura, pH y salinidad, entre el más estudiado se encuentra la Lichenisina A que reduce la tensión superficial de 72 a 28 mN/m con una Concentración Micelar Crítica de 12 μ M.

ÁCIDOS GRASOS Y LÍPIDOS NEUTROS

Este tipo de biosurfactante es producido por una gran variedad de especies bacterianas y levaduras durante su crecimiento sobre n-alcenos. El balance hidrofílico o lipofílico de los ácidos grasos está relacionado con la longitud de la cadena de hidrocarburo. Los ácidos grasos que disminuyen considerablemente la tensión superficial e interfacial, son aquellos que en su molécula presentan entre 12 y 14 átomos de carbono. La cepa de *Acinetobacter sp* HO1-N forma vesículas ricas en fosfatidiletanolamina, también se ha descrito la producción de fosfolípidos por *Aspergillus sp* y *Thiobacillus thiooxidans*. Tanto *Arthrobacter* cepa AK-19 como *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 acumulan alrededor del 40 a 80% de lípidos cuando son cultivados en hexadecano.

Dentro de este tipo de biosurfactantes, se ha encontrado que la fosfatidiletanolamina producida por *Rhodococcus erythropolis* provoca una disminución en la tensión interfacial entre agua y hexadecano a menos de 1 mN/m y una CMC de 30 mg/l (Desai *et al.*, 1997).

BIOSURFACTANTES POLIMÉRICOS

Dentro de los biosurfactantes poliméricos más conocidos se encuentran el emulsan, liposan, manoproteínas y otros complejos de polisacáridos-proteína. *Acinetobacter calcoaceticum* RAG-1 produce un potente anfifático heterosacárido bioemulsificador denominado emulsan que se caracteriza por tener una alta efectividad a concentraciones entre 0.001 a 0.1 %. La molécula de este biosurfactante está compuesta por un trisacárido de N-acetil-D-galactosamina, ácido urónico N-acetil galactosamina, y un azúcar indefinida unidos a la molécula de ácido graso mediante un enlace covalentemente o-éster. (Rahman *et al.*, 2008).

Otro biosurfactante producido por *Acinetobacter calcoaceticus* A2 es el biodispersan, el cual es un heteropolisacárido aniónico con un peso molecular de 51 400 y contiene 4 azúcares: glucosamina, 6-metilano hexosa, galactosamina, ácido urónico, y un azúcar indefinido.

Candida lipolytica produce un biosurfactante extracelular soluble en agua llamado Liposan, compuesto de 83 % de carbohidratos y 17% de proteínas. La porción de

carbohidratos consistente de glucosa, galactosa, galactosamina, y ácido galacturónico (Desai *et al.*, 1997).

Tabla 3. Fuente microbiana y propiedades de algunos biosurfactantes de importancia en la industria petrolera (Desai *et al.*, 1997)

Biosurfactante	Organismo	Tensión superficial (mN/m)	CMC (mg/L)	Tensión interfacial (mN/m)
Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29	0.1-10	0.25
	<i>Pseudomonas sp</i>	25-30	0.1-10	1
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	32-36	4	14-17
Trehalolípidos	<i>Nocardia erythropolis</i>	30	20	3.5
	<i>Mycobacterium sp</i>	38	0.3	15
	<i>Torulopsis bombicola</i>	33		1.8
Soforolípidos	<i>Torulopsis apicola</i>	30		0.9
	<i>Torulopsis petrophilum</i>			
Lipopéptido	<i>Bacillus licheniformis</i>	27	12-20	0.1-0.3
Serrawetina	<i>Sewanella marcenscens</i>	28-33		
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	26.5	150	
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	27-32	23-160	1
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>			
Ácidos grasos	<i>Corynebacterium lepus</i>	30	150	1
Lípidos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>	32		3
Fosfolípidos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>			
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>			
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>			
Mannan-lípido-proteína	<i>Corynebacterium tropicalis</i>			
Liposan	<i>Corynebacterium lipolytica</i>			
Carbohidrato-proteína-lípido	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	27	10	

1.2.2. FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCI3N DE BIOSURFACTANTES

La viabilidad econ3mica para la producci3n y aplicaci3n de biosurfactante mediante procesos biotecnol3gicos representa un gran reto, sobre todo durante las etapas de bios3ntesis y purificaci3n del producto. Para disminuir el costo en la producci3n en aproximadamente 50% es necesario tomar en cuenta ciertos puntos (Mohammad *et al.*, 2008): a) el uso de sustratos econ3micos o de desecho que disminuyan el costo del proceso, b) Optimizaci3n de las condiciones de cultivo e implementaci3n de procesos de purificaci3n efectivos y rentables y c) desarrollo y uso de cepas sobreproductoras, mutantes o recombinantes, para aumentar los rendimientos. Para llevar a cabo satisfactoriamente cualquiera de los puntos anteriormente descritos, es necesario conocer las cin3ticas y rutas metab3licas de producci3n con base en los microorganismos y los subproductos elegidos.

Algunos elementos traza como el hierro y manganeso, as3 como ciertos precursores presentes en los medios de cultivo pueden influir sobre la eficiencia, propiedades y estructura qu3mica de los biosurfactantes (Jim3nez *et al.*, 2010). Otro ejemplo de la influencia de la fuente de nitr3geno sobre la producci3n de biosurfactante, se encontr3 durante el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* con un incremento en la producci3n del biotensoactivo cuando se limit3 la concentraci3n de nitr3geno en el medio de cultivo. Varios estudios se han enfocado en la estandarizaci3n de medios de cultivo con el fin de incrementar la producci3n, principalmente se ha evaluado el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitr3geno, considerando el tipo y concentraci3n de los mismos (Jim3nez *et al.*, 2010).

Un sin n3mero de factores abioticos afectan la producci3n de biosurfactante, entre los cuales se encuentran los factores ambientales entre los que se encuentran pH, temperatura, presi3n, salinidad, ox3geno disuelto y agitaci3n; y factores nutricionales que involucran concentraci3n y tipo de fuente de carbono y nitr3geno empleada como sustrato, entre otras.

FACTORES AMBIENTALES

La producción de biosurfactantes como muchas otras reacciones químicas, puede verse afectada por varios factores los cuales incrementan o inhiben su producción. Acorde a esto, factores ambientales como pH, salinidad, agitación, oxígeno disuelto y temperatura afectan la producción de biosurfactante (Bagheri *et al.*, 2009).

Robert *et al*, 1989 encontraron que la temperatura óptima para la producción de biosurfactantes es de 37°C para *Pseudomonas aeruginosa* 44T, por otro lado, *Bacillus subtilis* crece y produce surfactina bajo condiciones termofílicas y mesofílicas a 45°C y 30°C respectivamente con una disminución en la tensión superficial de 68 a 32 mN/m.

El tratamiento térmico de algunos biosurfactantes no provoca cambios apreciables en sus propiedades químicas, como son tensión interfacial y superficial y eficiencia de emulsión, estas propiedades permanecen constantes después de esterilizar el biotensoactivo a 120°C durante 15 min.

El pH del medio de cultivo afecta considerablemente la producción de soforolípidos por *Turolopsis bombicola*. Los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas sp* tienen un pH óptimo de producción entre 6 a 6.5 y decaen rápidamente por arriba de 7. La producción del biosurfactante de tipo lipídico por *Nocardia corynbacteroides* no se encuentra afectado en el rango de pH entre 6.5 a 8, esta característica trae grandes ventajas al permanecer estables la tensión superficial y el valor de CMC del biosurfactante sobre un amplio rango de pH.

Un incremento en la velocidad de agitación causa una reducción en la producción de biosurfactante por *Nocardia erythropolis*.

FACTORES NUTRICIONALES

La cantidad de biosurfactante producido por una cepa bacteriana depende en gran medida de ciertos factores nutricionales del medio de cultivo, entre las que se incluyen relación carbono-nitrógeno, catines divalentes, tipo de fuente de carbono disponible y otros nutrientes limitantes.

FUENTE DE CARBONO

El tipo de fuente de carbono utilizado como sustrato influye directamente sobre la calidad y cantidad del biosurfactante (Das *et al.*, 2009). En la mayoría de los casos, la adición de sustratos inmiscibles en agua, como alcanos y algunos otros hidrocarburos, promueven la producción de biosurfactantes, sin embargo, al ser fuentes poco económicas, se ha volcado el interés en utilizar fuentes de carbono miscibles en agua como glicerol, glucosa, manitol, etanol y melazas que presentan similares resultados en cuanto al nivel de producción de biotensoactivos y son mucho más económicos.

Robert *et al.*, (1989), utilizó diferentes fuentes de carbono como glicerol, manitol, aceite de oliva, fructosa, succinato y piruvato para determinar su efecto sobre la producción de biosurfactante por una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* 44T1, la variación en la reducción de la tensión superficial del medio fue de 72 mN/m hasta 30, 28.5, 28.4, 31.7, 29.6 y 32.9 mN/m respectivamente. Otras fuentes de carbono empleadas para la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* han sido aceite de soya, n-hexadecano, aceite de maíz, efluentes de la producción de aceite de girasol y etanol, suero de la industria de queso entre otras (Bodour *et al.*, 2004 y Nitschke *et al.*, 2005).

Javaheri *et al.*, 1985 obtuvieron un biosurfactante capaz de reducir la tensión superficial de 70 a 28 mN/m a partir de una cepas de *Bacillus licheniformis* JF-2 en un medio mineral suplementado con glucosa como fuente de carbono. De la misma manera, utilizando una cepa de *Bacillus subtilis* se produjo surfactina con sacarosa como fuente de carbono. Por otro lado, Mohammad *et al.*, (2008) demostró que la melaza como suplemento del medio de cultivo a una concentración del 16 % era la mejor fuente de carbono para la producción de surfactina por *Bacillus subtilis* y que al utilizar lactosa, galactosa, hexadecano y parafinas se presentó una inhibición del crecimiento microbiano, dando como resultado una disminución en la producción de surfactina.

FUENTE DE NITRÓGENO

Se ha demostrado que algunas cepas de *Arthrobacter paraffineus* producen biosurfactante eficientemente cuando se emplean sales inorgánicas de amonio y urea como fuente de nitrógeno, mientras que otras prefieren la adición aminoácidos como

ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina y glicina al medio de cultivo. En contraste, *Pseudomonas aeruginosa* y *Rhodococcus sp* utilizan preferentemente los nitratos como fuente de nitrógeno para una mayor producción de biosurfactante (Jiménez *et al.*, 2010).

Syldatk *et al.*, 1985 determinaron que la disminución en la concentración de la fuente de nitrógeno en muchos casos, provoca una sobreproducción de biosurfactante y además puede cambiar la composición química de este. Guerra-Santos *et al.*, (1986), observaron una máxima producción de ramnolípidos cuando se empleó una relación C:N en el medio de cultivo de 16:1 y de 18:1 y una depleción en la producción del tensoactivo con una relación de C:N de 11:1.

Para la producción de surfactina por *Bacillus subtilis*, el nitrato de amonio provee la mejor fuente de nitrógeno a una concentración de 0.5-1 g% (Monammad *et al.*, 2008 y Fonseca *et al.*, 2009).

Makkar y Cameotra en 1997 obtuvieron un máximo de lipopéptido a partir de *Bacillus subtilis* después de 72 h de incubación a 45°C con urea y nitratos como fuente de nitrógeno a una concentración de 3 g/L. De igual manera, la producción de biosurfactante de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando diferentes fuentes de nitrógeno (NaNO₃, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄ y NH₄Cl) con concentraciones que varían de 2 a 5 g/L, revelo una disminución satisfactoria en la tensión superficial al utilizar NaNO₃ a una concentración de 2 al 3 g/L (Fonseca *et al.*, 2007).

IONES Y ELEMENTOS TRAZA

Para obtener mayores rendimientos en la producción de ramnolípidos por una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2659, fue necesario limitar la concentración de algunos iones divalentes, como es el caso de Mg²⁺, Ca²⁺, K⁺, Na⁺ y otros elementos traza. Georgiou *et al.*, 1992 encontraron una disminución en la producción de tensoactivo cuando emplearon medios de cultivo con alta fuerza iónica; por ejemplo, altas salinidades pueden inactivar la producción de glicolípidos por *Torulopsis apicola*, sin embargo, también se han obtenido altas concentraciones de liquenisina A por *Bacillus licheniformis* BAS-50, en medios de cultivo con concentraciones mayores al 13% de cloruro de sodio.

El hierro también es un elemento traza cuya concentración influye en la síntesis de biosurfactantes. Se ha reportado un incremento en la producción de biotensoactivos por *Pseudomonas putida* con una relación carbono/hierro (C/Fe mol:mol) igual a 26 000 (Amézcuca *et al.*, 2004).

De esta manera, la naturaleza física del medio afecta la producción de biosurfactante en diferentes maneras en distintos consorcios microbianos. La elección de materiales económicos es importante para mantener la rentabilidad del proceso, ya que es capaz de reducir hasta en un 50 % el costo de la producción final (Bagheri *et al.*, 2009).

1.2.3. VENTAJAS DEL USO DE BIOSURFACTANTES

Los biosurfactantes tienen muchas ventajas sobre los surfactantes químicos (Desai y Banat, 1997), entre ellas están:

- ✓ Biodegradabilidad. Los biosurfactantes son más fáciles de biodegradar.
- ✓ Toxicidad. La toxicidad de los biosurfactantes en general es baja.
- ✓ Biocompatibilidad. Los biosurfactantes tienen la capacidad de actuar con una adecuada respuesta al huésped en una aplicación específica y no ser tóxicos para los organismos incluidos el ser humano. Lo anterior le permite su aplicación en cosméticos, fármacos y como aditivos de alimentos.
- ✓ Disponibilidad de materias primas: los biosurfactantes se pueden producir a partir de materias primas baratas, disponibles en grandes cantidades. La fuente de carbono puede provenir de hidrocarburos, carbohidratos y/o lípidos, que pueden ser usados por separado o en combinación.
- ✓ Control ambiental: los biosurfactantes pueden ser usados eficientemente en el manejo de emulsiones industriales, control de derrames de petróleo, biodegradación y detoxificación de efluentes industriales y en biorremediación de suelos contaminados.
- ✓ Especificidad: los biosurfactantes, siendo moléculas orgánicas complejas con grupos funcionales específicos, son frecuentemente específicos en su actividad (de

particular interés en la eliminación o detoxificación de contaminantes específicos). De-emulsificación de emulsiones industriales, aplicaciones en cosméticos específicos, farmacéuticos y alimentos.

✓ Eficacia: Los biosurfactantes actúan a las temperaturas, pH y concentraciones de sal extremas en las cuales fueron generados por los microorganismos.

CAPÍTULO 2. PROCESOS DE RECUPERACI ON MEJORADA DE HIDROCARBURO VÍA MICROBIANA

2.1. EOR

Durante los pasados 50 años, se han desarrollado una variedad de métodos para recuperaci on mejorada de hidrocarburo (EOR) para ser aplicados a yacimientos maduros y mayormente agotados. Estos métodos mejoran la eficiencia de recuperaci on de hidrocarburo comparados con los métodos de recuperaci on primarios y secundarios (Amarnath, 1999).

Los mecanismos de recuperaci on mejorada de hidrocarburo involucran la inyecci on de alg un fluido (gas, vapor o agua) dentro del yacimiento. La inyecci on de estos fluidos proporciona un suplemento a la energ ía natural presente dentro del yacimiento para poder desplazar el hidrocarburo dentro del pozo. As í tambi én, otro tipo de fluidos interactúan con el sistema roca/hidrocarburo para crear condiciones favorables para la recuperaci on del hidrocarburo. Estas interacciones son atribuibles a mecanismos físicos, químicos o microbiológicos que incluyen la disminuci on de la tensi on superficial, reducci on de la viscosidad, modificaci on de la mojabilidad (Emegwalu, 2009).

De manera general, los mecanismos de EOR pueden clasificarse en cinco categor ías que incluyen química, miscible, microbiana, control de movilidad y procesos térmicos (tabla 4); y se basan principalmente en el incremento del número de capilaridad y/o disminuci on del coeficiente de movilidad, comparados con los valores del agua de inyecci on. El incremento del número de capilaridad significa, la disminuci on de la tensi on interfacial entre el agua de desplazamiento y el hidrocarburo. El coeficiente de movilidad puede alterarse por un incremento en la viscosidad del agua, reducci on de la viscosidad del hidrocarburo, reducci on de la permeabilidad del agua o todos los mecanismos en conjunto (Lake *et al.*, 2008).

Tabla 4. Clasificación y efecto de los diferentes subprocesos, empleados en recuperación mejorada (Lake *et al.*, 2008).

Subproceso	Tipo de fluido	Efecto en mecanismo	% de recuperación alcanzado
Térmico	Vapor	Reduce viscosidad Vaporiza ligeros	5-40 %
	Combustión	Reduce viscosidad Vaporiza ligeros	10-15 %
	Agua caliente	Reduce viscosidad	5-10 %
	Hidrocarburo miscible	Desarrolla miscibilidad Desarrolla miscibilidad	5-10 %
Solvente	CO ₂ miscible	Hinchamiento de aceite	5-10 %
	CO ₂ inmisible	Mejora movilidad, disuelve gas	5-15 %
	N ₂	Mejora movilidad, disuelve gas	5-15 %
	Aire	Mejora movilidad, disuelve gas	5-15 %
	Gas de combustión	Mejora movilidad, disuelve gas	5-15 %
	Polímero	Mejora movilidad	5 %
Químico	Surfactante	Reduce tensión interfacial	15 %
	Álcalis	Mejora movilidad, reduce tensión interfacial, altera mojabilidad	5 %
Microbiológicos	Biosurfactante	Reduce tensión interfacial	7-30 %
	Biopolímeros	Obstrucción del medio poroso, producción de CO ₂ , alcoholes y ácidos	7-30 %

2.1.1. PROCESOS QUÍMICOS

Los procesos químicos de EOR se enfocan en la reducción de la tensión superficial entre el líquido de desplazamiento y el hidrocarburo, incremento del número de capilaridad y efecto sobre el coeficiente de movilidad de las fases (Lake *et al.*, 2008). Este método se basa en la inyección de un aditivo químico (surfactantes o polímeros) que a través de sus características permite el desplazamiento del hidrocarburo dentro del yacimiento (Emegwalu, 2009).

INYECCIÓN DE POLÍMEROS

Este método consiste en la inyección de una fase acuosa (agua o salmuera) en la cual se encuentra disuelto una pequeña cantidad de algún agente polimérico o polisacárido, éste incrementa la viscosidad del agua y en algunos casos disminuye la permeabilidad de la fase por debajo del coeficiente de movilidad y de esta manera se ve incrementado el número de capilaridad (Farouq *et al.*, 1994).

INYECCIÓN DE POLÍMERO MICELAR

El proceso de polímero micelar es similar al proceso de inyección de polímero, sólo que en conjunto se agrega un surfactante. El surfactante reduce la tensión interfacial y superficial entre la fase agua-hidrocarburo ocasionando una disminución en el coeficiente de movilidad y un incremento en el número de capilaridad. Mediante este proceso se recupera alrededor del 15% del original hidrocarburo presente en el yacimiento (Lake *et al.*; 2008).

INYECCIÓN DE SURFACTANTE

Este procedimiento consiste en la inyección de surfactantes dentro del yacimiento con el fin de reducir la tensión interfacial entre el hidrocarburo y el fluido de desplazamiento. Para designar y seleccionar una serie de surfactantes específicos, se requiere que disminuyen la tensión interfacial por debajo de 10^{-3} dinas/cm para obtener una recuperación entre 10 al 20% del hidrocarburo original dentro del yacimiento.

2.1.2. DESPLAZAMIENTO MISCIBLE

El objetivo principal de este proceso es el desplazamiento del hidrocarburo empleando un fluido completamente miscible en el hidrocarburo. Como resultado, la tensión interfacial entre la fase acuosa y el hidrocarburo disminuye.

El fluido de desplazamiento puede ser un solvente orgánico volátil como el propano o algún alcohol que sea miscible en la fase acuosa y en el hidrocarburo (Farouq *et al.*, 1994).

2.1.3 PROCESOS TÉRMICOS

Los procesos térmicos incluyen la reducción en la viscosidad del hidrocarburo para incrementar su flujo a través de pozo de producción. El yacimiento es inyectado con vapor de agua por un periodo corto de tiempo (aproximadamente 1 mes), seguido del cierre del pozo por pocos días para permitir la distribución del vapor. Después de esto, el pozo es reabierto para permitir el flujo del hidrocarburo. La recuperación del hidrocarburo incrementa rápidamente y permanece constante en niveles económicamente rentables por un largo periodo de tiempo. Cuando aumenta la viscosidad del hidrocarburo y la velocidad de producción disminuye, se repite el ciclo completo del proceso (Farouq *et al.*, 1994).

Otro proceso térmico es la combustión in situ, es un proceso donde alrededor del 10 % del hidrocarburo es oxidado para generar calor, para esto, se inyecta aire u oxígeno dentro del yacimiento.

El calor generado mediante este procedimiento se concentra en una estrecha zona de combustión donde la temperatura asciende a alrededor de 600°C, cerca de esta región comienza el rompimiento del hidrocarburo, permitiendo la depositación de la fracción ligera que soporta la combustión (Farouq *et al.*, 1994).

2.1.4. PROCESO DE MOBILIDAD CONTROLADA

En este proceso, se busca la obtención de un coeficiente de movilidad favorable que permita el mejoramiento del volumen de barrido. Esto se realiza mediante el incremento

de la viscosidad del agua mediante la inyección de polímeros y reducción de la movilidad del gas con la adición de espumantes.

2.2. MEOR

Existen diversos procedimientos para el uso de microorganismos dentro de los procesos de recuperación mejorada de hidrocarburo, MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery). El más empleado consiste en la inoculación de microorganismos mediante inyección directa dentro del yacimiento, a los que se agregan nutrientes inorgánicos junto con sustratos que actúan como fuentes de carbono. Este procedimiento se lleva a cabo con la finalidad de promover el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos. El segundo procedimiento consiste en el aislamiento de microorganismos productores de extracelular productos, para posteriormente optimizar su producción mediante condiciones controladas dentro de un laboratorio y finalmente ser inyectados dentro de los yacimientos. Dentro de los estudios de laboratorio empleados se incluyen curva de crecimiento microbiano, cantidad de gas producido y composición, producción de ácidos orgánicos, producción de biosurfactantes, cambios en la composición del hidrocarburo, etc. (Dejun *et al.*, 1999).

El concepto del uso de microorganismos para incrementar la recuperación de hidrocarburo, fue propuesto en 1926 por Beckman, pero fue hasta los años 1950's cuando ZoBell y colaboradores comenzaron a realizar las primeras investigaciones sobre este tema. Desde entonces, se han empleado una variedad de tecnologías microbiológicas en procesos de recuperación mejorada de hidrocarburo.

Los procesos básicos que envuelven los mecanismos de MEOR son:

- a) Limpieza del yacimiento
- b) Bioestimulación del yacimiento

2.2.1. LIMPIEZA DEL YACIMIENTO

En este proceso, los microorganismos mejoran el flujo del hidrocarburo mediante la remoción de depósitos parafínicos e incrustaciones. Este mecanismo está enfocado en la

producci3n de metabolitos microbianos que disuelven o eliminan este tipo de dep3sitos (Maqsood *et al.*, 2008):

Ácidos: Los ácidos orgánicos reaccionan con las incrustaciones de varios minerales, especialmente de carbonatos.

Solventes: Los solventes disuelven los precipitados de dep3sitos orgánicos como son parafinas y asfaltenos, incrementando de esta manera la movilidad del hidrocarburo.

Biogás: En este proceso se estimula la producci3n de biogás bajo condiciones anaerobias mediante el mantenimiento del yacimiento en inactividad por un periodo de entre 1 a 4 semanas, la presi3n en el núcleo del pozo se incrementa entre 200 a 300 psi.

2.2.2. BIOESTIMULAC I ON DEL YAC I M I EN TO

La bioestimulaci3n a trav3s de fermentaci3n microbiana *in situ* involucra la aplicaci3n de uno o una combinaci3n de los siguientes mecanismos (Maqsood *et al.*, 2008):

- a) Producci3n *in situ* de biosurfactantes o biopolímeros promoviendo la movilidad del hidrocarburo dentro del pozo.
- b) Parcial represurizaci3n del pozo debido a la producci3n de metano y CO₂ como metabolitos microbianos.
- c) Reducci3n de la viscosidad del hidrocarburo a trav3s de la disoluci3n de biosolventes orgánicos en la fase hidrocarburo.
- d) Incremento de la permeabilidad de las rocas carbonatadas debido a la acci3n de ácidos orgánicos producidos durante los procesos de fermentaci3n anaeróbica.
- e) Limpieza de la regi3n del núcleo a trav3s de la producci3n de ácidos y gas durante las vías metabólicas de fermentaci3n. El gas empuja al hidrocarburo y permite el desalojo de debritos atrapados dentro de los poros de la roca almacén. Con esto, el tamaño del

poro se incrementa y da como resultado que la presión de capilaridad cercana al núcleo sea más favorable para permitir el flujo del hidrocarburo.

f) Taponamiento selectivo de zonas con alta permeabilidad por medio de la adición de bacterias productoras de biofilm seguido de la inyección de una solución conteniendo alguna fuente de carbono que promueva la producción de exopolisacáridos o biopolímeros.

Para que un proceso de MEOR sea factible, es necesario que los microorganismos sean extremófilos, es decir, que sean capaces de crecer y producir tensoactivos bajo condiciones ambientales severas, tales como baja tensión de oxígeno, elevada temperatura, presión y salinidad (Karanth *et al.*, 1999).

2.2.3. ESTRATEGIAS Y FACTORES QUE AFECTAN LOS PROCESOS DE MEOR

Antes de comenzar con la aplicación de técnicas de MEOR en un nuevo yacimiento, es necesario considerar ciertos factores técnicos que ayudarán a dilucidar si es económicamente factible su desarrollo, estos parámetros pueden variar de un yacimiento a otro, por lo que son análisis específicos y que en muchos casos no es igualmente funcional la aplicación del mismo proceso en diferentes campos petroleros.(Zahid *et al.*, 2007). Dentro de los parámetros de importancia a evaluar se encuentran:

a) Análisis estructural: Debe realizarse un análisis estructural de los yacimientos a aplicación de MEOR, con el fin de establecer un plan antes de la inyección de microorganismos dentro de la formación. Algunos parámetros de interés para llevar a cabo un análisis antes de la aplicación de MEOR, involucra saturación inicial de agua, distribución espacial del hidrocarburo, distribución espacial de las facies y fallas.

b) Análisis de permeabilidad: Este es un factor necesario para seleccionar el tipo de consorcio bacteriano a utilizar, así como para establecer la técnica de inyección y composición de nutrientes que serán adicionados al yacimiento.

c) Análisis geológico: es necesario conocer las características geológicas del yacimiento, ya que son de gran importancia durante la inyección de microorganismos. Debido a cambios abruptos en la permeabilidad, porosidad, tipo de roca y mojabilidad, impedirían que los microorganismos colonizarán las zonas de estudio.

d) Temperatura: La temperatura juega un papel muy importante y vital en los procesos de MEOR ya que existe una influencia de esta sobre el crecimiento microbiano y sus procesos metabólicos. La temperatura del yacimiento debe permitir la supervivencia y crecimiento de los consorcios microbianos inyectados como parte de los procesos de MEOR, es por esto, que en la mayoría de los casos se pone atención sobre el aislamiento y selección de microorganismos termofílicos.

e) Selección adecuada del consorcio microbiano: Para MEOR, la selección del consorcio microbiano es crucial para que puedan coexistir soportando las condiciones extremas del yacimiento y producir ciertos metabolitos en las concentraciones adecuadas.

f) Elección de los nutrientes idóneos para el consorcio microbiano: La interpretación clásica de MEOR es la de introducir microorganismos productores de algún metabolito de interés en conjunto con medios nutritivos constituidos de sales inorgánicas y una fuente de carbono. Es por esto que para mantener en un máximo nivel de crecimiento microbiano y un máximo de producción de metabolitos involucrados en MEOR, es importante conocer al microorganismo de prueba para así poder seleccionar efectivamente una concentración óptima y balanceada de nutrientes.

g) La selección de los nutrientes que se inyectarán al yacimiento debe de ser estudiada con detenimiento bajo condiciones controladas de laboratorio y posteriormente realizar una prueba piloto. El efecto del pH, balance entre elementos traza, calidad y costo de los componentes nutricionales también son de prima importancia durante la selección del medio de cultivo idóneo. Esto se hace con el fin de mantener bajo control la cantidad de metabolito producido por los microorganismos y evitar desequilibrio en la microecología de yacimiento.

h) Composición fisicoquímica del agua congénita: El análisis del agua de formación en cuanto a salinidad, minerales traza y todos los minerales disueltos revela si los

microorganismos serán capaces de sobrevivir dentro de la formación y podrán producir los diferentes metabolitos en las concentraciones adecuadas para obtener un proceso de MEOR efectivo, además es necesario evaluar la compatibilidad del agua congénita con las características químicas del agua inyectada con los nutrientes para evitar precipitaciones de sales dentro del yacimiento.

2.2.4. REALIZACIÓN DE PRUEBAS PILOTO COMO FACTOR DECISIVO EN MEOR

Los análisis de MEOR se conducen generalmente en dos fases. La fase inicial involucra una investigación exhaustiva a nivel laboratorio con el fin de conocer los mecanismos, bioquímica microbiana y optimizar las condiciones de crecimiento microbiano. Generalmente, las tareas a realizar incluyen: a) Establecer una relación óptima de nutrientes que permita un mayor crecimiento microbiano y mayor producción de metabolitos, tomando en consideración el costo de cada uno de los requerimientos, así como determinar la compatibilidad, competitividad y habilidad para propagarse dentro del medio poroso del yacimiento, b) Identificar el tipo de metabolito producido por el consorcio microbiano (biopolímero, biosurfactante o biogás), evaluar su efectividad, su efecto sobre la recuperación de hidrocarburo, y ,c) evaluar los candidatos posibles para aplicación de MEOR de acuerdo a las características del yacimiento.

2.2.5. TÉCNICAS DE MEOR EMPLEANDO BIOSURFACTANTES

Dentro de los procedimientos de recuperación mejorada del petróleo vía microbiana (MEOR) se encuentra la aplicación de biosurfactantes dentro del yacimiento, con el fin de disminuir la tensión interfacial entre el agua congénita y el hidrocarburo y de esta manera permitir la movilización del hidrocarburo residual (Youssef *et al.*, 2007). Otra característica adicional de este tipo de moléculas es que ayudan a aumentar la biodisponibilidad de las moléculas hidrofóbicas, las cuales pueden ser biodegradadas por bacterias autóctonas.

En algunos casos se ha empleado la producción de biosurfactantes *in situ*, en donde se inyecta nutrientes que promueven el crecimiento de bacterias autóctonas y la producción del agente biosurfactante o bien realizar la inoculación de bacterias productoras de tensoactivos que sean capaces de crecer a temperaturas, presiones, salinidades y

tensiones de oxígeno extremas que se presentan dentro del yacimiento (Lazar *et al.*, 1992).

Aunque los procesos biológicos en los yacimientos son todavía poco entendidos, específicamente en cuanto a la velocidad de producción y cantidad necesaria de los metabolitos para tener un efecto en la recuperación de aceite en los mismos (Lidsey, 1997 y Hitzman *et al.*, 2004), desde la década de los 80's se han aplicado de manera exitosa en varios yacimientos y tipos de aceite en diversos países. Donde se ha mostrado que la inyección de microorganismos o sus metabolitos facilitan la extracción del crudo, además de no interferir con el proceso de refinación, reducir el agua residual en el aceite, eliminar el sulfuro de hidrógeno y los procesos de corrosión; esto sin incrementar excesivamente los costos, pues los metabolitos microbianos se generan a partir de recursos renovables y su aplicación incrementa el volumen del crudo recuperado.

Han sido realizados con éxito diversos proyectos de recuperación vía microbiana, por diferentes grupos en el mundo tanto a nivel laboratorio (eficiencias de recuperación de aceite en distintos porcentajes, producción de polímeros extracelulares, disminución de la tensión superficial, entre otros); como en campo, donde se han realizado pruebas piloto en pozos (adición de microorganismos indígenas y sus metabolitos, inyección de microorganismos exógenos y medio de cultivo para fermentadores, adición de nutrientes como sacarosa, melaza y glucosa entre otras estrategias), con las cuales se han obtenido porcentajes importantes de recuperación .

2.2.6. CASOS DE APLICACI ON DE MEOR A NIVEL MUNDIAL

Uno de los primeros estudios de MEOR involucró un yacimiento no consolidado de areniscas en Arkansas, USA (Hitzman *et al.*, 2004), en el cual se inyectó una mezcla de melazas con un inóculo de *Clostridium acetobutylicum*. Después del tratamiento, la producción de dióxido de carbono incrementó la producción de hidrocarburo en un 250 %.

Tres pozos en Burnett J ubicados en USA fueron empleados como pruebas piloto para investigar MEOR, este trabajo envolvió la inyección de 80 L de keroseno, seguido por la adición de 15 L de un biosurfactante comercial (RAM Biochemicals WelPrep 5). La producción de hidrocarburo incrementó de 0.3 barriles por día antes del tratamiento a 1.6

barriles/día despu és del tratamiento (Nelson *et al.*, 1991). En otro set de experimentos envolviendo la inyecci ón de microorganismos y nutrientes dentro de los pozos, seguido por un periodo de inactividad de 3 días, se detectó un incremento en la producci ón de hidrocarburo entre un 11 a 25% (Briant *et al.*, 1993).

De manera similar, la inyecci ón de *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas campestris* y *Bacillus licheniformis* en seis pozos ubicados en campos petroleros en China, resultó en un incremento en los conteos microbianos, concentraci ón de ácidos orgánicos de un 13 a 169 % y dióxido de carbono y una ligera disminuci ón de la tensi ón superficial de 52.9 mN/m a 42.5 mN/m debido a la producci ón de biosurfactantes en la mezcla agua-hidrocarburo. Los dos pozos estudiados mostraron un incremento de 3.5 a 11.0 barriles por día despu és del tratamiento (Dejun *et al.*, 1999).

En el periodo de 2002 a 2003, se realizaron pruebas de MEOR en 60 pozos del campo Daqing ubicado en China utilizando mezclas bacterianas de *Brevibacillus brevis* y *Bacillus cerius*. De todos los pozos tratados, en 44 de ellos se obtuvo un incremento de alrededor del 72.7 % en su producci ón, y en 5 de los pozos tratados se consigui ó un aumento en la producci ón del 170 % de 20.8 a 36.9 ton/día (Hou *et al.*, 2005).

En la provincia de Saskatchewan, Canadá se obtuvieron excelentes resultados al aplicar los procesos de MEOR en yacimientos maduros, mediante la inyecci ón de nutrientes al pozo 10-17 capaces de estimular el crecimiento de bacterias autóctonas. La producci ón de hidrocarburo incrementó con un considerable decremento del contenido de agua, anterior al tratamiento la producci ón promedio del pozo era de 1.2 m³ de hidrocarburo y 20.8 m³ de agua y posterior al tratamiento la producci ón se incrementó a 4.1 m³ de hidrocarburo y 19.0 m³ de agua (Town *et al.* 2009).

Algunas aplicaciones de MEOR en campo se han realizado en paí ses como: Estados Unidos (Vadie *et al.*, 1996 y Hitzman *et al.*, 1997), Argentina (Maure *et al.*, 2005) Venezuela (Lidsey *et al.*, 1997), China (Nagase *et al.*, 2001), Emiratos Árabes Unidos (Zekri *et al.*, 1999) Rumania (Lazar *et al.*, 1997), Perú (Maure *et al.*, 2005). En la mayoría de los casos reportados, el porcentaje de recuperaci ón fue alentador, logrando un aumento del 13% al 65%. Adem ás de mejorar la producci ón de petróleo, algunos proyectos permitieron disminuir la producci ón de agua en el pozo (Brown *et al.*, 2001). No

obstante el n3mero de pruebas de MEOR que se han realizado, muchas de ellas de forma emp3rica, y a los 3xitos relativos que se han obtenido, esta tecnolog3a no hab3a sido utilizada ampliamente por los bajos costos del petr3leo, por la existencia de yacimientos con buena producci3n y por el poco rigor con que se hab3a desarrollado la investigaci3n en esta 3rea. Sin embargo, cada vez es necesario e indispensable, contar con t3cnicas econ3micas para aumentar la recuperaci3n del aceite y en algunos casos la reactivaci3n de pozos cerrados que ya fueron sometidos a un proceso de recuperaci3n secundaria. Un vac3o en esta 3rea son los escasos estudios de los procesos bacterianos y su efecto real en la estimulaci3n de yacimientos, su modelaci3n y simulaci3n.

En M3xico existen yacimientos agotados, donde la recuperaci3n de crudo residual por m3todos convencionales es incosteable. El declive de nuestras reservas, condiciones climatol3gicas adversas y la baja probabilidad de encontrar nuevos campos, son circunstancias oportunas para implementar nuevas tecnolog3as en la industria del petr3leo y de alta especializaci3n de recursos humanos, por lo que para desarrollar estos m3todos es necesario establecer 3reas especializadas dentro de las dependencias y entidades que puedan identificar los mejores candidatos (campos) para estos m3todos, su dise1o, evaluaci3n, validaci3n en pruebas piloto y su masificaci3n (Rangel, 2011). Dado que en M3xico a3n no se cuenta con proyectos de MEOR en el portafolio de hidrocarburos, se propone comenzar a conocer y utilizar selectivamente a diversos microorganismos aut3ctonos que produzcan metabolismos de inter3s que favorezcan las condiciones del crudo o bien de la roca permitiendo llevar a cabo una extracci3n econ3mica y eficiente (Mu1oz-Colunga *et al.*, 2005).

2.2.7. APLICACI3N DE T3CNICAS DE MEOR EN CHICONTEPEC

Este conjunto de 29 campos petroleros se encuentra localizado en la plataforma costera del Golfo de M3xico, en la provincia geol3gica denominada Tampico-Misantla al poniente de la plataforma de Tuxpan (Faja de Oro), entre la Sierra Madre Oriental y la plataforma de Tuxpan, porci3n norte del estado de Veracruz, y abarca una superficie de 3 815 kil3metros cuadrados. Al norte colinda con la ciudad de Cerro Azul, Veracruz, al sur con el estado de Puebla, al este con Tuxpan y Poza Rica y al oeste con Hidalgo (Figura 1). El paleocanal est3 constituido por sedimentos silicicl3sticos del Paleoceno y Eoceno, principalmente (Informe de reservas de hidrocarburo PEMEX enero 2009).

El Proyecto Activo Aceite Terciario del Golfo (ATG) es de gran relevancia para el país, ya que representa el 39% de la reserva total de hidrocarburos del país, es decir, cerca de 17.7 miles de millones de barriles de petróleo crudo equivalente. La producción total de petróleo crudo de Pemex alcanzó los 2.6 millones de barriles diarios en el primer trimestre de 2010, un incremento del 2.2 % en comparación con el mismo periodo de 2009.

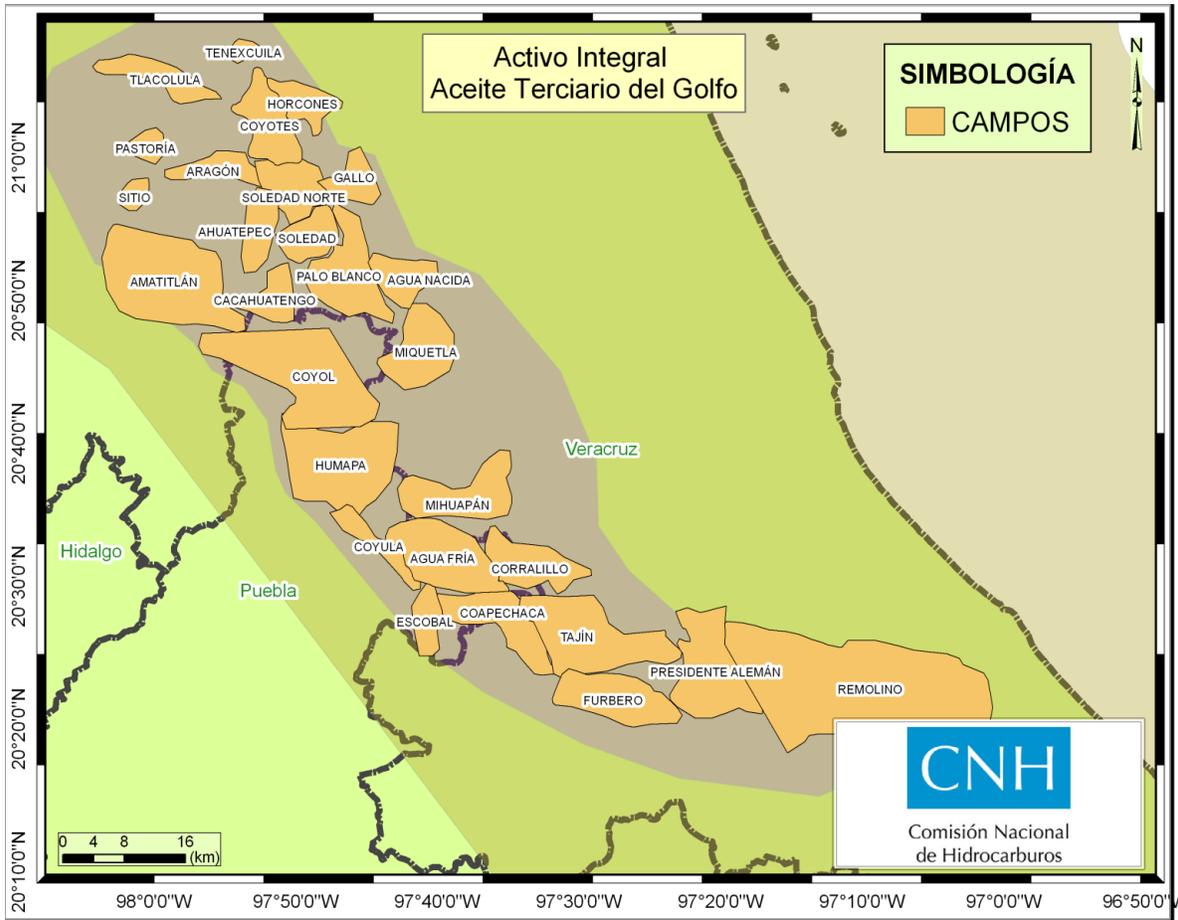


Figura 1. Mapa de la ubicación de los 29 campos petroleros correspondientes al Activo Aceite Terciario del Golfo (CNH-SENER 2010).

El objetivo de PEMEX es convertir al Proyecto Chicontepec en una cuenca que pueda producir entre 550 mil a 700 mil barriles diarios hacia el 2017, sin embargo, los yacimientos de Chicontepec se caracterizan por su bajo contenido de hidrocarburos, baja

permeabilidad y baja presión, por lo que la productividad y factor de recuperación de los pozos es reducida (tabla 5) y su explotación compleja, lo que requerirá del desarrollo y administración de tecnologías especializadas que incrementen significativamente la productividad por pozo y permitan reducir los costos al mínimo.

Debe darse una alta prioridad al desarrollo de los recursos y reservas que se encuentran en el ATG. La revisión del proyecto de explotación y el empleo de las mejores técnicas disponibles así como la adopción de las mejores prácticas operativas de la industria petrolera internacional aumentan significativamente las probabilidades de que el proyecto ATG tenga rentabilidad competitiva de mediano y largo plazo, y que se convierta en uno de los principales campos productores de hidrocarburos en el país.

Tabla 5. Principales campos de la región norte Activo Aceite Terciario del Golfo de acuerdo al volumen de reservas probadas y factores de recuperación de hidrocarburo (CNH-SENER 2010)

Campo	Tipo	Reservas			Factor de recuperación		
		Gas/aceite	Probadas mmbpce	Probables mmbpce	Posibles mmbpce	Al 1° enero 2009	Último
Coapechaca	Crudo		92.0	208.7	103.9	0.4	6.4
Tajín	Crudo		88.6	362.1	111.0	0.4	4.8
Agua Fría	Crudo		87.3	284.5	31.8	0.6	5.5
Presidente Alemán	Crudo		53.6	398.11	390.8	0.3	5.0
Coyotes	Crudo		43.3	160.8	52.6	0.3	7.4
Corralillo	Crudo		37.2	438.1	236.6	0.1	6.7
Soledad	Crudo		27.0	241.3	87.8	0.4	5.8
Miquetla	Crudo		25.9	303.6	1136.4	0.1	3.3
Aragón	Crudo		24.1	225.3	100.8	0.0	5.2
Coyol	Crudo		22.4	673.9	465.0	0.0	7.8

Nota: Se presentan los principales 10 campos de un total de 29.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se recolectaron un total de tres muestras de hidrocarburo de tres diferentes pozos pertenecientes al campo Chicontepec en recipientes de polipropileno estériles. Las muestras fueron identificadas como LCH1, LCH2 y LCH3.

3.2 OBTENCIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS PRODUCTORES DE BIOSURFACTANTE

Se realizó la inoculación de 1 mL de muestra de hidrocarburo LCH1, LCH2 y LCH3 dentro de matraces erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de los medios de cultivo A, B y C los cuáles se referencian en las tablas 6 a la 8 respectivamente, estos matraces fueron incubados en un baño de agitación a 115 rpm a las temperaturas de 30, 40 y 60 °C durante 7 días.

Tabla 6. Medio de cultivo A empleado para la selección de consorcios bacterianos productores de biosurfactante a partir de muestras obtenidas del campo Chicontepec.

Compuesto	Concentración (g/L)
KH ₂ PO ₄	0.4
K ₂ HPO ₄	1.6
NH ₄ CL	1.5
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.17
NaSO ₄ 7 H ₂ O	0.79
CaCl ₂	0.045
Glicerol	1 mL
Glucosa	20
Sol elem traza	1 mL

Solución de elementos traza 0.29 gL⁻¹ ZnSO₄ 7H₂O, 0.24 gL⁻¹ CaCl₂ 4H₂O, 0.25 gL⁻¹ CuSO₄5H₂O

Tabla 7 . Medio de cultivo B empleado para la selección de consorcios bacterianos productores de biosurfactante a partir de muestras obtenidas del campo Chicontepec

Compuesto	Concentración (g/L)
NaHPO ₄	2.2
KH ₂ PO ₄	1.4
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.6
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3
Extracto de levadura	1.0
CaCl ₂ .7H ₂ O	0.02
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01
Sol elem traza	1 mL
Keroseno	2,0 %

Solución de elementos traza 0.29 gL⁻¹ ZnSO₄ 7H₂O, 0.24 gL⁻¹ CaCl₂ 4H₂O, 0.25 gL⁻¹ CuSO₄5H₂O

Tabla 8. Medio de cultivo C empleado para la selección de consorcios productores de biosurfactante a partir de muestras obtenidas del campo Chicontepec

Compuesto	Concentración (g/L)
KH ₂ PO ₄	0.4
K ₂ HPO ₄	1.6
NH ₄ CL	1.5
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.17
NaSO ₄ 7 H ₂ O	0.79
CaCl ₂	0.045
Sol elem traza	1 mL
Glicerol	1 mL
Melaza	20.0

Solución de elementos traza 0.29 gL⁻¹ ZnSO₄ 7H₂O, 0.24 gL⁻¹ CaCl₂ 4H₂O, 0.25 gL⁻¹ CuSO₄5H₂O

Transcurrido el tiempo de incubación se tomó 1.5 mL de cada uno de los matraces problema y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 14 000 rpm durante 15 min, posteriormente se recupero el sobrenadante libre de bacterias con una micropipeta de 100 a 1000 μ L, a partir de este sobrenadante se efectuó la prueba de dispersión de gota.

3.3 ENSAYO PRELIMINAR DE LA CINÉTICA MICROBIANA DE PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE

A partir de los medios de cultivo inoculados con las muestras de hidrocarburo LCH1, LCH2 y LCH3 que resultaron positivos en la prueba de dispersión de gota con halos de emulsión de entre 7 y 12 mm de diámetro (muestras LCH3A, LCH3B, LCH1A, LCH1B y LCH1C) se inoculo 1 mL estos en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de caldo soya y tripticaseina y se incubaron en un baño de agitación a 115 rpm a la temperatura correspondiente para cada cepa durante 24 h.

Para la obtención del inculo bacteriano se tomaron 15 mL del crecimiento microbiano derivado del matraz con caldo soya y tripticaseina y se colocaron en un tubo Falcon cónico de 15 mL, el cuál fue centrifugado a 5 000 rpm durante 10 min, posteriormente se decanto el sobrenadante y se realizó un lavado del paquete celular con 15 mL PBS al 0.85 %. El paquete celular recuperado a partir del último lavado, se resuspendió en 5 mL de PBS al 0.85 %, se realizó una dilución 1:4 del mismo y se leyó su absorbancia a 625 nm empleando un espectrofotómetro HACH DR 2800. De acuerdo a la lectura de absorbancia del inculo y a la curva de calibración de absorbancia vs bacterias/mL se realizó una dilución del inculo para obtener 1×10^7 bacterias/mL dentro de matraces Erlenmeyer conteniendo 150 mL de los medios de cultivo A, B y C, todos los matraces de prueba fueron incubados en un baño de agitación a 115 rpm a 40°C. Para determinar la cinética de crecimiento microbiano y producción de biosurfactante, se tomaron alícuotas de 4.5 ml cada 8 h durante 60 h para efectuar el monitoreo de la absorbancia a 625 nm y la prueba de dispersión de gota.

3.4 AISLAMIENTO DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTE

De acuerdo con los resultados obtenidos en la cinética preliminar de producción de biosurfactante, se seleccionaron dos consorcios que presentaron la máxima producción de biosurfactante (LCH3A y LCH1C). Para realizar el aislamiento de los diferentes tipos bacterianos se realizaron diluciones seriadas hasta la dilución 10^{-9} de los cultivos microbianos obtenidos a partir caldo soya y tripticaseina y de los medios de cultivo A y C y fueron sembradas en agar soya y tripticaseina por la técnica de vaciado en placa.

Las placas petri fueron incubadas a 40°C durante 48 h, pasado este tiempo, se seleccionaron las placas petri donde se tenía colonias bacterianas perfectamente separadas y se resembraron las diferentes morfologías coloniales en agar soya y tripticaseina por el método de estría cruzada.

3.5 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE AISLADOS BACTERIANOS PRODUCTORES DE BIOSURFACTANTE.

Los diferentes aislados bacterianos fueron resembrados en agar soya y tripticaseina e incubados a 40°C durante 24 h, a continuación se determinó la morfología colonial, tinción de Gram, prueba de oxidasa y catalasa, siembra en agar TSI, LIA, MIO, Citrato de Simmons, caldo RM-VP, agar *Pseudomonas*, agar MacConkey, prueba de hemólisis en agar sangre y se realizaron la serie de pruebas correspondientes a los kits de galeras API 20NE Biomerieux de acuerdo con especificaciones del proveedor.

3.6 PREPARACIÓN Y OBSERVACIÓN DE AISLADOS MICROBIANOS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

3.6.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para obtener información morfológica de las bacterias presentes en los consorcios LCH1 y LCH3 a través la caracterización superficial a nivel micrométrico, se realizaron observaciones por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) utilizando el microscopio JEOL JSM5310-LV de la Facultad de Ciencias UNAM.

A partir del botón celular se realizó la fijación celular mediante la adición de una solución de glutaraldehído al 2.5 % en solución de PBS pH 7.2 durante 2 h a 4°C, seguido por el posfijamiento con una solución de tetraóxido de osmio al 1% durante 1 h a 4°C y su posterior lavado con buffer de fosfatos.

Consecutivamente se realizó la Deshidratación con etanol de manera gradual, 10 minutos por paso, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, etc. hasta el etanol absoluto (2 cambios en el etanol absoluto) y se desecó a punto crítico en un equipo Bal-tec CPD 030.

Por último, se montaron las muestras en una superficie de acero inoxidable, se cubrieron con oro durante 90 segundos utilizando una ionizadora Denton Vacuum Desk II y fueron observadas al Microscopio Jeol JSM5310-LV, en el modo de alto vacío.

3.6.2 CONDICIONES DE TRABAJO

Para efectuar las observaciones de las preparaciones se tomaron en consideración los siguientes parámetros de trabajo:

- ✓ Voltaje de aceleración de 20 o 25 KV.
- ✓ Spot de 5.
- ✓ Velocidad de barrido lento (slow scan 1).

3.6.3 OBSERVACIÓN

Para obtener una buena imagen fue necesario primero ajustar el brillo y contraste a la amplificación mínima, después se enfocó la muestra a la mayor amplificación posible. El nivel de amplificación depende de las características a observar en la muestra, se utilizaron amplificaciones de 5 000, 7 500, 10 000 y 15 000X.

Conforme se aumentó la amplificación y consecuentemente se seleccionaron elementos particulares de la muestra se debe ajustar la relación brillo - contraste.

En algunos casos conforme se incrementó la amplificación se requirió mayor definición de algunas características por lo que es necesario bajar el tamaño del spot. Para obtener la imagen final se selecciona en la ventana Scan la velocidad de barrido lento (Slow Scan 3),

una vez que termina el barrido de la imagen en la pantalla se congela la imagen (dar click en el icono Freeze Image) y se guarda.

3.7 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

La identificación de los aislados bacterianos procedentes de los consorcios LCH1C y LCH3A se realizó por medio de la comparación de las secuencias de nucleótidos del gen que codifican para el RNAr 16S.

3.7.1 EXTRACCIÓN DEL DNA

De cada una de las cepas aisladas se verificó su pureza mediante tinción de Gram y observación en el microscopio óptico, posteriormente se realizó la extracción del DNA utilizando el sistema Wizard Genomic DNA Purification System (Promega) y para comprobar la calidad del DNA extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% (p/v) con amortiguador TAE 1x. La muestra cargada en el gel contuvo 2 μ L de DNA, 2 μ L de colorante y 16 mL de H₂O. Las condiciones de electroforesis fueron 40 min a 90 volts. Después de este tiempo, se rebeló el gel con una solución de bromuro de etidio y se fotografió con un equipo de foto documentación GelDoc (Bio-Rad).

3.7.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR

Se utilizaron los cebadores E9F (5'-3') específicos para eubacterias (Forney et al., 2004), obteniéndose un fragmento amplificado del gen RNAr 16S de 930 pb. Se realizaron reacciones de 50 μ L de volumen final, los reactivos y concentraciones utilizadas se muestran en la tabla 9. Las condiciones para el PCR se muestran en la tabla 10. Para comprobar la obtención del tamaño del producto de PCR, se realizó una nueva electroforesis.

Para la purificación del producto de PCR se utilizó el sistema Wizard® SV Gel and PCR clean (Promega).

Tabla 9. Serie de reacciones realizadas durante el proceso de amplificación por PCR

Reactivo	Stock	Concentración final	Volumen (µL)
ADN molde	-	100 ng	2.5
Cebador E9F	20 µM	1 µM	2.5
Cebador E939R	20 µM	1 µM	2.5
dNTP	10 µM	200 µM	1
Amortiguador	10X	1X	5
MgCl ₂	50 µM	2.5 µM	2.5
Enzima	5U/µL	2.5 µM	2.5
H ₂ O	-	-	0.5

Tabla 10. Condiciones y número de ciclos de ciclos a los que llevo a cabo la amplificación por PCR

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	3
	94	30
30	55	30
	72	90
1	72	3

3.7.3 SECUENCIACIÓN

El análisis de las secuencias de nucleótidos de los fragmentos amplificados, se realizó en el laboratorio Divisional de Biología molecular de la División de Ciencias Biológicas de la UAM unidad Iztapalapa. Se utilizó la técnica de Dye-Terminator y un equipo ABI PRISM 3100 Avant (Applied Biosystems). Una vez obtenidas las secuencias, se sometieron a una comparación en la base de datos mediante el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi>), con el objeto de poder realizar la identificación.

3.8 PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE EN MEDIO DE CULTIVO PPGAS MODIFICADO

A partir de los aislados bacterianos en agar soya y tripticaseina (1A, 1B, 1C, 1D, 3A, 3B y 3C) (punto 3.4) obtenidos de los consorcios productores de biosurfactante seleccionados (LCH1C y LCH3A), se tomó una colonia aislada y se sembró en un matraz de 150 mL conteniendo 25 mL de medio de cultivo PPGAS (tabla 11), posteriormente se incubó en

un baño de agitación a 115 rpm a 40°C. Por último se realizó la prueba de gota dispersa a las 24 y 48 h de incubación.

Tabla 11. Medio de cultivo PPGAS modificado empleado para efectuar la cinética de producción de biosurfactante a partir de muestras obtenidas del campo Chicontepec

Compuesto	Concentración (g/L)
NH ₄ Cl	1.07
KCl	1.49
Tris-HCl	18.0
MgSO ₄	0.34
Peptona de caseína	10.0
Melaza	20.0

3.9 CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE EN MEDIO DE CULTIVO PPGAS

Para la realización de la cinética de crecimiento y producción de biosurfactante, se selecciono el aislado microbiano que tuviera mayor producción de biosurfactante de acuerdo con los resultados de la prueba de dispersión de gota.

Para la obtención del inculo bacteriano se utilizaron aislados en agar soya y tripticaseína de 48 h de incubación, se realizó una suspensión bacteriana en solución buffer PBS a partir de estos y se midió su absorbancia a 625 nm empleado un espectrofotómetro HACH DR 2800. De acuerdo con la lectura de absorbancia del inculo y a la curva de calibración de absorbancia vs bacterias/mL se realizó una dilución del inculo para obtener 1×10^7 bacterias/mL dentro de matraces erlenmeyer de 500 mL conteniendo 100 mL de los medios de cultivo PPGAS, los matraces de prueba fueron incubados en un baño de agitación a 115 rpm a 40°C. Para determinar la cinética de crecimiento microbiano y producción de biosurfactante, se tomaron alícuotas de 4.5 mL cada 2 h durante 40 h para efectuar el monitoreo de la absorbancia a 625 nm y la prueba de dispersión de gota y evaluación de la tensión superficial a los tiempos 24, 40 y 48 h.

3.10 PRUEBA DE DISPERSIÓN DE GOTA

Esta prueba nos permite detectar la producción semicuantitativa de biosurfactante debido a la formación de un halo de emulsión sobre una capa de hidrocarburo ligero, la cantidad de biosurfactante producido es directamente proporcional al diámetro del halo de emulsión formado. Para la realización de esta prueba se utilizaron placas petri de plástico de 90 mm de diámetro a las cuales se les agregó 30 mL de agua destilada y 1 gota de hidrocarburo ligero, formando una capa homogénea. Posteriormente se depositaron 20 μ L del sobrenadante del cultivo microbiano a probar y se midió con una regla el diámetro del halo de emulsión formado sobre la superficie homogénea de hidrocarburo.

3.11 MEDICIÓN DE TENSIÓN SUPERFICIAL

Para efectuar esta medición se utilizó un tensiómetro marca Dataphysics modelo DCAT11EC que utiliza el método de DuNouy para medir la tensión superficial. Este método se basa en medir la fuerza necesaria para separar un anillo de platino de la superficie de la muestra a evaluar, la fuerza para despegarlo está relacionada con la tensión superficial e interfacial por la expresión:

$$\gamma = \frac{\beta * f}{4 * \pi * r}$$

Donde f es el empuje aplicado al anillo en dinas, r es el radio medio del anillo, β es un factor de corrección y γ es la tensión superficial.

3.12 PRUEBAS DE ESTABILIDAD TÉRMICA DEL BIOSURFACTANTE

Para determinar la estabilidad térmica del biosurfactante se prepararon matraces Erlenmeyer de 1 L conteniendo 150 mL de medio de cultivo PPGAS modificado (tabla 11), posteriormente cada matraz fue inoculado con la cepa 1B sembrada en agar soya y tripticaseína de 24 h de incubación para obtener una concentración de 1×10^7 bacterias/mL. Cada matraz fue incubado durante 48 h a 115 rpm y a la par fueron incubados bajo las mismas condiciones matraces testigo negativo sin inocular. Transcurrido el tiempo de incubación se recolectó la suspensión celular en tubos falcon de 50 mL y centrifugados a 10 000 rpm durante 20 min, a continuación se recuperó el

sobrenadante y se dosificó en 6 tubos falcon de 14 mL. Cada muestra de sobrenadante fue calentado en un baño de agua a 50, 60, 70, 80 y 100°C durante 1 h y una muestra fue sometida a dos ciclos de autoclaveado a 121°C/15 lb. Para comprobar la estabilidad del biosurfactante se realizó la prueba de gota dispersa y medición de la tensión superficial de cada una de las muestras y los datos fueron confrontados con los obtenidos en los testigos negativos que fueron sometidos al mismo proceso.

3.13 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE BIOSURFACTANTE

3.13.1 EXTRACCIÓN DE LOS BIOSURFACTANTES

Los biosurfactantes fueron extraídos mediante la técnica de liofilización.

3.13.2 LIOFILIZACIÓN

El proceso de liofilización consta de tres etapas (Sistemas de Liofilización, 2006):

- ✓ Pre-congelamiento la cual prepara el producto para el proceso de sublimación.
- ✓ Secado primario, en el cual el hielo sublima sin derretirse
- ✓ Secado secundario, en el cual la humedad residual ligada al material sólido es extraída dejando un producto seco.

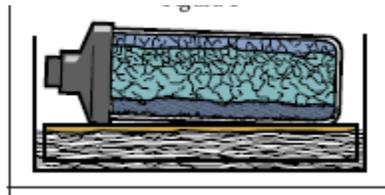


Figura 2. Frascos para la liofilización de las muestras.

Para la liofilización de las muestras, se utilizaron frascos para liofilizadora (Figura 2) para precongelar el sobrenadante, estos matraces se deben colocar inclinados en el congelador para lograr una película delgada y aumentar el área superficial, de modo que las moléculas de agua atraviesen con mayor facilidad la muestra.

Una vez que la muestra se congela, está lista para conectarse al sistema de liofilización, que consta de:

1. Cámara de secado múltiple en la que se conectan los frascos con muestras precongeladas.
2. Sistema de vacío para superar los factores de resistencia y facilitar el flujo de vapor.
3. Fuente de calor externa para suministrar energía.
4. Colector de baja temperatura para maximizar la diferencia de presión de vapor y para retener la humedad antes de que se contamine con el aceite de la bomba de vacío.

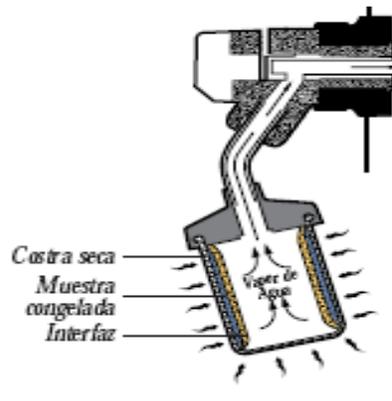


Figura 3. Sistema de liofilización, matraz con muestra congelada acoplado al sistema de secado.

El secado primario y secundario se realiza cuando el matraz es conectado al sistema de liofilización (Figura 3). La muestra es expuesta inmediatamente a un vacío para superar la resistencia al flujo de vapor, al mismo tiempo se aplica calor para suministrar energía. El vacío y el calor ayudan a que el vapor de agua sublime del hielo y fluya fácilmente de la muestra y lejos del material desecado restante.

La velocidad de sublimación de un producto congelado depende de varios factores, siendo el más importante la diferencia de presiones de vapor entre el producto congelado y el colector. Generalmente la liofilización más efectiva ocurre cuando la muestra está a la mayor temperatura posible que pueda tolerar sin que se derrita y las temperaturas del colector y del vacío del sistema sean las más bajas posibles. Los tiempos de desecación dependen de la temperatura eutéctica (temperatura a la cual la fase líquida está en equilibrio con los sólidos) del material a ser liofilizado, para la mayoría de los materiales biológicos, esta temperatura es bastante inferior a 0°C.

3.13.3 OBTENCIÓN DEL BIOSURFACTANTE

Para la obtención del inóculo bacteriano se utilizaron aislados en agar soya y tripticaseína de 48 h de incubación, se realizó una suspensión bacteriana en solución buffer PBS y se midió su absorbancia a 625 nm empleado un espectrofotómetro HACH DR 2800. De acuerdo con la lectura de absorbancia del inóculo y a la curva de calibración de absorbancia vs bacterias/mL, se realizó una dilución del inóculo para obtener 1×10^7 bacterias/mL dentro de matraces Erlenmeyer de 3 L conteniendo 600 mL de los medios de cultivo PPGAS, los matraces de prueba fueron incubados en un baño de agitación a 115 rpm a 40°C durante 48 h, al igual, se corrieron a la par matraces con medio PPGAS sin inóculo como testigos negativos. Después del periodo de incubación, el medio de cultivo se dispuso en tubos cónicos de polipropileno tipo Falcon estériles de 50 mL y centrifugados a 14 000 rpm durante 30 min.

3.13.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LIOFILIZAR

El sobrenadante obtenido en el anterior punto, fue vaciado en los matraces de 250 y 75 mL hasta un tercio del volumen y se colocaron inclinados en el congelador marca Revco modelo VI+1386-AVA a -80°C (figura 1). Después de 6 h se revisaron si las muestras están sólidas, si es el caso se sacaron del congelador.

3.13.5 PROCEDIMIENTO DE LIOFILIZACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Para comenzar el proceso, se encendió el sistema de enfriamiento de la liofilizadora marca Labconco modelo Freezedryer 45 hasta que alcanzó la temperatura de -50°C, posteriormente, se encendió la bomba de vacío marca Welch modelo 8920 adaptada a la liofilizadora y cuando alcanzó el valor señalado en la región verde del display, se conectaron los frascos en los ductos adecuados y se abrieron sus respectivas llaves para efectuar la acción del vacío. Todo el proceso se repitió tantas veces como fue necesario hasta que se obtuvo la eliminación completa de la fase acuosa y que solamente tenga el extracto crudo del biosurfactante.

3.14 DETERMINAC IÓN DE LA CONCENTRAC IÓN MICELAR CRÍT ICA (CMC)

La determinac ión de este parámetro es una medici ón indirecta de la concentrac ión y efectividad del biosurfactante (Thaniyavarn 2006). Para efectuar esta determinac ión se realiz ó una soluci ón patrón de 10 000 mg/L del extracto crudo del biosurfactante obtenido mediante liofilizac ión, de la cual se realizaron diluciones en agua destilada en un intervalo de 50 a 10 000 mg/L y se determinó la tensi ón superficial utilizando el método de DuNouy. A partir de los datos recabados se realiz ó la gráfica de concentrac ión de extracto crudo de biosurfactante Vs el logaritmo de la tensi ón superficial de la tensi ón superficial en mN/m. El valor de la CMC se considera cuando existe un cambio abrupto en el valor de la tensi ón superficial observado en la gráfica anteriormente descrita. Sin embargo, para obtener un valor más específico de la CMC se realiza la gráfica de la concentrac ión de biosurfactante Vs la segunda derivada de la tensi ón superficial (Muhammad A, et al. 2007).

3.15 PURIFICAC IÓN PARCIAL DEL BIOSURFACTANTE

Para la parcial purificac ión del biosurfactante se tomó en considerac ión el método descrito por Bagheri (Bagheri Lotfabad T, et al. 2009), se tomó 1 g del extracto crudo liofilizado de biosurfactante y se solubilizo en 20 mL de agua destilada, posteriormente se acidificó hasta un pH de 2 con una soluci ón de HCl 6N y se colocó en refrigerac ión a 4°C durante toda la noche. El precipitado resultante fue centrifugado a 14 000 rpm durante 20 min, seguido de la disoluci ón con una soluci ón de bicarbonato de sodio 0.05 M, reacidificac ión a pH 2 y recentrifugac ión a 14 000 rpm/20 min a 4 °C. El precipitado resultante fue resuspendido en una mezcla de cloroformo metanol (2:1) y posteriormente centrifugado a 14 000 rpm durante 10 min para acelerar la separac ión de fases. La dos fases superiores fueron separadas y transferidas a un tubo tipo Falcon de 50 mL para volver a realizar la extracci ón con cloroformo-metanol por tres veces. La fase inferior conteniendo el biosurfactante fue recolectada en un matraz tipo pera y el solvente fue removido usando un rotoevaporador. El producto seco fue disuelto en 5 mL de agua destilada y resguardado en refrigerac ión a 4 °C para su posterior análisis. De la misma manera se trató al extracto obtenido a partir de la liofilizac ión del medio de cultivo PPGAS modificado sin inocular.

3.16 DETERMINAC I ON DEL CONTENIDO DE UNIDADES DE RAMNOSA

La determinac i on de subunidades de ramnosa fue determinada de acuerdo con el m etodo descrito por Dische y Shettles (1948). Como primer paso se realiz o una curva de calibrac i on de ramnosa de una concentrac i on desde 0.05 a 0.45 mg/L, a la par se evaluaron el biosurfactante parcialmente purificado y el testigo negativo (3.13). 1 mL de cada una de las muestras fue colocado en tubos de ensayo de vidrio y sumergidos en un ba o de hielo, posteriormente se agreg o a cada tubo 4.5 ml de H₂SO₄ 36N. Los tubos fueron mezclados cuidadosamente con un vortex, cubiertos con papel aluminio, y mantenidos a temperatura ambiente durante 15-20 min. A continuac i on, fueron colocados en un ba o de agua hirviendo por 10 min y subsecuentemente enfriados en un ba o de hielo. A la postre, se a oadi o 0.1 mL de una soluc i on de ciste i na-HCl 3%, agitados con vortex, cubiertos con papel aluminio e incubados a temperatura ambiente durante 4 h. Por ultimo, los tubos fueron agitados y el contenido de los tubos fue le i do en un espectrofot ometro Hach 2800 a 396 nm. La concentrac i on de ramnosa contenida en el biosurfactante parcialmente purificado y del testigo negativo se obtuvo mediante interpolac i on de su absorbancia en la curva de calibrac i on.

3.17 CARACTER I ZAC I ON QU I M I CA DEL BIOSURFACTANTE MEDIANTE ESPECTROSCOPI A DE INFRARROJO

Este tipo de espectroscopia se basa en la absorc i on de la radiac i on infrarroja por las mol e culas en vibrac i on. Dentro de una mol e cula existen dos modos principales de vibrac i on, alargamiento y flex i on. La absorc i on de luz infrarroja de energ i a o frecuencia apropiada (2'5-15 m; 4.000-666 cm⁻¹) excita a la mol e cula desde su estado fundamental hasta un estado excitado produci endose la vibrac i on de un modo determinado. Una mol e cula absorber a energ i a cuando esta sea igual a la necesaria para que se produzca una transic i on vibracional de la mol e cula. Es decir, la mol e cula vibrar a de un modo determinado gracias a la energ i a que se le ha suministrado.

La frecuencia o longitud de onda de cada modo de absorc i on es func i on de la masa relativa de los a tomos, la constante de fuerza de los enlaces y la geometr i a de la vibrac i on. Esto hace posible asignar frecuencias caracter i sticas de alargamiento y flex i on a grupos funcionales espec i ficos, ya que, aunque las frecuencias vibracionales para un

enlace dado en una molécula compleja no son totalmente independientes de los demás enlaces situados cerca, el rango de variación es pequeño. Por lo tanto, esta técnica nos permite la identificación de algunos grupos funcionales de una molécula para la que se observan bandas características en determinadas regiones del espectro.

La caracterización inicial del biosurfactante se realizó empleando un espectrómetro de IR por transformada de Fourier marca Nicolet modelo Nexus 470 FT-IR en un rango de 4000 y 650 cm^{-1} , utilizando KBr para la formación de los pellets conteniendo la muestra de biosurfactante.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Los procesos de recuperación mejorada de hidrocarburo vía microbiana (MEOR) utiliza microorganismos y sus productos metabólicos, entre los que se encuentran gases, biosurfactantes, biopolímeros, solventes y ácidos para recuperar el hidrocarburo entrampado en los poros de las rocas. Los ácidos, solventes y gases ayudan a incrementar la permeabilidad de la roca en el yacimiento, los biopolímeros son utilizados para represurizar el yacimiento, mientras que los biosurfactantes reducen la tensión interfacial y superficial entre las fases hidrocarburo-agua, permitiendo la liberación del hidrocarburo entrampado en el interior de la roca (Muhammad *et al.*, 1994).

El Proyecto Chicontepec es de gran relevancia para el país, ya que representa el 60% de la reserva probables y el 55% de reservas probables de hidrocarburos del país, es decir, cerca de 17.7 miles de millones de barriles de petróleo crudo equivalente (Informe de reservas de hidrocarburo PEMEX enero 2010). Sin embargo, los yacimientos de Chicontepec se caracterizan por su bajo contenido de hidrocarburos, porosidad máxima de 14 %, baja permeabilidad de 0.01 a 100 mdarcyes y baja presión, por lo que la productividad de los pozos es reducida y su explotación compleja, lo que requerirá del desarrollo y administración de tecnologías especializadas que incrementen significativamente la productividad por pozo y permitan reducir los costos al mínimo (Mayol *et al.*, 2005).

Dada esta problemática, en el presente trabajo se realizaron estudios con el fin de comenzar con las estrategias de aplicación de técnicas de MEOR en el paleocanal. Para esto, se recolectaron 3 muestras de hidrocarburo provenientes de diferentes pozos del campo Chicontepec, las cuales fueron identificadas como LCH1, LCH2 y LCH3, ya que las bacterias autóctonas recuperadas a partir del yacimiento en estudio, juegan un papel clave y crucial en la conducción exitosa de los procesos de MEOR (Ghojavan H, *et al.* 2008).

4.2 OBTENCIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS PRODUCTORES DE BIOSURFACTANTE A PARTIR DE LAS MUESTRAS LCH1, LCH2 y LCH3 DE POZOS DEL CAMPO DE CHICONTEPEC

Como parte de la selección de consorcios productores de biosurfactante, la prueba preliminar se realizó mediante la inoculación de las muestras en tres diferentes medios de cultivo, cuya principal diferencia radicó en la fuente de carbono empleada, en el medio de cultivo A se utilizó glucosa y glicerol (tabla 5), mientras que en el medio B se empleó una fuente más compleja y difícil de degradar que fue el keroseno (tabla 6) y por último, el medio C contenía melaza y glicerol (tabla 7) como fuente de carbono, así también se probaron tres temperaturas de incubación que fueron 30, 40 y 60°C. Para todos los experimentos se empleó como un testigo positivo, una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, productora de biosurfactante y un testigo negativo que consistió en el medio de cultivo sin inóculo. Se consideraron diferentes fuentes de carbono para la selección preliminar de consorcios debido a que de estudios previos se conoce que el tipo de biosurfactante y su rendimiento dependen en gran medida de la fuente de carbono y del medio de cultivo empleado, además el empleo de diferentes medios de cultivo incrementa las posibilidades recuperar diferentes poblaciones microbianas (Bodour *et al.*, 2003).

Durante la producción de biosurfactante se han empleado un sin número de fuentes de carbono solubles (Al Araji, 2007) e insolubles en agua (Onbasli *et al.*, 2009), como es el caso del glicerol, glucosa, manitol, etanol, aceites vegetales e hidrocarburos; pero actualmente se han empleado sustratos de bajo costo (Rashedi *et al.*, 2006) especialmente provenientes de desechos industriales (Onbasli, 2009) como son las melazas y efluentes recuperadas del procesamiento de papas, que pudieran reducir entre el 10-30% del costo total de la producción (Mohammad *et al.*, 2008).

En la tabla 12 se presentan los resultados preliminares obtenidos al inocular las muestras LCH1, LCH2 y LCH3 en los tres diferentes medios de cultivo a una temperatura de 30°C, la prueba de dispersión de gota se realizó después de 7 días de incubación.

Tabla 12. Resultados obtenidos de las pruebas preliminares a 30°C para selección de consorcios microbianos productores de biosurfactante.

No. De muestra	Medio de cultivo	Producción de gas	Prueba de dispersión de gota (mm)		
LCH1	A	Negativo	3	2	2
LCH2	A	Negativo	6	6	5
LCH3	A	Negativo	2	2	3
PAO1	A	Negativo	3	3	3
Testigo	A	Negativo	3	3	2
LCH1	B	Negativo	3	3	3
LCH2	B	Negativo	3	3	3
LCH3	B	Negativo	5	5	5
PAO1	B	Negativo	1	1	1
Testigo	B	Negativo	3	3	3
LCH1	C	Negativo	5	5	5
LCH2	C	Negativo	4	4	4
LCH3	C	Negativo	3	3	4
PAO1	C	Negativo	3	3	4
Testigo	C	Negativo	4	4	4

En la tabla 13 se presentan los resultados preliminares obtenidos al inocular las muestras LCH1, LCH2 y LCH3 en los tres diferentes medios de cultivo a una temperatura de 40°C, la prueba de dispersión de gota se realizó después de 7 días de incubación.

Tabla 13. Resultados obtenidos de las pruebas preliminares a 40°C para selección de consorcios microbianos productores de biosurfactante.

No. De muestra	Medio de cultivo	Producción de gas	Prueba de gota dispersa (mm)		
LCH1	A	Negativo	7	5	5
LCH2	A	Negativo	1	1	1
LCH3	A	Negativo	10	9	9
PAO1	A	Negativo	6	6	6
Testigo	A	Negativo	5	5	5
LCH1	B	Negativo	3	4	4
LCH2	B	Negativo	5	4	5
LCH3	B	Negativo	9	9	9
PAO1	B	Negativo	10	8	8
Testigo	B	Negativo	4	6	4
LCH1	C	Negativo	9	10	9
LCH2	C	Negativo	16	12	11
LCH3	C	Negativo	10	7	7
PAO1	C	Negativo	18	11	10
Testigo	C	Negativo	7	6	8

En la tabla 14 se presentan los resultados preliminares obtenidos al inocular las muestras LCH1, LCH2 y LCH3 en los tres diferentes medios de cultivo a una temperatura de 60°C, la prueba de dispersión de gota se realizó después de 7 días de incubación.

Tabla 14. Resultados obtenidos de las pruebas preliminares a 60°C para selección de consorcios microbianos productores de biosurfactante.

No. De muestra	Medio de cultivo	Producción de gas	Prueba de dispersión de gota (mm)		
LCH1	A	Negativo	1	1	1
LCH2	A	Negativo	3	2	2
LCH3	A	Negativo	3	3	2
PAO1	A	Negativo	2	2	2
Testigo	A	Negativo	3	3	3
LCH1	B	Negativo	0	0	0
LCH2	B	Negativo	1	1	1
LCH3	B	Negativo	2	2	2
PAO1	B	Negativo	6	5	5
Testigo	B	Negativo	2	2	2
LCH1	C	Negativo	2	2	2
LCH2	C	Negativo	3	3	4
LCH3	C	Negativo	3	3	3
PAO1	C	Negativo	2	2	2
Testigo	C	Negativo	0	0	0

De acuerdo con los resultados anteriores, solamente se obtuvo producción de biosurfactante cuando se incubaron las tres muestras a 40°C en los medios de cultivo A, B y C. La temperatura es un factor muy importante ya que interviene en el crecimiento microbiano y en la eficiencia de estimulación in situ (Akhavan Sepahy *et al.*, 2005, Nunizawati, 2009), estudios realizados por Salehizadeh y colaboradores (2009) encontraron que la temperatura presenta una influencia de alrededor del 14.45 % durante el crecimiento de una cepa de *Alcaligenes sp* en medio de cultivo conteniendo melazas como fuente de carbono.

En los experimentos realizados por Tugba (2008), se encontró una máxima producción de ramnolípidos y crecimiento microbiano por *Pseudomonas aeruginosa* a una temperatura de 32 a 34°C, existiendo un decremento considerable de ambos parámetros pasando los 36°C como resultado de la disminución del metabolismo microbiano.

4.3 ENSAYO PRELIMINAR DE LA CINÉTICA MICROBIANA DE PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE

De acuerdo con los resultados obtenidos de las tablas 9, 10 y 11; se seleccionaron cinco consorcios de trabajo cuya temperatura óptima de producción de surfactante fue de 40°C, los cuales fueron el consorcio LCH3 en el medio de cultivo A con un promedio de halo de emulsión de 9 mm, consorcio LCH3 en el medio de cultivo B con un promedio de 9 mm de halo de emulsión y los consorcios LCH1, LCH2 y LCH3 en el medio de cultivo C con promedio de halos de emulsión de 9 mm, 13 mm y 8 mm respectivamente, todos ellos sobrepasan los valores obtenidos por los testigos negativos.

Con los 5 consorcios productores de biosurfactante, se realizó la cinética de producción, para esto, los consorcios microbianos se crecieron en caldo soya y tripticaseína durante 24 h y posteriormente fueron transferidos a los diferentes medios de cultivo de prueba a una concentración de 1×10^7 bacterias/mL e incubados a 40°C a 115 rpm, cada 8 h se realizó el monitoreo de la producción de biosurfactante mediante la prueba de dispersión de gota.

En la figura 4 se muestran la cinética de producción de biosurfactante del consorcio LCH3 en el medio de cultivo A, en esta se observa el comienzo de la producción a las 24 h de incubación y va incrementándose considerablemente hasta obtener un punto máximo a las 104 h de incubación con una halo de emulsión de 17 mm, en los puntos posteriores a esta lectura se presentó un valor constante en el halo de emulsión en 15 mm. Cabe recalcar que este consorcio produjo mayor cantidad de biosurfactante que el testigo positivo, por lo que se consideró un buen candidato para continuar con el proceso de selección de consorcios productores de biosurfactante.

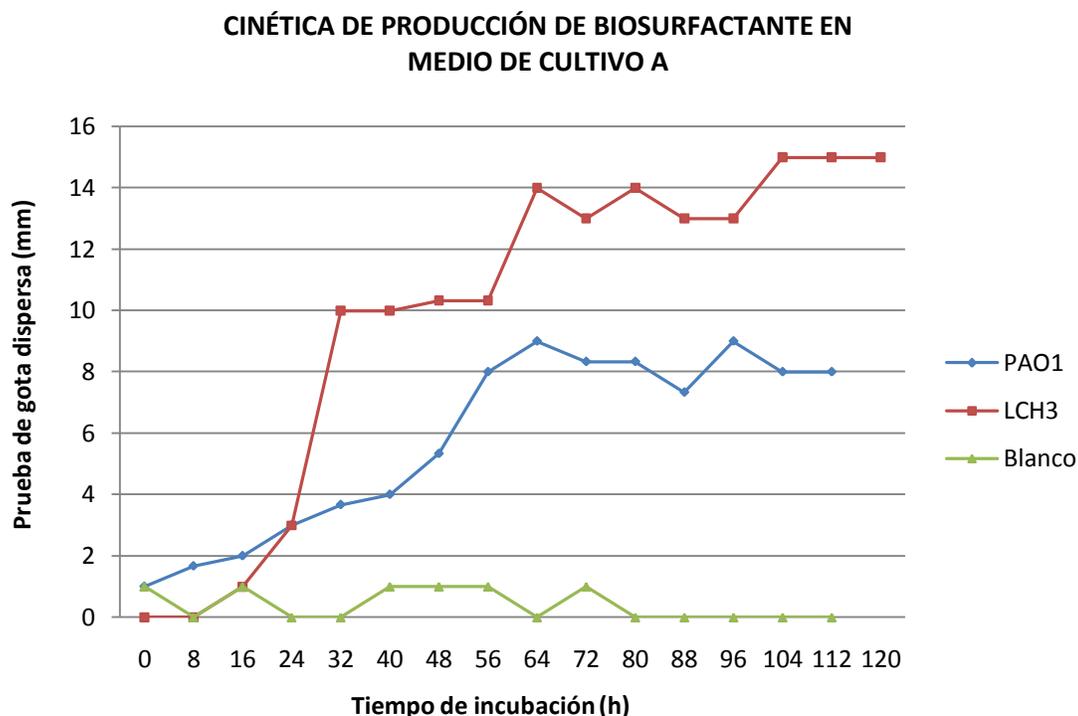


Figura 4. Cinética de producción de biosurfactante para el consorcio LCH3 en el medio de cultivo A a 40°C.

En la Figura 5 se presenta la cinética de producción de biosurfactante para el consorcio LCH3 en el medio de cultivo B con keroseno como fuente de carbono. Se observa que tanto el testigo positivo como el consorcio de prueba no produjeron biosurfactante, contrario a este resultado. Desai *et al.*, 1997 y Samadi *et al.*, 2007 mencionan que existe una mayor producción de biosurfactante en medios de cultivo que contengan fuentes de carbono insolubles en agua como son los n-alcenos y aceite de oliva. Sin embargo, las investigaciones realizadas por Abouseoud *et al.*, 2007 señalan un crecimiento limitado de *Pseudomonas fluorescens* utilizando hexadecano como fuente de carbono debido a un decremento del pH causado probablemente por la producción de metabolitos secundarios, además de que este compuesto no es el ideal para la producción de ramnolípidos debido a su toxicidad y alto costo (Ali Raza *et al.*, 2006), al igual, en los estudios realizados por

Das *et al.*, 2009 no se encontró crecimiento ni producción en medios de cultivo conteniendo keroseno o hexadecano.

Debido a la baja productividad en este medio de cultivo, se tomó la decisión de eliminarlo para futuras experimentaciones.

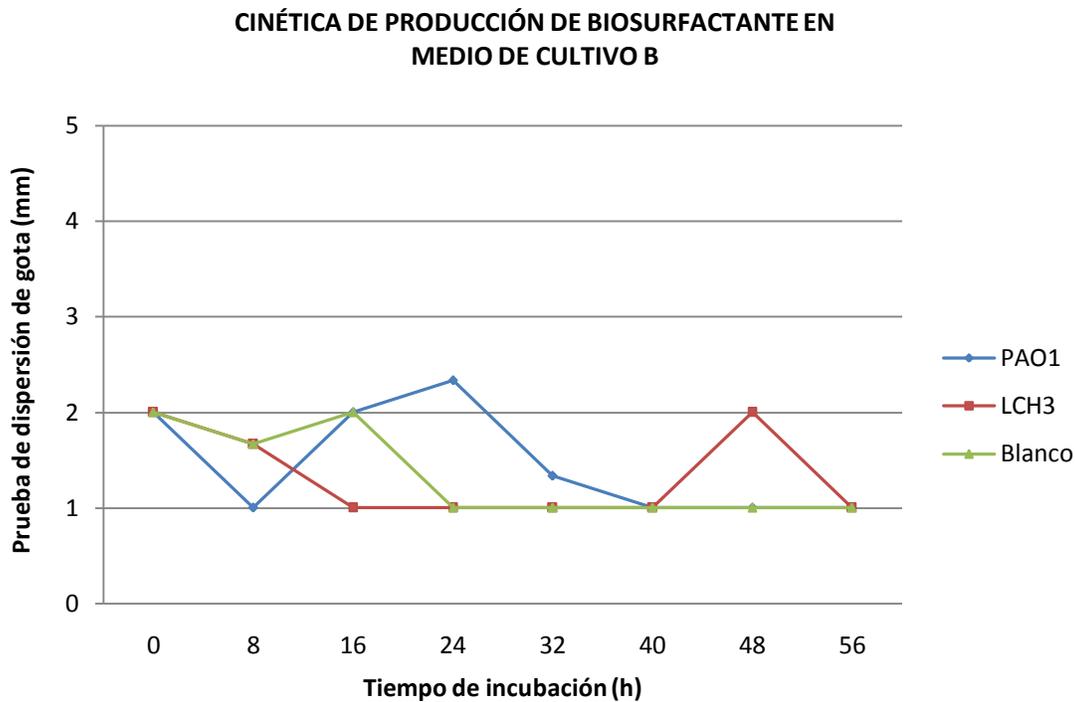


Figura 5. Cinética de producción de biosurfactante para el consorcio LCH3 en el medio de cultivo B a 40°C.

Por último, en la Figura 6 se presenta la cinética de producción de biosurfactante para los consorcios LCH1, LCH2 y LCH3 en el medio de cultivo C. Los resultados indican que los tres consorcios presentan producción de biosurfactante, pero el LCH1 comenzó su producción a las 56 h, ya desde entonces sobrepasaba la producción de los dos otros consorcios y además se obtuvo un máximo de producción a las 80 h con un promedio de halo de emulsión de 8.5 mm, sin embargo, lo interesante de este caso, es que después del punto máximo de producción tanto en el testigo positivo como el consorcio LCH1 se encontró un decremento hasta llegar a valores iguales o cercanos (4 y 5 mm de halo de dispersión respectivamente) al testigo negativo (4 mm de halo de dispersión). De acuerdo

con estos resultados se decidió seguir la experimentación con el consorcio LCH1 y eliminar la experimentación con los consorcios LCH2 y LCH3, ya que se pretende trabajar con aquellos que presenten mayor productividad.

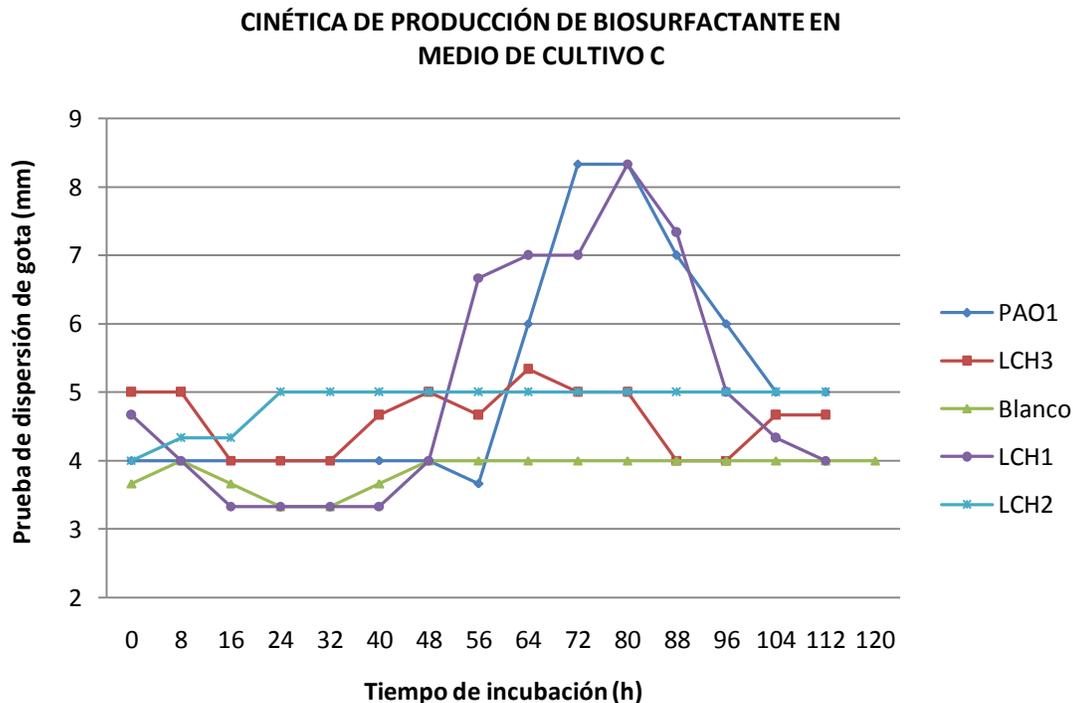


Figura 6. Cinética de producción de biosurfactante para los consorcios LCH1, LCH2 y LCH3 en el medio de cultivo C a 40°C.

Considerando las tres diferentes fuentes de carbono, se observó una mayor producción de biosurfactante al utilizar glucosa como fuente de carbono, debido a que se obtuvieron halos de dispersión máximos de 17 mm. Estos mismos resultados fueron obtenidos en los experimentos efectuados por Rismani *et al.*, 2006 donde se probaron diferentes fuentes de carbono entre las que se incluían glicerol, sucrosa, glucosa, melazas, n-hexadecano, n-decano, tetradecano y crudo, obteniéndose mayor producción de biosurfactante empleando glucosa, sucrosa y glicerol para la producción en un cultivo puro de *Bacillus licheniformis*, lo anterior indica que la producción de sustancias surfactantes por los aislados microbianos no necesariamente ocurre en respuesta a la presencia de sustratos insolubles en el medio de cultivo (Anyanwu, 2010).

De acuerdo con los resultados anteriores, la dificultad para la selección de bacterias productoras de biosurfactante, así como de la calidad y cantidad de éste (Das P, et al. 2009) depende del tipo de fuente de carbono presente y del tipo y cantidad de otros nutrientes del medio de cultivo, ya que de esto estriba la variedad en poblaciones microbianas que pudieran ser seleccionadas (Bodour A, *et al.* 2004).

Como parte del diagrama de flujo experimental, se evaluó la cinética de crecimiento microbiano de los consorcios LCH3 en medio de cultivo A y LCH1 en medio de cultivo C, para lo cual se determinó la absorbancia del medio de cultivo a 625 nm, al igual, se realizó la prueba de gota dispersa para determinar la producción de biosurfactante. Sin embargo, según se muestra en las figuras 7 y 8 si se presentó crecimiento microbiano en ambos medios de cultivo pero sin producción de biosurfactante.

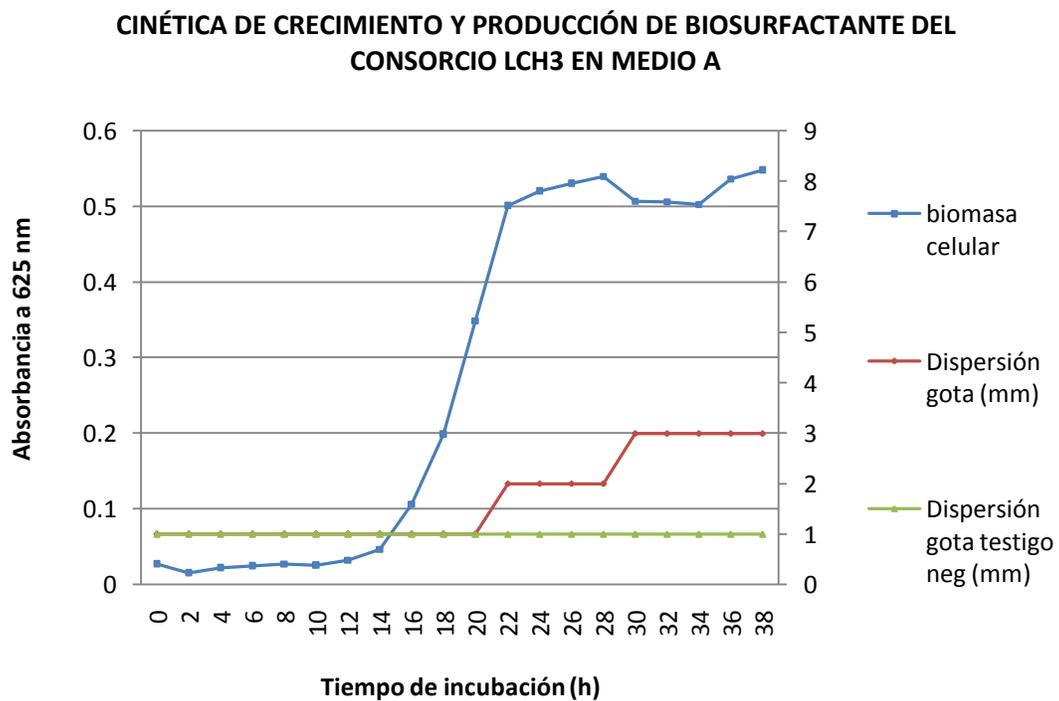


Figura 7. Cinética de crecimiento y producción de biosurfactante del consorcio LCH3 en el medio de cultivo A.

CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE POR EL CONSORCIO LCH 1 EN MEDIO C

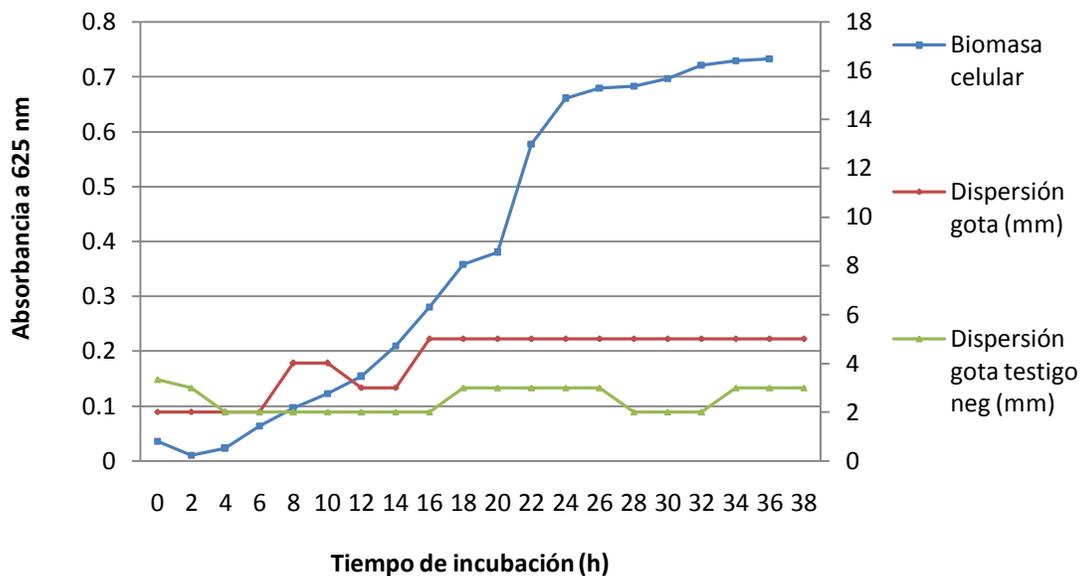


Figura 8. Cinética de crecimiento y producción de biosurfactante del consorcio LCH1 en el medio de cultivo C.

Debido a la pérdida en la capacidad de producir biosurfactante por ambos consorcios de prueba, se procedió a evaluar dos diferentes concentraciones de melaza, 15 g/L y 30 g/L (tabla 15), ya que en algunas ocasiones, las altas concentraciones de estas pueden inhibir la producción de biosurfactante (Joshi S., *et al.* 2007). Al igual que los experimentos anteriores se inoculó el medios de cultivo C con una población de 1×10^7 bacterias/mL y se monitoreó la producción de biosurfactante mediante la prueba de gota dispersa a las 24 y 48 h. Los resultados obtenidos indican que la producción de biosurfactante resultó ser nula y no hubo influencia alguna de la concentración de melazas sobre la producción de biosurfactante, contrario a las investigaciones realizadas por Patel *et al.*, 1997 donde determinó que la mayor producción de biosurfactante se dio lugar a una concentración de melazas del 7 % y por arriba de este valor, solamente se vio incrementada la biomasa celular pero no la síntesis de biosurfactante.

Tabla 15. Comportamiento en la producción de biosurfactante para el consorcio LCH1 en el medio de cultivo C con una concentración de melazas de 15 y 30 g/L.

No. De muestra	Medio de cultivo	Tiempo de incubación	Concentración de melazas	Prueba de dispersión de gota (mm)		
LCH1	C	24 h	15 g/L	5	5	5
PAO1	C	24 h	15 g/L	5	5	5
Testigo	C	24 h	15 g/L	5	5	5
LCH1	C	48 h	15 g/L	5	5	5
PAO1	C	48 h	15 g/L	5	5	5
Testigo	C	48 h	15 g/L	5	5	5
LCH1	C	24 h	30 g/L	5	5	5
PAO1	C	24 h	30 g/L	4	4	5
Testigo	C	24 h	30 g/L	4	4	5
LCH1	C	48 h	30 g/L	5	5	5
PAO1	C	48 h	30 g/L	5	5	5
Testigo	C	48 h	30 g/L	5	5	5

4.4 AISLAMIENTO DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTE

A partir de los consorcios productores de biosurfactante, con los cuales se obtuvieron los resultados de las Figuras 4 y 6, se realizó el aislamiento de las diferentes morfologías microbianas mediante la técnica de dilución por extinción y estría cruzada en agar soya y tripticaseína. Del consorcio LCH1 se aislaron 4 diferentes morfologías coloniales las cuales fueron identificadas como cepas 1A, 1B, 1C y 1D; mientras que del consorcio LCH3 se aislaron 3 diferentes morfologías coloniales identificadas como cepa 3A, 3B y 3C. En las Figuras 9 y 10 se presentan las fotografías de los aislados bacterianos.

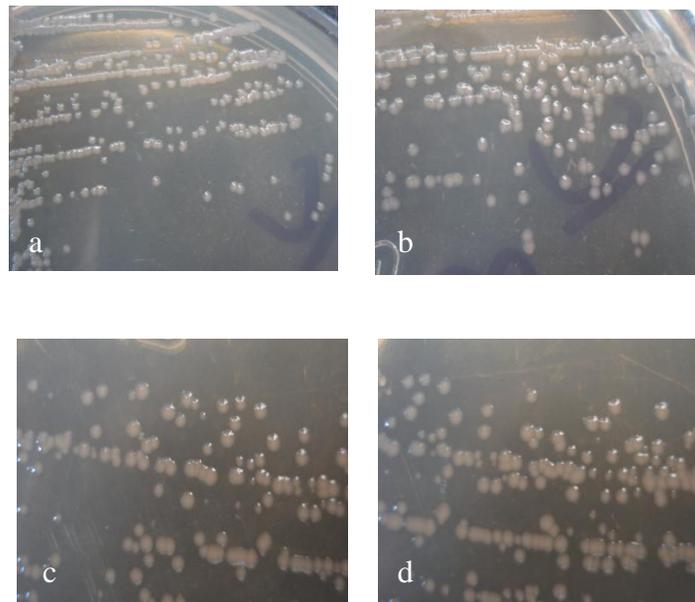


Figura 9. Aislados bacterianos obtenidos del consorcio LCH 1 a) cepa 1A, b) cepa 1B, c) cepa 1C y d) cepa 1D.

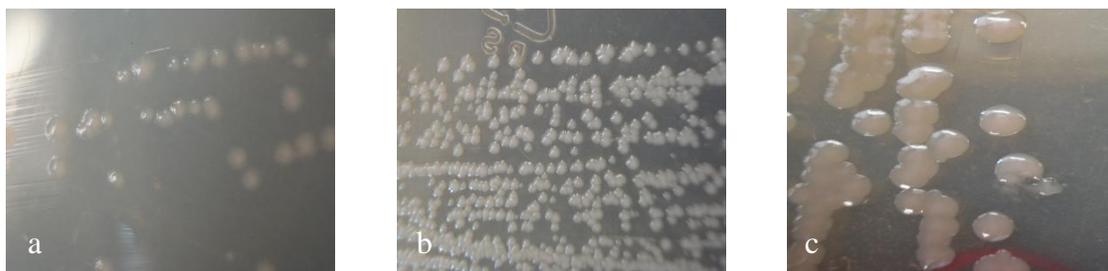


Figura 10. Aislados bacterianos obtenidos del consorcio LCH 3 a) cepa 3A, b) cepa 3B y c) cepa 3C.

4.5 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE AISLADOS BACTERIANOS PRODUCTORES DE BIOSURFACTANTE

A los aislados obtenidos se les identificó por su morfología colonial, se realizó tinción de Gram, prueba de oxidasa y catalasa, crecimiento en agar *Pseudomonas*, crecimiento en agar MacConkey, prueba de hemolisis, siembra en agar TSI, LIA, MIO, Citrato de Simmons, caldo RM-VP y caracterización bioquímica empleando kits de galerías API 20NE Biomérieux de acuerdo con especificaciones del proveedor.

De acuerdo con las pruebas realizadas, todas las cepas corresponden a bacilos medianos Gram negativos, esta característica posiblemente contribuya a la supervivencia de la población microbiana en ambientes extremos debido a que este tipo de bacterias están provistas de una membrana interna y una externa (Bicca *et al.*, 1999) (Figs. 11 y 12), catalasa y oxidasa positivos, con crecimiento positivo en agar MacConkey y agar *Pseudomonas* y capacidad de utilizar una gran variedad de fuentes de carbono incluidas en las galerías API 20NE Biomérieux, con excepción de la cepa 3B. Después de efectuar todas las pruebas, es de considerar que las cepas 1A, 1B, 1C, 1D, 3A y 3C dieron las mismas características bioquímicas por lo que es probable que sean el mismo género bacteriano (tabla 16 y 17), estos estudios preliminares indican que las cepas pertenecen al género *Pseudomonas sp*, sin embargo, esto se comprobará con los análisis complementarios de biología molecular. Cabe señalar, que las cepas 1A, 1B, 1C, 1D, 3A y 3C produjeron hemolisis completa en agar sangre, esta prueba se ha utilizado como análisis presuntivo para seleccionar organismos productores de biosurfactante (Safary *et al.*, 2010), aunque algunos otros estudios han reportado que no todos los biosurfactantes poseen actividad hemolítica (Youseff *et al.*, 2004) y algunas otras cepas tienen la capacidad de producir factores de virulencia que lisan los eritrocitos (Lin *et al.*, 1998).

Tabla 16. Características bioquímicas de las cepas aisladas del consorcio LCH1.

CEPAS AISLADAS A PARTIR DE CONSORCIOS PRODUCTORES DE BIOSURFACTANTE				
CARACTERÍSTICA	1A	1B	1C	1D
Catalasa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Oxidasa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Reducción de nitratos	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Indol	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Fermentación de glucosa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Hidrólisis de L-arginina	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Urea	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Hidrólisis de esculina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Hidrólisis de gelatina	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
PNPG	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
D-glucosa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
L-arabinosa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
D-manosa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
D-manitol	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
N-acetil-glucosamina	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
D-maltosa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Gluconato de potasio	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Ácido cáprico	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Ácido adipico	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Ácido málico	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Tabla 16. Continuaci on...

CARACTERÍSTICA	1A	1B	1C	1D
Citrato trisódico	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Ácido fenilacético	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Fermentaci on de la lactosa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Descarboxilaci on de lisina	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Descarboxilaci on de ornitina	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Producci on de H ₂ S	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Producci on de gas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Movilidad	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Rojo de metilo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Voges-Proskauer	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Hemólisis en agar sangre	Completa	Completa	Completa	Completa
Crecimiento en Mc Conkey	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Crecimiento en agar <i>Pseudomonas</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Morfología microscópica	Bacilos mediano	Bacilos mediano	Bacilos medianos	Bacilos medianos
Gram	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Tabla 17. Características bioquímicas de las cepas aisladas del consorcio LCH3.

CEPAS AISLADAS A PARTIR DE CONSORCIOS PRODUCTORES DE BIOSURFACTANTE			
CARACTERÍSTICA	3A	3B	3C
Catalasa	Positivo	Positivo	Positivo
Oxidasa	Positivo	Positivo	Positivo
Reducción de nitratos	Positivo	Positivo	Positivo
Indol	Negativo	Negativo	Negativo
Fermentación de glucosa	Negativo	Positivo	Negativo
Hidrólisis de L-arginina	Positivo	Positivo	Positivo
Urea	Positivo	Positivo	Positivo
Hidrólisis de esculina	Negativo	Positivo	Negativo
Hidrólisis de gelatina	Positivo	Negativo	Positivo
PNPG	Negativo	Positivo	Negativo
D-glucosa	Positivo	Positivo	Positivo
L-arabinosa	Positivo	Positivo	Positivo
D-manosa	Positivo	Positivo	Positivo
D-manitol	Positivo	Positivo	Positivo
N-acetil-glucosamina	Positivo	Positivo	Positivo
D-maltosa	Positivo	Positivo	Positivo
Gluconato de potasio	Positivo	Positivo	Positivo
Ácido cáprico	Positivo	Negativo	Positivo
Ácido adipico	Positivo	Negativo	Positivo
Ácido málico	Positivo	Positivo	Positivo

Tabla 17. Continuación...

CARACTERÍSTICA	3A	3B	3C
Citrato trisódico	Positivo	Positivo	Positivo
Ácido fenilacético	Negativo	Positivo	Positivo
Fermentación de la lactosa	Negativo	Positivo	Negativo
Descarboxilación de lisina	Positivo	Positivo	Positivo
Descarboxilación de ornitina	Positivo	Negativo	Positivo
Producción de H ₂ S	Negativo	Negativo	Negativo
Producción de gas	Negativo	Positivo	Negativo
Movilidad	Positivo	Positivo	Positivo
Rojo de metilo	Negativo	Positivo	Negativo
Voges-Proskauer	Negativo	Negativo	Negativo
Hemólisis en agar sangre	Completa	Parcial	Completa
Crecimiento en Mc Conkey	Positivo	Positivo	Positivo
Crecimiento en agar <i>Pseudomonas</i>	Positivo	Positivo	Positivo
Morfología microscópica	Bacilos medianos	Bacilos cortos	Bacilos corto
Gram	Negativo	Negativo	Negativo

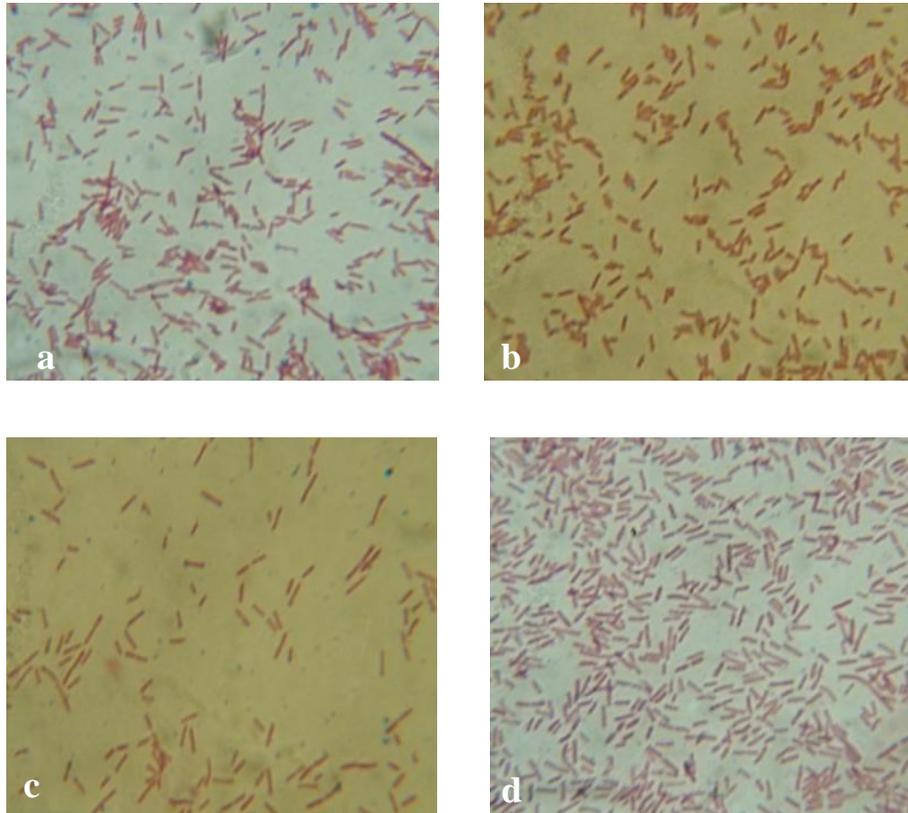


Figura 11. Morfología microscópica de los aislados provenientes del consorcio LCH1 tomadas en microscopio óptico a 1 000X a) cepa 1A, b) cepa 1B, c) cepa 1C y d) cepa 1D.

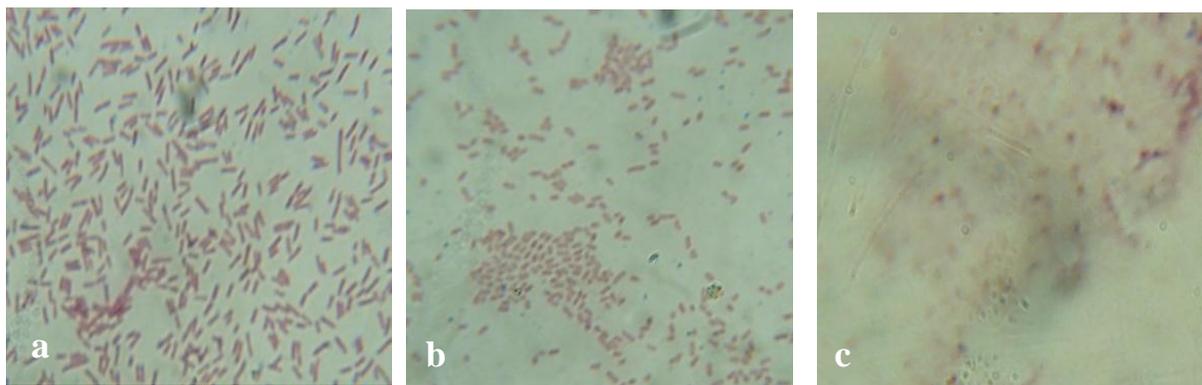


Figura 12. Morfología microscópica de los aislados provenientes del consorcio LCH3 tomadas en microscopio óptico a 1 000X a) cepa 3A, b) cepa 3B y c) cepa 3C.

4.6 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS CONSORCIOS Y CEPAS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTE

Para la observación de las morfologías bacterianas tanto de los consorcios LCH1C y LCH3A como de los aislados 1A, 1B, 1C, 1D, 3A, 3B y 3C se realizaron preparaciones y observaciones empleando el Microscopio Electrónico de Barrido Jeol JSM5310-LV.

En las Figuras 13 y 14 se presenta una micrografía a 7 500X de los consorcios LCH1C y LCH3A respectivamente, en donde se aprecian al menos cuatro diferentes tamaños de bacilos, la diferencia radica en la longitud de estos y algunos son curvos; además se aprecia un material mucoide que cubre a los microorganismos que probablemente sea lipopolisacárido o biosurfactante extracelular (Kumar, 2008).

En las Figuras 15 y 16 se muestran las micrografías electrónicas de las diferentes cepas, en donde se puede apreciar que todos los aislados están constituidos por bacilos medianos de alrededor de 1 μ de longitud y únicamente se aprecia la producción de material mucoide bacteriano en las cepas 1C y 3A.

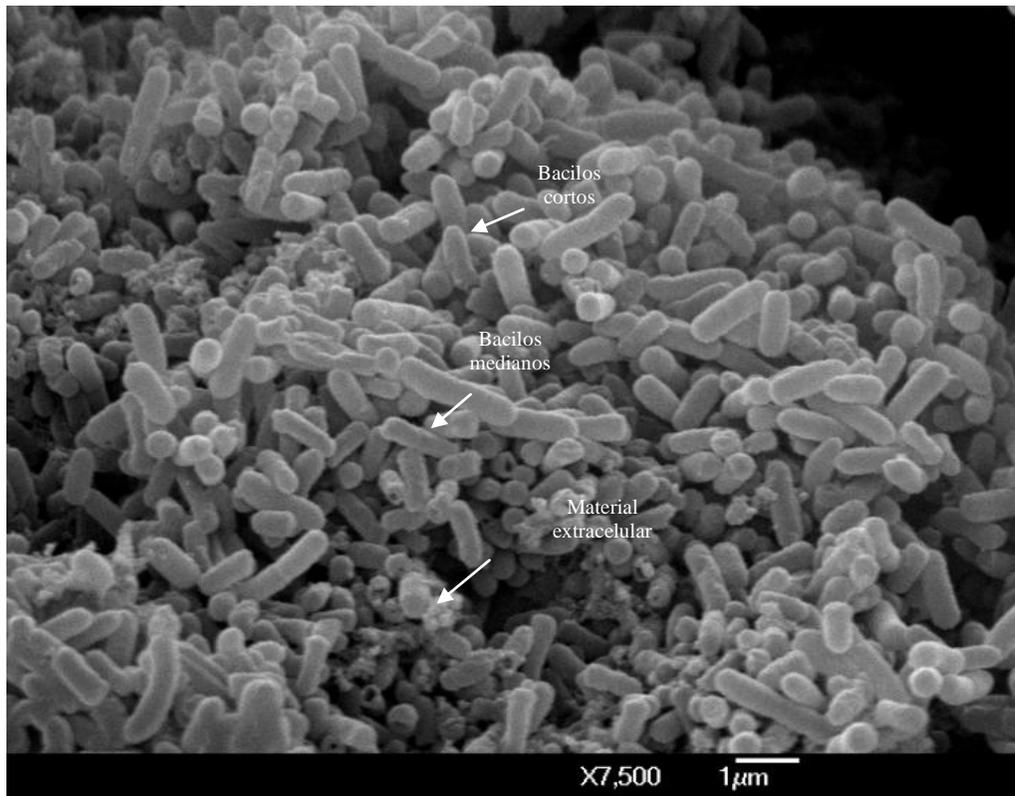


Figura 13. Micrografías electrónicas del consorcio LCH1C, donde se observan bacilos de diferentes longitudes, así como material extracelular.

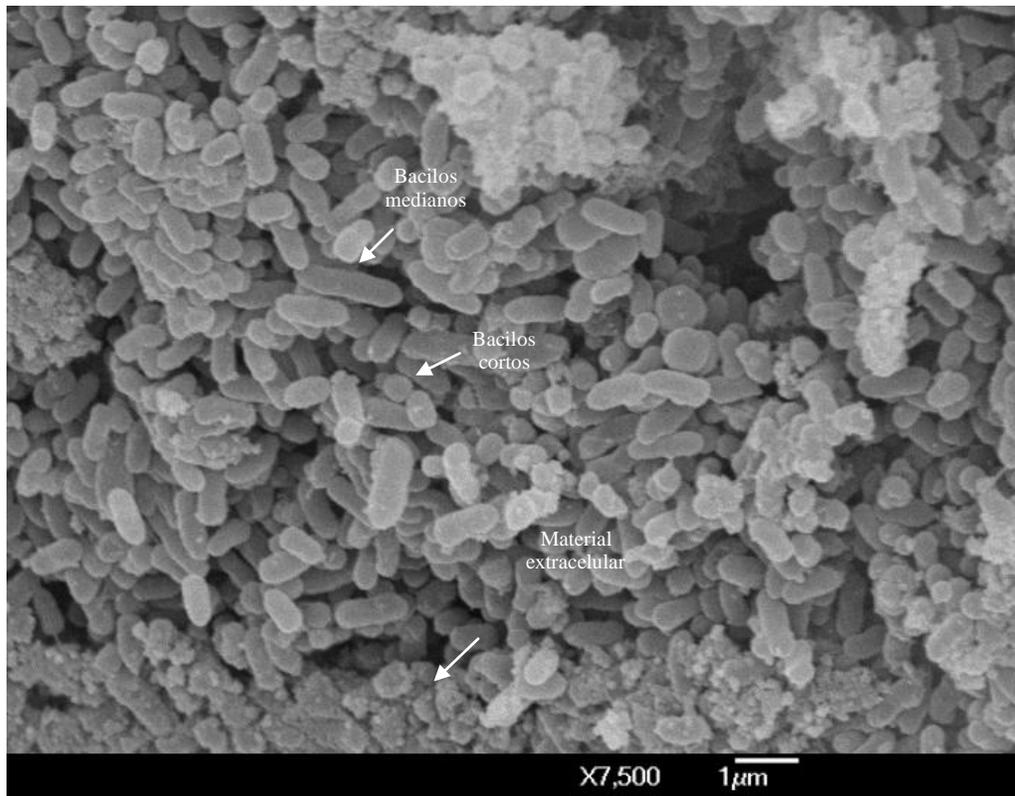


Figura 14. Micrografías electrónicas del consorcio LCH3A, donde se observan bacilos de diferentes longitudes, así como material extracelular.

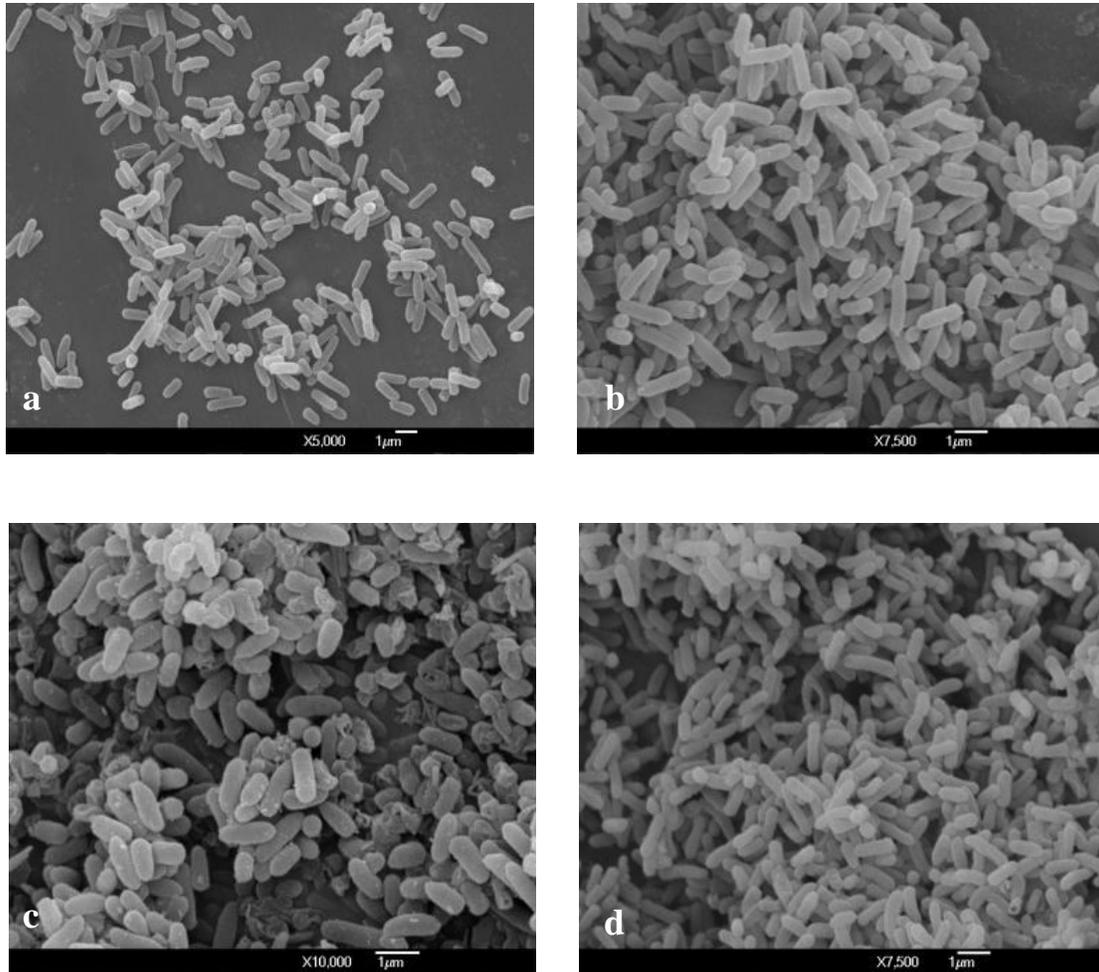


Figura 15. Micrografía electrónica de las cepas aisladas a) 1A, b) 1B, c) 1C y d) 1D, en las cuales se observan bacilos de alrededor de 1 μm de largo.

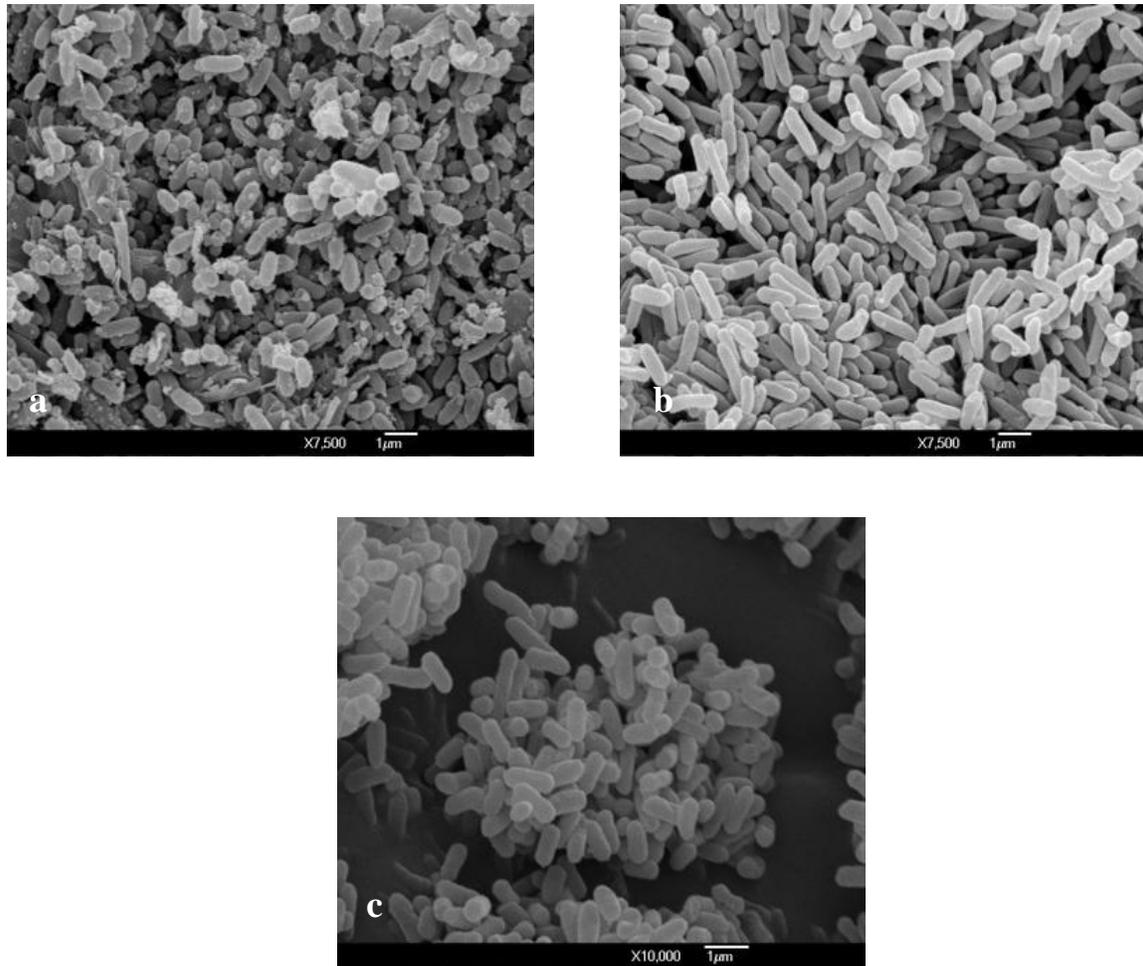


Figura 16. Micrografías electrónicas obtenidas de las cepas aisladas a) 3A, b) 3B y c) 3C, en las cuales se observan bacilos de alrededor de 1 μm de largo.

4.7 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS PRODUCTORES DE BIOSURFACTANTE

La identificación molecular de los microorganismos productores de biosurfactante aislados de los consorcios LCH1C y LCH3A se realizó comparando la secuencia del gen bacteriano para el RNAr 16S. En la tabla 18 se hace un compendio de los resultados obtenidos en cuanto a porcentos de similitud de las secuencias obtenidas en comparación con las secuencias pertenecientes a cada género y especie. La cepa 1A que solamente se obtuvo un porcentaje de similitud del 87 %, solamente se reporta como *Pseudomonas sp.*

Tabla 18. Resultados obtenidos a partir de la identificación molecular de las cepas productoras de biosurfactante.

Cepa	Porcentaje de similitud	Género y especie
1A	87 %	<i>Pseudomonas sp</i>
1B	99 %	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1C	98 %	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1D	98 %	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3A	99 %	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3B		Sin identificar
3C	99 %	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

En las figuras 17 a la 23 se muestran las secuencias de nucleótidos obtenidas tras la amplificación de parte del gen 16S RNAr de las cepas productoras de biosurfactante 1A, 1B, 1C, 1D, 3A, 3B, 3C y 3D respectivamente, así mismo, en las tablas 19 a la 25 se observan los diez mejores resultados obtenidos en la búsqueda BLAST en la secuencia de nucleótidos correspondientes a cada una de las cepas aisladas.

```
CGACTTATCGCGTTAGCTGCCCCCTAAGATCTCAAGGATCCCACGGCTAGTCGACCTCGTTTACGGGGTGGACTACCAC
GGTATCTAATCCTGTTTCTCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGATCCTTCCAGGTGGTCCCCCTTCCCACCTGG
TGTTCCCTCCTATATCTACGCATTTACCCACACCTACGAAATTCGCCCCCTCTACCCGTACTCTAGCTCCCTACTT
TTGGATGCCGTTCCAGGTTGAGCCCCGGGATTTACATCCCCTTGTGTAACCACCTACCCGCGCTTTACGCCAGTAAT
TCCATTAACGCGTGCCCCCTTCGTATTACCGCGCTGCTGGCACCAAGTAGCCCGTGCTTATCTGTGGTACGTCCAA
CCCCAGGTATCAATTACTGCCTTCCCCACCTTAAAGCGCCTTACCATCCAAACCTCTCACCACGCGCTGCCGGATCAG
GCTTCCCCCTTGCCCATATTCCCCCTGCCGCTCCAAGACTCTGACCCGTCATCCCCGCGCCAATCTCCTCCCACCA
```

Figura 17. Secuencia obtenida tras la amplificación de parte del gen 16S RNAr de la cepa 1A.

Tabla 19. Resultados obtenidos en el BLAST en la secuencia de nucleótidos correspondientes a la cepa 1A.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
FM997359.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 16sps25-2g08.q1ka	<u>606</u>	606	92%	4e-170	87%	
FM997305.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 16sps25-1f04.p1k	<u>606</u>	606	92%	4e-170	87%	
FM996869.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 16sps22-1a05.p1ka	<u>606</u>	606	92%	4e-170	87%	
FM996598.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 16sps19-4d03.p1k	<u>606</u>	606	92%	4e-170	87%	
FM996329.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 16sps18-2a07.p1ka	<u>606</u>	606	92%	4e-170	87%	
FM996115.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 16sps17-2d05.p1k	<u>606</u>	606	92%	4e-170	87%	
FM996035.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 16sps16-3h04.p1k	<u>606</u>	606	92%	4e-170	87%	
FM995937.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 16sps16-2c11.w2k	<u>606</u>	606	92%	4e-170	87%	
FM995931.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 16sps16-2c04.w2k	<u>606</u>	606	92%	4e-170	87%	
FM995908.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 16sps16-1g12.p1k	<u>606</u>	606	92%	4e-170	87%	
GU395986.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain SU-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>606</u>	606	92%	4e-170	87%	

TGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTCCGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTA
 F GTGGGGGATAACGTCCGGAACGGGCGCTAATACCGCATACTGCTCCTGAGGGAGAAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGC
 i TATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAGCATCCGTAAGTGGTCTGAGAG
 g ATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGRATATGGACAATGGGCGA
 u AAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATKGTAAAGCACTTAAAGTGGGAGGAAGGCAGTAA
 r GTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATARGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGG
 a GTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCA
 ACCTGGGAAGTGCATCCAAAATACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGT
 ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGTCGACTAGCCGTGGGATCCTGGAGATCTTAGGGGGGCGAG
 CTAACGCGATAAGTCGACCGCC

Figura 18. Secuencia obtenida tras la amplificaci on de parte del gen 16S RNAr de la cepa 1B.

Tabla 20. Resultados obtenidos en el BLAST en la secuencia de nucle otidos correspondientes a la cepa 1B.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HQ712124.1	Pseudomonas aeruginosa strain MYL-21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	
HQ609597.1	Pseudomonas sp. DG1b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	
HQ609593.1	Pseudomonas sp. DG2b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	
HQ674988.1	Bacterium C69(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	
HQ457019.1	Pseudomonas aeruginosa strain R2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	
HQ457018.1	Pseudomonas aeruginosa strain DSE2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	
HQ457014.1	Pseudomonas aeruginosa strain HSD1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	
HQ270549.1	Pseudomonas aeruginosa strain GPSD-59 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	
HQ658761.1	Pseudomonas aeruginosa strain nsm 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	
HQ641259.1	Pseudomonas sp. E6(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	

GGGAGCTTGCTCCTGGATTCGCGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCGGGA
AACGGGGCGTAATACCGCATAACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTC
GGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCCACTGGA
ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGC
CGCGTGTGTGAAGAAGGTCYTCGGATTGTAAAGCACYTAAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTT
GACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCcGCGGTRWTACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCGGGCTCMACCYGGGAACCTGCMTCCA
AAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGGCACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTG
GTAGTCCACGCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGAC
CGCCTGGGGAGTACGGCCCAAGG

Figura 19. Secuencia obtenida tras la amplificaci on de parte del gen 16S RNAr de la cepa 1C.

Tabla 21. Resultados obtenidos en el BLAST en la secuencia de nucle otidos correspondientes a la cepa 1C.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HM597240.1	Pseudomonas sp. MB65 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	98%	
HQ712124.1	Pseudomonas aeruginosa strain MYL-21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1483	1483	100%	0.0	98%	
HQ609597.1	Pseudomonas sp. DG1b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1483	1483	100%	0.0	98%	
HQ609593.1	Pseudomonas sp. DG2b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1483	1483	100%	0.0	98%	
HQ609592.1	Pseudomonas sp. DG2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1483	1483	100%	0.0	98%	
HQ143666.1	Pseudomonas aeruginosa strain ZAH18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1483	1483	100%	0.0	98%	
HQ143612.1	Pseudomonas aeruginosa strain RHH13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1483	1483	100%	0.0	98%	
HQ537785.1	Pseudomonas aeruginosa strain zxy0926 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1483	1483	100%	0.0	98%	
HQ697286.1	Pseudomonas aeruginosa strain P43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1483	1483	100%	0.0	98%	
HQ697285.1	Pseudomonas aeruginosa strain P28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1483	1483	100%	0.0	98%	
HQ697284.1	Pseudomonas aeruginosa strain P22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1483	1483	100%	0.0	98%	

GCTTGCTCCTGGATTCCGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACG
GGCGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGAT
TAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCcGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGgAAC
TGAGACACGGTCCAGACTCcTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCG
CGTGTGTGAAGAAGTCTTCGGGATGTAAAGCACTTTAAGTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGTGTTTGA
CGTTACCAACAGAATAGGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAAGGGGGCAAGCGGTTAATCGGAA
TTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTGAGCAAGGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCA
AAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCCTAGATATAGGAAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGCACTGAGGTGGGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAACGATGTGGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGGGGCGCAGCTAACGGGATAAGTCGAC
CGCC

Figura 20. Secuencia obtenida tras la amplificaci3n de parte del gen 16S RNAr de la cepa 1D.

Tabla 22. Resultados obtenidos en el BLAST en la secuencia de nucle3tidos correspondientes a la cepa 1D.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
GU294304.1	Pseudomonas aeruginosa strain SJ-3 clone 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1408	1408	100%	0.0	98%	
HQ712124.1	Pseudomonas aeruginosa strain MYL-21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1402	1402	100%	0.0	98%	
HQ609597.1	Pseudomonas sp. DG1b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1402	1402	100%	0.0	98%	
HQ609593.1	Pseudomonas sp. DG2b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1402	1402	100%	0.0	98%	
HQ609592.1	Pseudomonas sp. DG2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1402	1402	100%	0.0	98%	
HQ609591.1	Pseudomonas sp. DG1a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1402	1402	100%	0.0	98%	
HQ143666.1	Pseudomonas aeruginosa strain ZAH18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1402	1402	100%	0.0	98%	
HQ143612.1	Pseudomonas aeruginosa strain RHH13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1402	1402	100%	0.0	98%	
HQ537785.1	Pseudomonas aeruginosa strain zxy0926 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1402	1402	100%	0.0	98%	
HQ697286.1	Pseudomonas aeruginosa strain P43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1402	1402	100%	0.0	98%	
HQ697285.1	Pseudomonas aeruginosa strain P28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1402	1402	100%	0.0	98%	
HQ697284.1	Pseudomonas aeruginosa strain P22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1402	1402	100%	0.0	98%	
HQ697283.1	Pseudomonas aeruginosa strain P21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1402	1402	100%	0.0	98%	

ATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTCCGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGT
 CCGGAAACGGGCGTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCT
 AGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACA
 CTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGC
 CATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGCGAGTAAGTTAATACCTTGCT
 GTTTKACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGTTGCAAGCGTTAAT
 CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCA
 TCCAAAAC TACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTASATATAGGAAGGA
 ACACCAGTGGCGAAGGCGACCCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGGGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATAC
 CCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAG

Figura 21. Secuencia obtenida tras la amplificaci3n de parte del gen 16S RNAr de la cepa 3A.

Tabla 23. Resultados obtenidos en el BLAST en la secuencia de nucle3tidos correspondientes a la cepa 3A.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HQ712124.1	Pseudomonas aeruginosa strain MYL-21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1452	1452	100%	0.0	99%	
HQ609597.1	Pseudomonas sp. DG1b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1452	1452	100%	0.0	99%	
HQ609593.1	Pseudomonas sp. DG2b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1452	1452	100%	0.0	99%	
HQ609592.1	Pseudomonas sp. DG2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1452	1452	100%	0.0	99%	
HQ143666.1	Pseudomonas aeruginosa strain ZAH18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1452	1452	100%	0.0	99%	
HQ143612.1	Pseudomonas aeruginosa strain RHH13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1452	1452	100%	0.0	99%	
HQ697286.1	Pseudomonas aeruginosa strain P43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1452	1452	100%	0.0	99%	
HQ697285.1	Pseudomonas aeruginosa strain P28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1452	1452	100%	0.0	99%	
HQ697284.1	Pseudomonas aeruginosa strain P22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1452	1452	100%	0.0	99%	
HQ697283.1	Pseudomonas aeruginosa strain P21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1452	1452	100%	0.0	99%	

```
AGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGG
AAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCCTCAAGACCAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTGCCTCAGATGTGCCAGAT
GGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAgGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGAtGACCAGCCACACTgG
AACTGAGACACGGTcGAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAtGCACAATGGgCGCMAGCCTGATGCAGCCMT
GCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGtTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTGTGGTTAATAACCCSCAGCAA
TTGACGTTACSCGCAGAAgGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACSGgAgGGGTGCAAGCGTTAaT
CSGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGgCSGTCTGTCAaGTCSGATGTGAAATCCCSGGGCTCAaCCTGGgAACTGCW
TTCgAAACTGGCAGGCTAAAGTCTGTAGAGGGGGGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTGAGATCTGGAGGA
ATACCGGTGGCGAAGGC GGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGGACTTGGAGGTTGTGCCCTGGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGT
CGACCGCCTGGGAGTACGGCCG
```

Figura 22. Secuencia obtenida tras la amplificación de parte del gen 16S RNAr de la cepa 3B.

Tabla 24. Resultados obtenidos en el BLAST en la secuencia de nucleótidos correspondientes a la cepa 3B.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HQ143573.1	Enterobacter sp. strain YT4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1415	1415	100%	0.0	97%	
HQ651840.1	Enterobacter cloacae subsp. dissolvens strain M940 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1415	1415	100%	0.0	97%	
HQ651837.1	Enterobacter cloacae subsp. dissolvens strain M354 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1415	1415	100%	0.0	97%	
HQ692906.1	Enterobacter sp. qdp0502 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1415	1415	100%	0.0	97%	
HQ236088.1	Pantoea agglomerans strain TBT3-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1415	1415	100%	0.0	97%	
HQ236072.1	Pantoea agglomerans strain TAT3-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1415	1415	100%	0.0	97%	
HQ236063.1	Pantoea agglomerans strain TAG2-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1415	1415	100%	0.0	97%	
HM162426.1	Enterobacter cloacae subsp. dissolvens strain 478 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1415	1415	100%	0.0	97%	
HM165189.1	Leclercia sp. RF042 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1415	1415	100%	0.0	97%	
GU979185.1	Enterobacter cloacae subsp. dissolvens strain M425 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1415	1415	100%	0.0	97%	

AGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTCCGCGGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGAT
AACGTCCGAAAACGGGCGCTAATACCCGCATACGTCTGAGGGAGAAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATG
FAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAG
iTCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATATKGGACMATGGGCGAAAGCCTGAT
CCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACYTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACC
gTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAAATAAGCACCGGCTAACCTTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCG
uTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCcGGGCTCAACCTGGGAA
CTGCATCCAAAACACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGTGGTGGAAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGG
rAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
aGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGGCGAGCTAACGCGA
TAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG

2
F

Figura 23. Secuencia obtenida tras la amplificaci on de parte del gen 16S RNAr de la cepa 3C.

Tabla 25. Resultados obtenidos en el BLAST en la secuencia de nucle otidos correspondientes a la cepa 3C.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HQ712124.1	Pseudomonas aeruginosa strain MYL-21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1517	1517	100%	0.0	99%	
HQ609597.1	Pseudomonas sp. DG1b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1517	1517	100%	0.0	99%	
HQ609593.1	Pseudomonas sp. DG2b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1517	1517	100%	0.0	99%	
HQ609592.1	Pseudomonas sp. DG2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1517	1517	100%	0.0	99%	
HQ143612.1	Pseudomonas aeruginosa strain RHH13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1517	1517	100%	0.0	99%	
HQ697286.1	Pseudomonas aeruginosa strain P43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1517	1517	100%	0.0	99%	
HQ697285.1	Pseudomonas aeruginosa strain P28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1517	1517	100%	0.0	99%	
HQ697283.1	Pseudomonas aeruginosa strain P21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1517	1517	100%	0.0	99%	
HQ674988.1	Bacterium C69(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1517	1517	100%	0.0	99%	
HQ457019.1	Pseudomonas aeruginosa strain R2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1517	1517	100%	0.0	99%	

Todos los aislados productores de biosurfactante recuperados a partir de las muestras de hidrocarburo LCH1, LCH2 y LCH3 corresponden al género *Pseudomonas aeruginosa*, que es capaz de utilizar varias fuentes de carbono como glicerol, manitol, fructosa, glucosa para producir biosurfactantes del tipo ramnolípidos (Rashedi *et al.*, 2005 y Abouseoud *et al.*, 2007), estos resultados se relacionan con el análisis estructural realizado mediante microscopía electrónica, en donde se observa una sóla morfología celular en forma bacilar característica del género *Pseudomonas*. Este género bacteriano ha sido aislado a partir de hidrocarburo obtenido de un campo petrolero ubicado en Egipto, localizado en el Golfo de Suecia (El Marsafy 2010), en donde, de acuerdo con experimentos realizados en una columna de arena simulando las características litológicas del pozo, se observó un incremento en la eficiencia de recuperación de hidrocarburo del 20%. Al igual, Adelzadeh *et al.*, (2010) logró el aislamiento de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* productora de biosurfactante a partir de muestras de roca limeston-dolomita colectadas a diferentes profundidades del pozo Bibihakimeh ubicado en Irán, donde se encontró un máximo de eficiencia de recuperación de hidrocarburo de 30% cuando se incubo el núcleo rocoso con una solución de biosurfactante durante 1 semana. Sulbarán *et al.*, 2005 estudió la producción de biosurfactante por cepas pertenecientes al grupo de *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de muestras de emulsión de crudo pesado venezolano.

4.8 PRUEBA PRELIMINAR DE PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE EN MEDIO DE CULTIVO PPGAS

Debido a que los consorcios microbianos LCH1C y LCH3A perdieron la capacidad de producir biosurfactante en los medios de cultivo C y A respectivamente, se procedió a cambiar el medio de cultivo a PPGAS modificado y se probó la producción de biosurfactante de cada uno de los aislados, para esto, se inoculó una colonia bacteriana dentro de matraces conteniendo medio PPGAS y se incubó a 40°C con agitación de 115 rpm. Posteriormente se realizó la prueba de dispersión de gota a las 24 y 48 h, los resultados se muestran en la tabla 26.

Se decidió modificar el medio de cultivo PPGAS al sustituir la glucosa por melazas debido a que esta última es un sustrato de menor precio y además porque contiene compuestos como carbohidratos (48-56 %), proteínas (2-4 %), compuestos nitrogenados (0.3-0.6 %),

fosforo (0.6-2.0 %) e iones metálicos como potasio (1.5-5 %), calcio (0.4-0.8 %), magnesio (0.06%) y algunos factores de crecimiento como biotina (1-3 mg/kg), inositol (2 500-6 000 mg/kg) y tiamina (1.8 mg/kg) (Maneerat, 2005), los cuales son esenciales para el crecimiento microbiano y producción de biosurfactante (Raza, 2008). Así mismo, al ser un medio de cultivo deficiente en sales de fosfato, se han obtenido excelentes resultados en la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* (Ballot, 2009), ya que estas sales pueden funcionar como inhibidores de su síntesis (McInerney *et al.*, 2007).

Tabla 26. Prueba preliminar de producción de biosurfactante en medio de cultivo PPGAS de las cepas aisladas.

Cepa	Prueba de dispersión de gota (mm)					
	24 h			48 h		
1A	9	9	10	19	18	18
1B	15	15	17	37	35	35
1C	14	15	15	21	21	23
1D	10	10	10	29	30	32
3A	20	20	22	29	29	32
3B	9	9	10	9	9	9
3C	7	7	9	15	15	17
Testigo	8	7	7	7	7	7

Según los resultados de la tabla 26, las cepas 1A, 1B, 1C, 1D, 3A y 3C tienen la capacidad de producir biosurfactante en el medio de cultivo PPGAS modificado a las 24 y 48 h. En la Figura 24 se presentan las fotografías tomadas de los matraces de prueba en donde claramente se observa crecimiento microbiano y producción de espuma que es una característica de los surfactantes.

A pesar de que las cepas 1A, 1B, 1C, 3A y 3C pertenecen al género *Pseudomonas aeruginosa* (tabla 18), presentan diferencias en la producción de biosurfactante dado por la amplitud del halo de emulsión en la prueba de dispersión de gota. Solamente la cepa 3B fue una no productora de biosurfactante y se caracteriza por que su morfología colonial y algunas pruebas bioquímicas fueron diferentes a las cepas productoras.

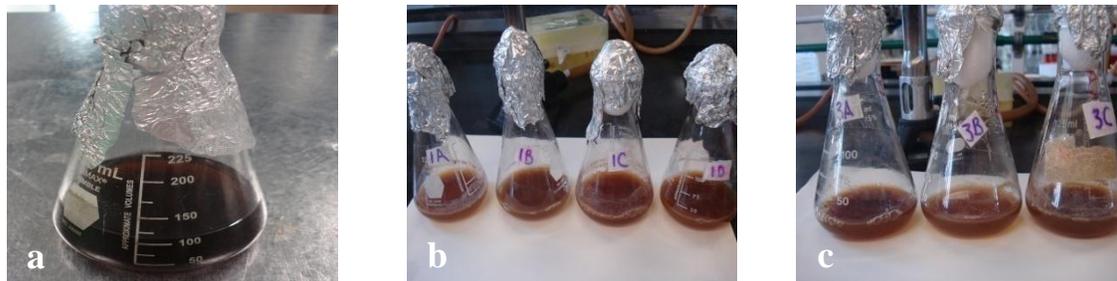


Figura 24. Imágenes donde se muestra el crecimiento microbiano en el medio de cultivo PPGAS después de incubarse a 40°C durante 48 h a) Blanco, b) inoculado con las cepas 1A, 1B, 1C y 1D y b) inoculado con las cepas 3A, 3B y 3C.

4.9 CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE EN MEDIO DE CULTIVO PPGAS

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 26, se seleccionó la cepa 1B para efectuar su cinética de crecimiento y producción de biosurfactante ya que fue la que produjo mayor halo de dispersión (35 mm a las 48 h de incubación). El halo de dispersión está directamente relacionado con la cantidad de biosurfactante producido, incrementando el halo de emulsión en la prueba de dispersión de gota de 7 mm en el testigo negativo a 36 mm a las 48 h de incubación, valores mucho mayores considerando los obtenidos por Sakalle, 2009 con un máximo de 12 mm de halo de dispersión a los 7 días de incubación.

Para la estandarización del inóculo bacteriano se partió de la cepa 1B crecida de 48 h de una placa petri con agar soya y tripticaseína y se realizó una suspensión bacteriana. Posteriormente se realizó la dilución de ésta para que se obtuviera una concentración de 1×10^7 bacterias/mL en un matraz con medio de cultivo PPGAS.

En la figura 25 se presenta la cinética de crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa 1B en medio de cultivo PPGAS, en donde se observa que la fase de crecimiento exponencial comienza a las 4 hrs y termina a las 24 h de incubación. Durante esta fase comienza la producción de biosurfactante a las 20 h y se va incrementando considerablemente hasta obtener un punto máximo de producción en la fase estacionaria (36 h de incubación), de ahí permaneció relativamente constante hasta las 48 h de incubación. Esto revela que la producción de biosurfactante no se encuentra ligada al

crecimiento microbiano y sugiere que se trata de un metabolito secundario (Bagheri *et al.*, 2009 y Gharaei-Fathabad, 2011, Déziel, 1996), en caso particular, la producción de ramnolípidos por bacterias del género *Pseudomonas* es típica de un metabolito secundario y se incrementa considerablemente en la fase estacionaria (Santa Anna *et al.*, 2002).

CURVA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN BIOSURFACTANTE CEPA 1B

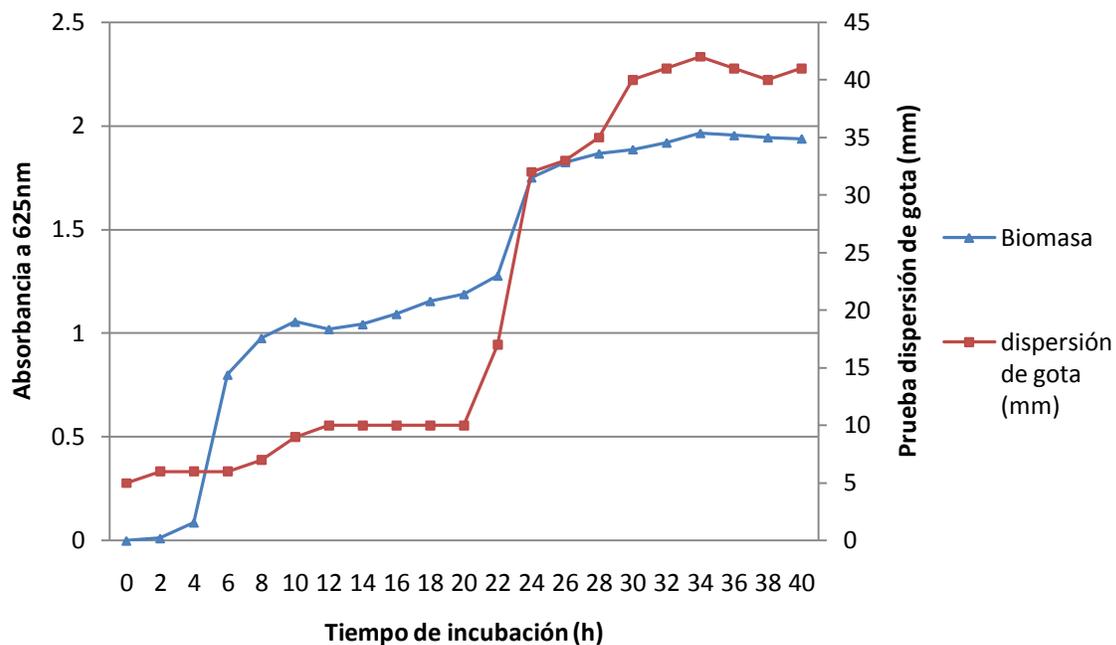


Figura 25. Cinética de crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa 1B en medio de cultivo PPGAS.

En las imágenes presentadas en la Figura 26 se observan los resultados de la prueba de dispersión de gota durante la cinética de crecimiento microbiano y producción de biosurfactante, a mayor halo de dispersión es mayor la cantidad de biosurfactante producido.

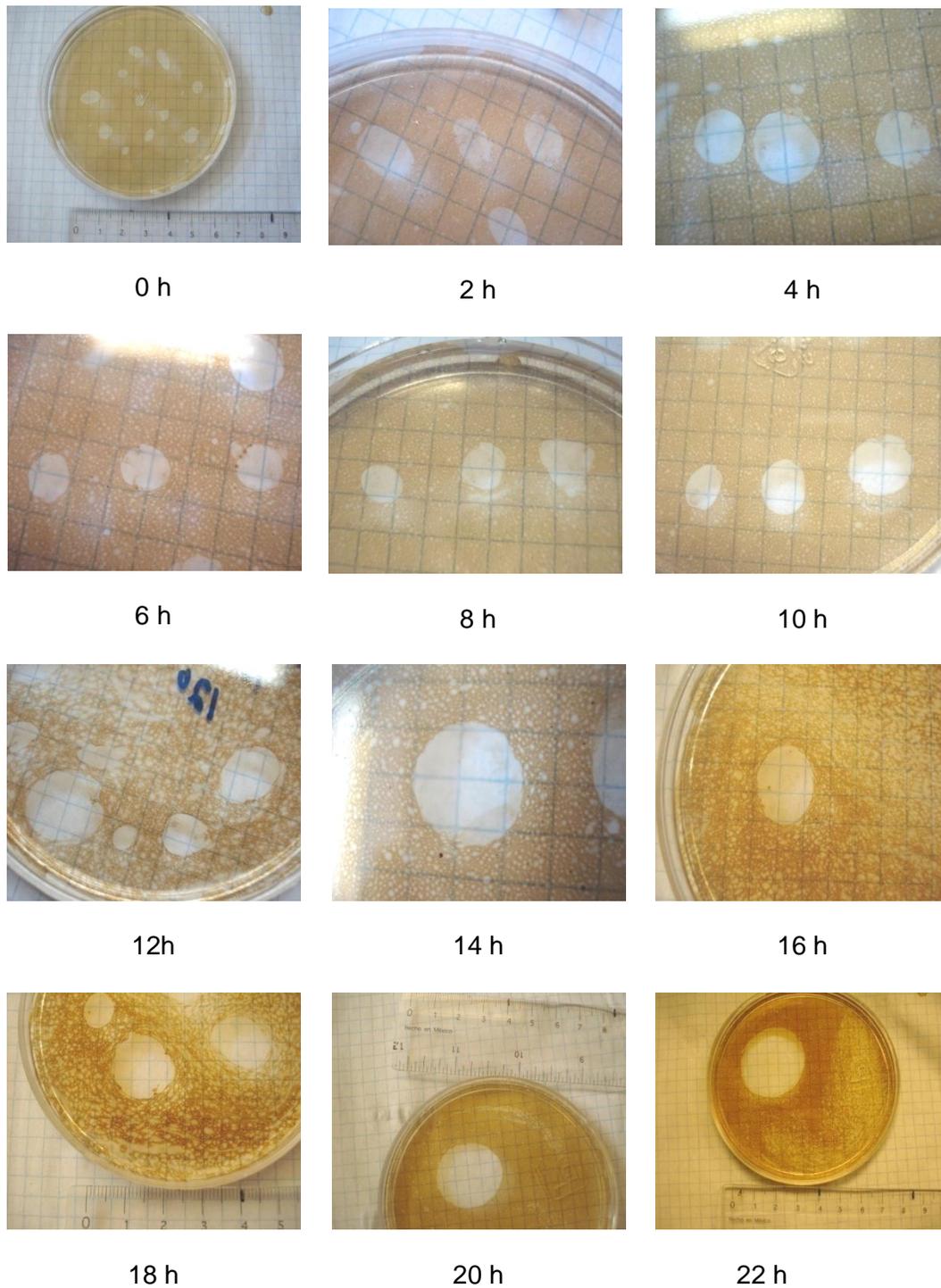
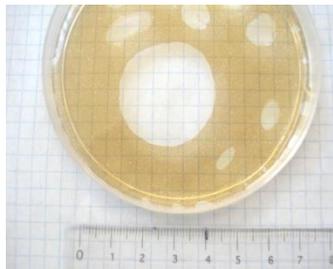
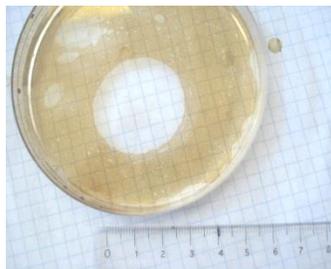


Figura 26. Prueba de dispersión de gota durante la cinética de producción de biosurfactante.

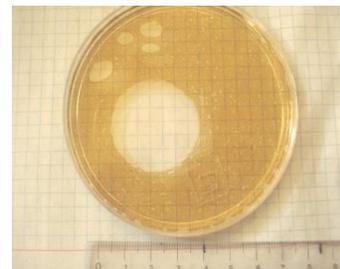
Figura 26. Continuación...



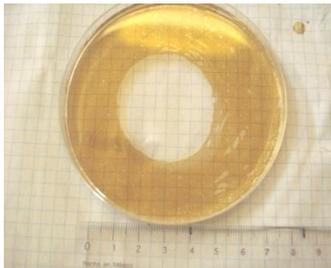
24 h



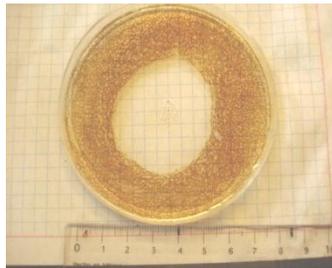
26 h



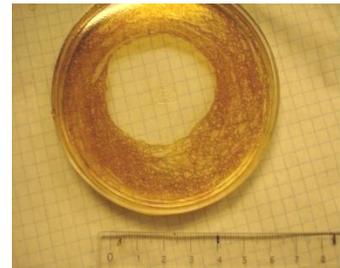
28 h



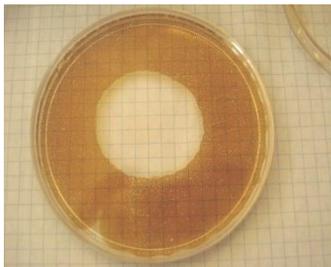
30 h



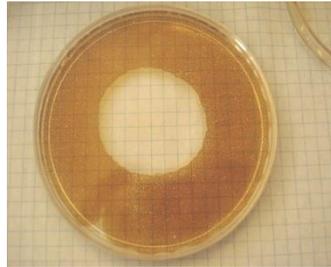
32 h



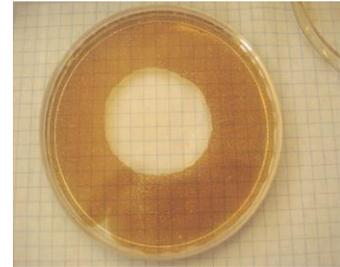
34 h



36 h



40 h



48 h

4.10 MEDICIÓN DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL

Se realizó la determinación de la tensión superficial empleando un tensiómetro Fisher Scientific a las 24, 40 y 48 h de incubación de la cepa 1B en medio de cultivo PPGAS. En la tabla 27 se presentan los resultados de la determinación de tensión superficial, en donde se aprecia una disminución de ésta de 60 mN/m en el testigo negativo a alrededor de 40 mN/m en el tiempo de 40 y 48 h, esto corresponde a una disminución del 33.3 %.

Tabla 27. Determinación de la tensión superficial a los tiempos 24,40 y 48 h empleando la cepa 1B en el medio de cultivo PPGAS.

Muestra	Cepa	T (h)	Y[mN/m]
1	1 B	24 h	40.5
2	Testigo	24 h	60.6
3	1 B	40 h	39.3
4	Testigo	40 h	61.9
5	1B	48 h	39.9
6	Testigo	48 h	61.6

En comparación con estos resultados, Nitschake *et al.*, 2004 obtuvo siete aislados microbianos pertenecientes al género *Bacillus sp* que fueron capaces de reducir la tensión superficial del medio de cultivo conteniendo melaza como fuente de carbono después de 72 h de incubación de 41.74 mN/m a un promedio de 34.97 mN/m, lo que corresponde a una disminución aproximada del 16 %, que es menos efectivo en relación al porcentaje de disminución obtenido con la cepa 1B, sin embargo, en otros medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono se han encontrado mayores eficiencias, como en los experimentos llevados a cabo por Viramontes-Ramos S, *et al.*, 2010 donde se obtuvo un 61 % de disminución de tensión superficial de 69.97 mN/m a 27.7 mN/m utilizando una cepa autóctona de *Pseudomonas aeruginosa*. Por otro lado, Jaques, 2008 reportó una disminución de la tensión superficial de 69.2 a 36.2 mN/m con un aislado de *Pseudomonas citronellolis* después de 48 días de incubación. La variabilidad en el nivel de expresión en la síntesis de biosurfactante se encuentra determinada por la genética de los microorganismos, condiciones ambientales y naturaleza de los sustratos (Thaniyavarn *et al.*, 2006).

4.11 PRUEBA DE ESTABILIDAD TÉRMICA DEL BIOSURFACTANTE

Para evaluar la estabilidad del biosurfactante se tomó en consideración la estabilidad térmica. Para esto, el sobrenadante obtenido después de 48 h de incubación a 40 ° C de la cepa 1B en medio PPGAS modificado fue expuesto a 50, 60, 70, 80, 100 y 121°C durante 1 h. En la tabla 28 se muestran los resultados de este experimento.

Tabla 28. Prueba de estabilidad térmica del biosurfactante obtenido a partir de la cepa 1B en medio de cultivo PPGAS modificado.

Temperatura (°C)	Testigo negativo	Sobrenadante cepa 1B
	Tensión superficial (mN/m)	
Sin tratamiento	57.05	34.62
50	57.74	34.65
60	56.59	34.78
70	56.91	34.30
80	56.93	34.71
100	57.63	34.91
121	57.56	33.24

De acuerdo con estos resultados, es posible considerar que el biosurfactante producido por la cepa 1B es termoestable en un rango de temperatura entre 50 y 121°C. Este mismo resultado fue obtenido por Moura de Luna *et al.*, 2009 al evaluar la estabilidad del biosurfactante producido por *Candida glabrata* en un intervalo de temperatura de 40 a 80°C. Los resultados obtenidos por Brown M.J. (1991) utilizando un biosurfactante obtenido de un aislado identificado como 1165 mostró una reducción en la tensión superficial en el sobrenadante celular cuando fue expuesto a una temperatura entre 0 y 4°C, aunque la exposición a altas temperaturas (100 a 121°C) no afecta los valores de tensión superficial. Por otro lado, Makkar *et al.*, 2002 observaron la estabilidad en la tensión superficial después de la exposición del biosurfactante producido por *Bacillus subtilis* a 100°C.

4.12 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA (CMC)

La eficiencia de un biosurfactante para reducir la tensión superficial expresada por el valor de la concentración micelar crítica (CMC), este parámetro representa la concentración de biosurfactante donde la reducción en la tensión superficial alcanza niveles a los cuales comienzan a formarse micelas supramoleculares y vesículas y donde incrementos en la concentración de biosurfactante ya no provoca una alteración en la tensión superficial, debido a que el biosurfactante se encuentra saturado en la fase acuosa (Ballot, 2009). Además, el conocimiento de la CMC es de gran interés debido a que a concentraciones por arriba de este valor, la absorción del biosurfactante en la superficie de la roca se incrementa ligeramente. Esto es, el valor de CMC representa la concentración de biosurfactante en la cual ocurre su máxima absorción en la roca de los yacimientos petroleros (Schramm, 2000).

Se ha comprobado que muchos biosurfactantes presentan valores de CMC de 10 a 40 veces por debajo de los surfactantes sintéticos (Lang *et al.*, 1998), lo que indica que son más eficientes que los surfactantes sintéticos, debido a que se necesitan menores concentraciones para dispersar una solución con una fase insoluble.

Para la determinación de la CMC se realizó una solución de 10 000 mg/L de extracto crudo de biosurfactante obtenido a partir de un cultivo microbiano de la cepa 1B en medio de cultivo PPGAS modificado. Posteriormente se realizaron diluciones de la misma y se determinó su tensión superficial por triplicado utilizando el método de DuNouy (Tabla 29). El cálculo de la CMC se basa en el cálculo de esta mediante la aplicación de una distribución Guassiana en la gráfica de concentración de biosurfactante Vs segunda derivada de la tensión superficial. En la Figura 27 se presentan las gráficas que se manejan para el cálculo de la CMC.

Tabla 29. Medición de la tensión superficial a diferentes concentraciones de biosurfactante para determinar el valor de la CMC.

Biosurfactante (ppm)	Tensión superficial (mN/m)
50	71.184
250	70.530
500	70.233
750	68.960
1000	67.588
1100	62.021
1250	63.591
1400	60.533
1500	61.795
1600	57.030
1750	57.923
1900	55.854
2000	55.621
2500	50.761
5000	44.652
7500	41.898
10000	38.965

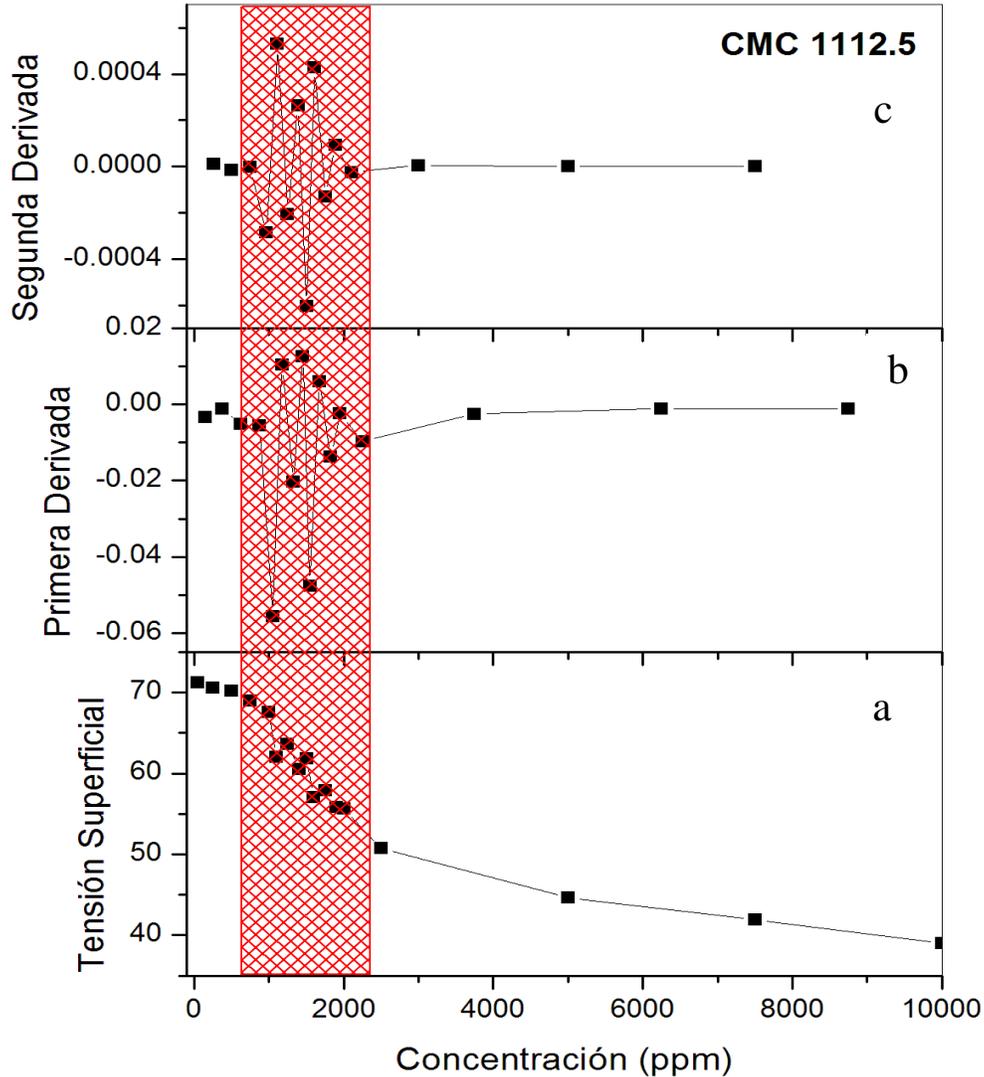


Figura 27. a) Gráfico de concentración de biosurfactante en relación a la tensión superficial, b) Gráfico de concentración contra primera derivada de la tensión superficial y c) Gráfico de concentración en relación a la segunda derivada de la tensión superficial y cálculo de la CMC.

El valor obtenido de CMC para el biosurfactante producido por la cepa 1B fue de 1112.5 mg/L, acorde con estos resultados es posible indicar que es un biosurfactante que presenta baja efectividad y eficiencia, ya que la mayoría de los ramnolípidos presentan una CMC entre 10 a 200 mg/L (Vasileva-Tonkova *et al.*, 2005 y Pattanathu *et al.*, 2010), esto a pesar de que los resultados preliminares obtenidos en la prueba de dispersión de gota daban una perspectiva de ser un excelente biosurfactante. Sin embargo, aún

presenta valores por debajo de algunos surfactantes sintéticos empleados en la industria petrolera como es el caso del Cloruro de Cetil Trimetil Amonio (CTAB) y Dodecil Bencen Sulfato de sodio con un valor de CMC de 5 500 y 1 932 mg/L respectivamente (Torres *et al.*, 2011).

4.13 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOSURFACTANTE

La concentración de biosurfactante producida por la cepa 1B en medio de cultivo PPGAS modificado, se evaluó indirectamente mediante la determinación de subunidades de ramnosa por un método colorimétrico específico (Dische y Shettles (1948), considerando que se trata de un biosurfactante tipo ramnolípido que es producido por microorganismos del género *Pseudomonas aeruginosa*. (Tahzini *et al.*, 2004).

En la figura 28 se presenta la curva de calibración de absorbancia a 396 nm con respecto de la concentración de ramnosa. En ésta se obtuvo un valor de R cuadrado de 0.9701.

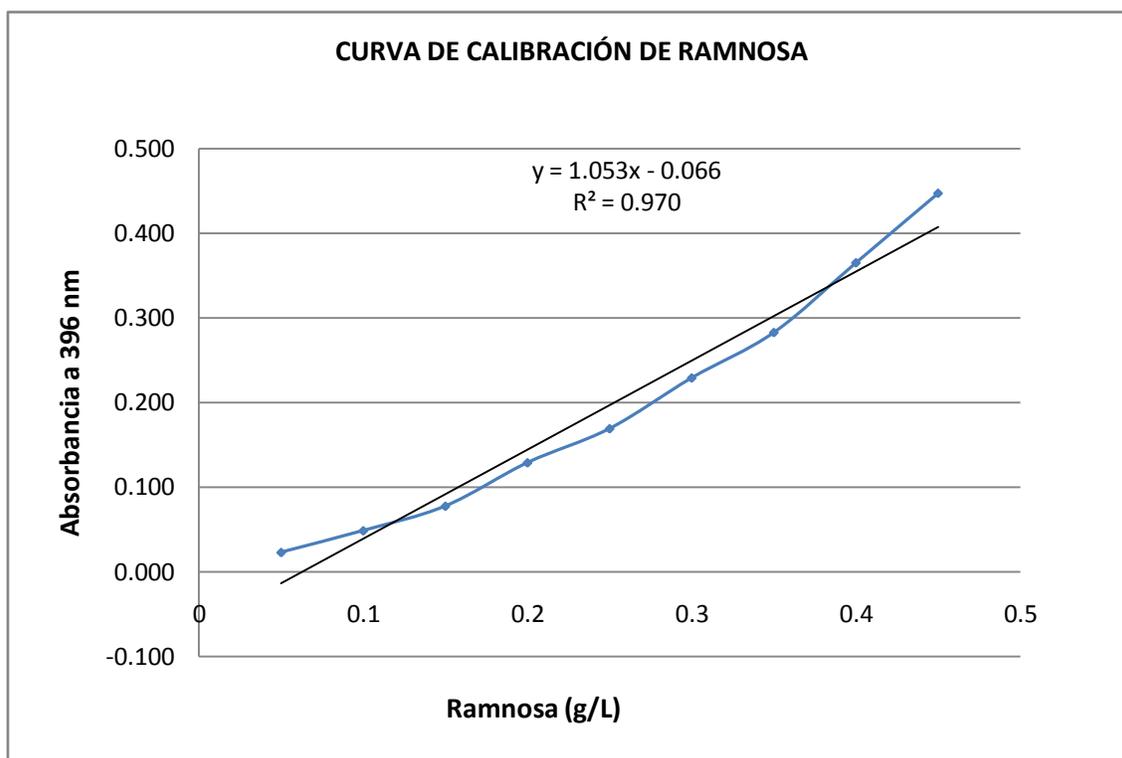


Figura 28. Curva de calibración de absorbancia a 396 nm con respecto a la concentración en g/L de ramnosa.

Tabla 30. Resultados obtenidos a partir de la determinación de ramnosas mediante el método de Dische y Shettles (1948) del parcial purificado de biosurfactante.

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE		
	Problema	Testigo
Promedio de absorbancias	0.4156	0.2672
Ramnosa (g/L)	0.46	0.32
Ramnosa total (g/L)	0.140	
Ramnosa 1g extracto crudo (g)	0.00084	
Ramnosa (mg/L de medio de cultivo)	26.306	

De acuerdo con la absorbancia obtenida a partir de la parcial purificación del biosurfactante y a su interpolación en la curva de calibración, se calculó una tasa de producción de biosurfactante de 26 mg/L de medio de cultivo PPGAS (tabla 30). Como se mencionó anteriormente, la producción de biosurfactante se encuentra afectada por varios factores abióticos como pH, temperatura, presión, salinidad, agitación y oxígeno disuelto; factores nutricionales como es el caso de la fuente de nitrógeno y carbono y algunos iones (Al-Araji *et al.*, 2009) y factores bióticos como características de la cepa productora (Panesar *et al.*, 2011) que ocasionan diversificaciones en las tasas de producción reportadas bibliográficamente. Para dar algunos datos, Rashedi H (Rashedi *et al.*, 2006) obtuvo 150 mg/L de biosurfactante de tipo ramnolípido a partir de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de un yacimiento Iraní, después de 7 días de incubación a 30°C, en el caso de diferentes fuentes de carbono utilizadas para la producción de ramnolípidos (Rashedi *et al.*, 2005) se han encontrado producciones por arriba del valor obtenido para la cepa 1B, donde una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* fue capaz de producir 138 mg/L de ramnosa utilizando hexadecano como fuente de carbono. Así mismo, con glicerol se obtuvo una producción de 690 mg/L antes de realizar la optimización del medio de cultivo de producción. Pero en el momento en que se ajusto la relación entre las concentraciones de carbono y nitrógeno a 20/1 según los requerimientos de las cepas a evaluar, se obtuvieron producciones entre 1 000 y 1 470 mg/L de ramnosa.

4.14 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL BIOSURFACTANTE MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

Se realizó el análisis de espectroscopia de infrarrojo del biosurfactante en el rango de número de onda de 650 y 4 000 cm^{-1} que corresponde al infrarrojo medio (Macho, 2002) en un espectrómetro por transformada de Fourier marca Nicolet modelo Nexus 470 FT-IR.

En la figura 29 se presenta el espectrograma correspondiente al análisis del extracto crudo de biosurfactante, en donde se observan dos bandas a 1 627 y 1 555 cm^{-1} que corresponden al enlace C-N como parte del enlace peptídico dentro de una amida secundaria, es posible que esta banda de origen polipeptídico aparezca debido a que el extracto crudo de biosurfactante presenta debritos celulares. Otra banda ancha a 3 193 cm^{-1} correspondiente al enlace O-H y la amplitud de la banda se debe a la alta presencia

de puentes de hidrógeno. La banda presente a 2 978 es asignada a la tensión simétrica del enlace C-H de los grupos $-CH_2$ y CH_3 de las cadenas alifáticas. Las bandas ubicadas en las regiones de 1 463 y 1 396 cm^{-1} corresponde a los movimientos de flexión del enlace C-H saturado y por último, el pico de absorción presente a 1 041 cm^{-1} es característica de los movimientos de deformación del enlace C-O relacionado con la presencia de polisacáridos en el biosurfactante (Bagheri *et al.*, 2009).

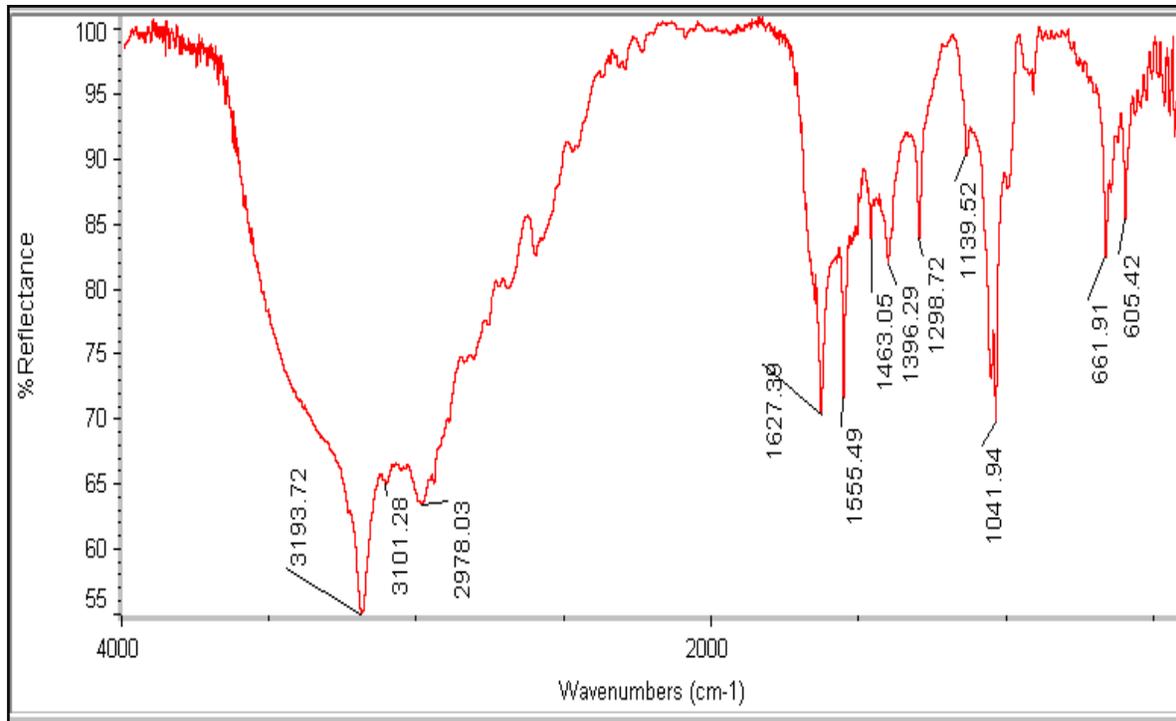


Figura 29. Espectro de infrarrojo obtenido a partir del extracto crudo de biosurfactante producido por la cepa 1B de *Pseudomonas aeruginosa*.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Considerando los resultados obtenidos en el presente estudio, se llegó a las siguientes conclusiones:

A partir de muestras de hidrocarburo obtenidas del campo Chicontepec fue posible el aislamiento de consorcios microbianos aerobios productores de biosurfactante en dos diferentes medios de cultivo que contienen melaza y glucosa como fuentes de carbono.

De los consorcios microbianos LCH1 y LCH3 se aislaron 6 cepas productoras de biosurfactante en medio de cultivo PPGAS modificado con melaza como fuente de carbono.

Las cepas aisladas 1A, 1B, 1C, 1D, 3A y 3C, son capaces de crecer en agar *Pseudomonas* y MacConkey, producen hemólisis completa en agar sangre, metabolizan todos los carbohidratos contenidos en las galerías API 20 NE Biomeréux y tienen forma bacilar de alrededor de 1 μm de longitud. Los resultados del análisis mediante biología molecular confirman que la especie a la cual pertenecen todas las cepas aisladas es *Pseudomonas aeruginosa*.

La cepa 1B comienza la producción de biosurfactante a las 20 h de inoculación en la fase exponencial tardía a 40 °C 115 rpm y presenta un máximo de producción en la fase estacionaria a las 36 h.

Después de 48 h de incubación de la cepa 1B en medio de cultivo PPGAS modificado, se produjo un promedio de biosurfactante de 26 mg/L de medio de cultivo (determinada por unidades de ramnosa), lo que indica una pobre producción por lo que es conveniente realizar una optimización del medio de cultivo para obtener la máxima producción de biosurfactante.

El biosurfactante producido por la cepa 1B es capaz de reducir la tensión superficial del medio de cultivo PPGAS modificado de 60.6 mN/m a 39.9 mN/m lo que indica una reducción de alrededor del 33%. Esto indica que el producto sí tiene la capacidad de disminuir la tensión superficial y que podría ser utilizado en los procesos "in situ", sin

embargo, para llegar a este punto es necesario realizar evaluaciones de las características de los pozos a tratar, caracterización del hidrocarburo extraído de los pozos, tipos de flujo del sistema, etc.

El biosurfactante producido por la cepa 1B es termoestable dentro del rango de temperatura de 50 a 121°C y posee una CMC de 1 112.5 mg/L, valor que se encuentra muy por arriba del rango establecido para biosurfactantes del tipo ramnolípidos (10 a 200 mg/L). En cuanto a la información que nos da la termoestabilidad, es posible indicar que el biosurfactante podría introducirse dentro del pozo petrolero sin riesgo a que pudiera degradarse y perder su efectividad.

El biosurfactante producido por la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* mediante su caracterización química por espectroscopia de Infrarrojo reveló la presencia de los grupos funcionales OH en el grupo carboxilo, C-H saturado formando parte de cadenas alifáticas, enlace C-O proveniente de polisacáridos y enlace C-N formando parte de enlaces peptídicos como contaminante. En este paso, es recomendable realizar una caracterización química total del biosurfactante mediante Espectrometría de Masas en sus modalidades Inyección directa, impacto electrónico y FAB (Fast Atom Bombardier) con el fin de conocer la molécula completa del biosurfactante.

BIBLIOGRAFÍA

Abalos A., Pinazo A., Infante R., Casals E., García F. y Manresa A. (2001). Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* 17, 1367-1371.

Abouseoud M., Maachi R y Amrane A. (2007). Biosurfactant production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens*. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. A Méndez-Vila (Ed). 340-347.

Adelzadeh M.R., Roostaazad R., Kamali M.R y Bagheri Lotfabad T. (2010). A technical feasibility analysis to applied *Pseudomonas aeruginosa* MR01 biosurfactant in microbial enhanced oil recovery of low-permeability carbonate reservoir of Iran. *Chemistry and Chemical Engineering*. 17(1):46-54.

Akhavan Sepahy A., Mazaheri Assadi M., Saggadian V y Noohi A. (2005). Producci3n de biosurfactant from Iranian oil fields by isolated Bacilli. *International Journal of Environmental Science and Biotechnology*. 1(4):287-293.

Al-Araji L., Rahman R., Basri M y Salleh A. (2007). Microbial surfactant. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 15(3):99-105.

Ali Raza Z., Saleem M., Khalid Z y Rehman A. (2006). Production Kinetics and Tensioactive Characteristics of Biosurfactant from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant grown on waste frying oil. *Biotechnol.* 28. 1623-1631.

Amani H., Reza H., Hossein M., Haghoghi M y Reza M. (2009). Scale up and application of Biosurfactant from *Bacillus subtilis* in Enhances Oil Recovery. *Appl Biochem Biotechnol.*
Amarnath A. (1999) Enhanced Oil Recovery Scoping Study. Final Report. EPRI Company.

Amézcu a C., Ferrera R., Esparza F., Ríos E. y Rodríguez R. (2004). Effect of combined nutrients on biosurfactant produced by *Pseudomonas putida*. *J. Environ. Sci. Health*. 39. 2983-2991.

Araujo F., Melo A., Loureiro A., Ramos R., Piacsek C y Guimaraes. (2007). Oxygen-controlled Biosurfactant Production in a Bench Scale Bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol.* 147. 33-45.

Bagheri T., Shourian M., Roostaazad R., Rouholamini A., Reza M y Akbari K. (2009). An Efficient Biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, Isolated from Oil Excavation Area in South of Iran. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces.* 1-11.

Ballot F. (2009). Bacterial production of antimicrobial biosurfactant. Tesis. Department of Process Engineering at the University of Stellenbosch.

Banat I.M. (1995). Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource Technol.* 51, 1–12.

Bicca F.C., Fleck L.C y Ayub M.A.Z. (1999). Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Rev. Microbiol.* 30:231-236.

Bodour A., Guerrero-Barajas C., Jiorle B., Paull K., Somogyi A., Trinh N., Bates B. y Maier M. (2004). Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium sp.* Strain MTN11. *Appl. Environ. Microb.* 70, 114-120.

Brown M.J. (1991). Biosurfactant for cosmetic applications. *International Journal of Cosmetic Science.* 13:61-64.

Brown L, y Vadie, A. (2001). Slowing Production Decline and Extending the Economic Life of an Oil Field new MEOR Technology. *Society of Petroleum Engh.* 2000.

Bryant S., Stepp K., Bertus M., Burchfield E. y Dennis, M. (1993). Microbial-enhanced waterflooding field pilots. *Dev. Petr. Sci.,* 39, 289-306.

Das P., Mukherjee S y Sen R. (2009). Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. *Bioresource Technology.* 100:1015-1019.

Delgado N., Ysambertt F., Montiel C., Chavez G., Caceres A., Bravo B y Marquez N. (2007). Evaluation of Oil-in water Emulsions with Non-ionic and Anionic Surfactant Mixtures for Potential Use in the Oil Industry. Rev. Tec. Ing. Univ. Zulia. 30:2 118-127.

Dejun D., Chenglong L., Quanyi J., Pingcang W. (1999) Systematic Extensive laboratory Studies of Microbial EOR Mechanisms and Microbial EOR Application Results in Changqing Oilfield. Society of Petroleum Engineers. 54380. 1-9.

Desai J y Banat I. (1997) Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 61:1 47-64.

Emegwalu C. (2009). Surfactant Flooding as a Possibility for the Norne E-segment. Norwegian University of Science and Technology. Department of Petroleum Engineering and Applied Geophysics.

Farouq S y Thomas S. (1994). A Realistic Look at Enhanced Oil Recovery. Scientia Iranica. 1:3. 219-230.

Fonseca R., Silva., De Franca F., Cardoso V y Servulo C. (2007). Optimizing Carbon/Nitrogen ratio for Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* Strain. 07. 136-140.

Georgiou G., Lin C y Sharma M. (1992). Surface-active compounds from microorganisms. Bio-technol. 10. 60-65.

Gharaei-Fathabad E. (2011). Biosurfactants in pharmaceutical industry: a mini-review. American Journal of Drugs Discovery and Development. 1(1):58-69.

Ghojavand H., Vahabzadeh F., Mehranian y Radmerh M. (2008). Isolation of thermotolerant, halotolerant, facultative biosurfactant-producing bacteria. Appl Microbiol Biotechnol. 80:1073-1085.

Guerra-Santos L., Kappeli O. y Fiechter A. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. Appl. Environ. Microb. 48. 301-305.

Hitzman O and Dennis M. (2004) Recent Successes: MEOR using synergistic H₂S Prevention and Increased Oil Recovery System. Society of Petroleum Eng.

Hou Z., Wu X., Wang Z., Han P., Wang Y, Xu Y y Jin R. (2005) The Mechanism and Application of MEOR by *Brevibacillus brevis* and *Bacillus cerius* in Daqing Oilfield. Society of Petroleum Engineers. 97469. 1-9.

Informe de reservas de hidrocarburo PEMEX enero 2009

Informe de reservas de hidrocarburo PEMEX enero 2010

Javaheri D., Jenneman E., McInerney J. y Knapp M. (1985). Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. Appl. Environ. Microb. 50: 698-700.

Jiménez D., Medina S y Gracida J. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. Rev. Int. Contam. Ambient. 26:1 65-84.

Joshi S., S. Yadav, A. Nerurkar, and A. J. Desai. (2007). Statistical optimization of medium components for the production of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* K51. J. Microbiol. Biotechnol. 17:313-319.

Joshi S., Bharucha C., Jha S., Yadav S., Nerurkar A y Desai A. (2008). Biosurfactant Production Using Molasses and Whey Under Thermophilic Conditions. Bioresource Technology. 99:195-199.

Karanth K., Deo G. y Veenanadig K. (1999). Microbial production of biosurfactants and their importance. Current Science. 77: 116-126.

Katime I., Quintana J y Villacampa M. (2003). Micelas. Revista Iberoamericana de Polímeros. 4:2. 123-151.

Lake L y Walsh M. (2008) Enhanced Oil Recovery Field Data Literature Search. Department of Petroleum and Geosystems Engineering University of Texas at Austin.

Lang S y Philip J P. (1998). Surface-active lipids in rhodococci. *Antonie Van Leeuwenhoek* 74:59-70.

Lazar I., Stefanescu M., and Dobrota C. (1992). MEOR, the suitable bacterial inoculum, according to the kind of technology used: results from Romania's last 20 year s' experience. Society of Petroleum Engh.

Lidsey R. (1997). Final Report Annex XIII-Microbial Enhanced Oil Recovery. The Department of Energy of the United States of America and the Ministry of Energy and Mines of Republic of Venezuela.

Lin S.C., Lin K.G., Lo C.C y Lin Y.M. (1998). Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutants. *Enzyme Microb. Technol.* 23:267-273.

Makkar S. and Cameotra S. (1997), Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *J. Ind. Biotechnol.* 18, 37-42.

Makkar R.S y Cameotra S.S. (2002), An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied and Environmental Microbiology.* 58:428.

Maneerat S. (2005). Production of biosurfactant using substrates from renewable-resources. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 27(3):675-683.

Maqsood A y Usman A. (2008). Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) with Special Emphasis to the "Uneconomical Reserves". Society of Petroleum Engineers. 113272. 1-14.

Maure A., Agurto A., y Rámirez A. (2005). Biotechnology application for EOR in Talara off-shore oil fields, Northwest Peru. V INPEGET 2005 (EXPL-3-AA-26).

Mayol M. (2005). Caracterización Geoquímica de los Aceites de la Cuenca de Chicontepec. Tesis. Escuela Superior de Ingenieria y Arquitectura IPN.

McInerney M.J., Knapp R.M., Duncan K., Simpson D.R., Youssef N., Ravi N., Folmsbee M.J., Finsher T., Maudgalya S., Davis J y Weiland S. (2007). Development of an *in situ* biosurfactant production technology for enhanced oil recovery. Final report. Department of Botany and Microbiology, University of Oklahoma.

Mohammad A., Mabrouk M y Abdel-Haleem. (2008). Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. Appl Biochem Biotechnol. 150:305-325.

Moura de Luna J., Sarubbo L y Campos-Takaki G. (2009). A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of stability and application in oil recovery. Brazilian Archives of Biology and Technology. 52(4):785-793.

Muhammad J. (1994). Isolation and Characterization of Oil degrading Microorganisms and their Possible Role in Enhanced Oil Recovery. Thesis. Department of Biological Sciences Quaid-I-Azam University Islamabad.

Muñoz-Colunga*, T. Roldán-Carrillo y P. Olguin-Lora. (2005). Recuperación mejorada de hidrocarburos vía microbiana. Instituto Mexicano del Petróleo. III encuentro participación de la mujer en la ciencia.

Nagase K, Zhang S.(2001). Improvement of Sweep efficiency by microbial EOR process in Fuyu Oilfield, China. Society of Petroleum Engh.

Nitschke M., Costa S.G.V. y Conteiro J. (2005a). Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. Biotechnol. Prog. 21, 1593-1600.

Nelson J. & Launt, P. D. (1991). Stripper well production increased with MEOR treatment. Oil & Gas J., 89, 114-18.

Nitschake M., Ferraz C y pastore G. (2004). Selection of microorganisms from biosurfactant production using agroindustrial wastes. Brazilian Journal of Microbiology. 35:81-85.

Nunizawati F., Yahya A., Md Sahell M., Suhaimi N y Hui Xuan C. (2009). Production of biosurfactant by locally isolated thermophilic facultatively anaerobic bacteria strain B160. Universiti Teknologi Malaysia. Biology Department Faculty of Science.

Onbasli D y Aslim B. (2009). Biosurfactant production in sugar beet molasses by some *Pseudomonas spp.* J. Environ. Biol. 30(1):161-163.

Patel R.M y Desai A. J. (1997). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. Letters in Applied Microbiology. 25:91-94.

Peláez R. (2009). Recuperación Mejorada de Petróleo. Energía Global. PetroQuimex. 54-59 p.

Rahman P y Gakpe. (2008). Production, Characterisation and Applications of Biosurfactant-Review. Biotechnology. 7:2. 360-370.

Raiger L y López N. (2009). Los Biosurfactantes y la Industria Petrolera. Química Viva. Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Ecología Bacteriana, Departamento de Química Biológica. FCEyN. 145-161.

Rangel E. (2011). Energía a debate. Marzo-abril. 43:16-20.

Rashedi H., Jamshidi E., Mazaheri Assadi M y Bonakdarpour B. (2005). Environmental importance of rhamnolipid production from molasses as a carbon source. Int. J. Environ. Sci. Tech. 2(1):59-62.

Rashedi H., Jamshidi E., Mazaheri Assadi M y Bonakdarpour B. (2006). Biosurfactant production with glucose as a carbon source. Chem. Biochem. Eng. Q. 20(1):99-106.

Rismani E., Fooladi J y Ebrahimi Por G.H. (2006). Biosurfactant production in batch culture by a *Bacillus licheniformis* isolated from The Persian Gulf. Pakistan Journal of Biological Science. 9(13):2498-2502.

Robert M., Mercadé M., Bosch P., Parra J., Espuny J., Manresa M. y Guinea J. (1989). Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol. Lett.* 11, 871-874.

Safary A., Roayayi ardakani M., Abolhasani Suraki A., Akbarzade M y Motamedi H. (2010). Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from Caspian Sea. *Biotechnology.* 9(3):378-382.

Sakalle K. (2009). Isolation of Crude Oil Degrading Marine Bacteria and Assessment for Biosurfactant Production. *The Internet Journal of Microbiology.* 7(2).

Salehizadeh H y Mohammadizad. (2009) Microbial Enhance Oil Recovery Using Biosurfactant Produced by *Alcaligenes faecalis*. *Iranian Journal of Biotechnology.* 7:4.216-223.

Santa Ana L.M., Sebastian G.V., Menezes E.P., Alves T.L.M., Santos A.S., Pereira Jr N and Freine D.M.G. (2002). Production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. *Brazilian journal of Chemical Engineering.* 19(2):159-166.

Samadi N., Abadian N., Akhavan A., Reza Faseli M., Tahzibi A y Jamalifar H. (2007). Biosurfactant production by the strain isolated from contaminated soil. *Journal of Biological Science.* 7(7):1266-1269.

Schramm L. (2000) *Surfactants: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry.* Cambridge University Press. Cambridge, RU. 621 pp.

Soberón G., Lépine F y Déziel E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 68. 718-725.

Sulbarán M., Bahsas A., Velásquez W y Rojas J. (2005). Caracterización de Biosurfactantes Producidos por *Pseudomonas fluorescens* Aisladas de Emulsiones de Petróleo Pesado. *Ciencia.* 13:2. 228-239.

Sustersick J. (2004). S íntesis y Caracterizaci ón de un Surfactante Tipo G émelo. T ésis ESIQUIESyldatk C., Lang S., Matulovic U. y Wagner F. (1985). Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkenes or glycerol by resting cell of *Pseudomonas* species DSM 2874. Z. Naturforsch. C. 40. 61-67.

Thaniyavarn J., Chongchin A., Wanitsuksombut N., Thaniyavarn S., Pinphanichakarn P., Leepipatpiboon L y Morikawa M. (2006). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* A41 using palm oil as a carbon source. J. Gen. Appl. Microbiol. 52:215-222.

Tugba S. (2008). Effects of Fe-Mg Limitations and Physiological Factors on *P. aeruginosa* Rhamnolipid. Journal of Applied Biological Science 2:31-34.

Tugrul T y Cansunar E. (2005). Detection Surfactant-producing Microorganisms by the Drop-collapse Test. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21. 851-853.

Vadie A. y, James O. (1996). Utilization of Indigenous Microflora in Permeability Profile Modification of Oil Bearing Formations, Society of Petroleum Engh.

Van Bogaert I., Saerens K., De Muyne C., Develter D y Soetaert W. (2007) Microbial Production and Application of Sophorolipidos. Appl Microbiol Biotechnol. 76. 32-43.

Viramontes-Ramos S., Portillo-Ru íz M.C., Vallinas-Casarrubias M.L., Torres-Mu ñoz J.V., Rivera-Chavira B.E y Nev árez-Moorill ón G.V. (2010). Selection of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated soil. Brazilian Journal of Microbiology. 41:668-675.

Yousef N.H., Duncan K.E., Nagle D.D., Savage K.H., Knapp R.M y McInerney. (2004). Comparasion of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. J. Microbiol. Methods. 56:339-347.

Youssef N., Simpson D., Duncan K., McInerney M., Folmsbee M., Fincher T y Knapp R. (2007). In situ Biosurfactant Production by Bacillus Strains Injected Into a Limestone petroleum Reservoir. Applied and Environmental Microbiology. 73:4. 1239-1247.

Zahid S., Khan H y Zahoor M. (2007) A Review on Microbial Enhanced Oil Recovery With Special Reference to Marginal/uneconomical Reserves. Society of Petroleum Engineers. 107052. 1-8.

Zekri A, Almehaideb R, Chaalal O. (1999) Project of Increasing Oil Recovery from UEA Reservoirs Using Bacteria Flooding. Society of Petroleum Engh.

ANEXO I

