



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA



**“Prospección de microorganismos marinos
productores de biosurfactantes provenientes de
columna de agua y sedimentos del Golfo de México”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

PRESENTA

MB DANIEL MORALES GUZMÁN

Cuernavaca, Morelos

Mayo 2020

Índice

Índice	II
Capitulo 1. Introducción	1
Capitulo 2. Antecedentes.....	3
2.1 Explotación de petróleo en un nuevo yacimiento.....	4
2.2 Recuperación mejorada de petróleo.....	5
2.3 Tipos de biotensoactivos	8
2.4 Función de los biotensoactivos	9
2.4.1 Concentración micelar crítica.....	10
2.4.2 Balance hidrofílico-lipofílico	11
2.5 Ventajas y desventajas del uso de biosurfactantes.....	12
2.6 Antecedentes directos.....	14
Capitulo 3. Justificación, Hipótesis y Objetivos.....	15
3.1 Justificación	15
3.2 Hipótesis	15
3.3 Objetivo General.....	16
3.3.1 Objetivos específicos	16
Capitulo 4. Estrategia experimental	17
Capitulo 5. Aislamiento de microorganismos de sedimentos con capacidad de producción de biosurfactantes del Estuario de Coatzacoalcos.....	18
5.1 Lugar de muestreo.....	19
5.1.1 Estuario de Coatzacoalcos	19
5.2 Aislamiento de microorganismos marinos.....	20
5.3 Selección de microorganismos productores de biosurfactante.....	21
5.4 Resultados y discusión.....	22
5.4.1 Colección de muestras de sedimento marino del Estuario de Coatzacoalcos.	22
5.4.2 Caracterización de las zonas de muestreo	22
5.4.3 Aislamiento de microorganismos de sedimentos marinos	25
5.4.4 Selección de microorganismos productores de biosurfactante.....	26
5.5 Conclusiones.....	33
Capítulo 6. Selección de medios de cultivo para el aislamiento de microorganismos de columna de agua y sedimentos provenientes del Golfo de México con actividad biotensoactiva y bioemulsificante	34
6.1 Golfo de México	34

6.1.2 Zona 2. Escarpe y Cinturón Plegado Perdido.....	34
6.2 Factores que afectan la producción de biosurfactante.....	35
6.2.1 Fuente de carbono	35
6.2.2 Fuente de nitrógeno	36
6.2.3 Condiciones de fermentación.....	36
6.3 Rutas metabólicas para la producción de biosurfactantes	37
6.4 Metodología	40
6.5 Resultados	43
6.5.1 Gradientes fisicoquímicos del Golfo de México	44
6.5.2 Cultivos enriquecidos	44
5.4.1 Efecto de las fuentes de Carbono, Medio mineral y tipo de consorcio	52
6.6 Conclusiones.....	54
Capítulo 7. Prospección de microorganismos marinos productores de biosurfactantes del Golfo de México	55
7.1 Zona 3. Bahía de Campeche en el Golfo de México	55
7.2 Materiales y métodos.....	56
7.2.1. Toma de muestra en las campañas oceanográficas.....	56
7.2.2 Preparación de cultivos enriquecidos	58
7.3 Resultados y discusión.....	58
7.4 Conclusiones.....	64
Capítulo 8. Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes.....	66
8.1 Microorganismos productores de biotensoactivos.....	66
8.2 Biotensoactivos de origen marino.....	67
8.3 Materiales y métodos.....	68
8.3.1 Aislamiento de cepas productoras de BS	68
8.3.2 Identificación de aislados bacterianos mediante secuenciación parcial de ADN 16S que presenten actividad biotensoactiva y bioemulsificante	69
8.4 Resultados y discusión.....	69
Capacidad de producción de BS de cepas marinas	70
8.5 Conclusiones.....	72
Capítulo 9. Producción de biosurfactantes	73
9.1 Producción y optimización	73
9.3 Preparación de inóculos y condiciones de cultivo.....	75
9.4 Producción de biosurfactante	75

Capítulo 10. Biodegradación de hidrocarburos.....	77
Capítulo 11. Recuperación biológica mejorada de petróleo	104
11.1 Recuperación biológica mejorada de petróleo en columna empacada.....	104
7.1.1 Recuperación en columna	104
11.2 Purificación de biosurfactantes	106
11.3 Caracterización físico-química de biosurfactantes producidos por las cepas aisladas	107
11.3.1 Concentración micelar crítica.....	107
11.3.2 Tensión superficial e índice de emulsión.....	107
11.3.3 Análisis por HPLC del extracto purificado.....	108
11.3.4 Composición y análisis del biosurfactante producido.....	108
11.3.5 Análisis de la composición de ácidos grasos en los biosurfactantes.....	108
11.3.6 Actividad antimicrobiana.....	108
12. Conclusiones Generales.....	109
Capítulo 13. Referencias.....	111
Capítulo 14. Métodos analíticos.....	124
14.1 Actividad hemolítica	124
14.2 Colapso de gota	124
14.3 Difusión de aceite	126
14.4 Tensión superficial.....	126
14.5 Índice de emulsión	126

Capítulo 1. Introducción

Dado que las fuentes de hidrocarburos en México se han ido agotando en yacimientos conocidos, actualmente la exploración y extracción del hidrocarburo se realiza en aguas profundas (mayores de 500 m) donde el Golfo de México ha sido evaluado como uno de los principales yacimientos potenciales de petróleo. Para solventar el déficit en el abastecimiento de hidrocarburos, es necesario que México sea capaz de desarrollar su propia tecnología, a través del estudio de los diferentes sistemas de extracción, producción y almacenamiento utilizando las experiencias de otros países, para modelar y simular y así desarrollar las condiciones de trabajo óptimas en este ambiente operacional de cada uno de los componentes que influyen en el desempeño del equipo. Las tecnologías que se están desarrollando son principalmente las de extracción mejorada de petróleo mediante la adición de surfactantes sintéticos.

Los surfactantes son compuestos que reducen la tensión superficial de un líquido, la tensión interfacial entre dos líquidos, o entre un líquido y un sólido. Son compuestos anfipáticos que contienen un extremo hidrofílico y un extremo hidrofóbico. Por lo tanto, una molécula de tensioactivo contiene ambas partes, un componente insoluble en agua (soluble en aceite) y un componente soluble en agua. No obstante su aplicación se ve limitada debido a su baja biodegradabilidad y toxicidad. Es por ello que se ha propuesto utilizar surfactantes de origen biológico.

El interés por surfactantes biológicos (biosurfactantes) ha crecido en los últimos años debido a su diversidad, la naturaleza ecológica, posibilidad de producción a gran escala, la selectividad, el rendimiento en condiciones de cultivo extremas y sus aplicaciones inminentes en materia ambiental. Sus características tales como baja toxicidad, alta biodegradabilidad, mejor compatibilidad con el medio ambiente, alta capacidad de formación de espuma, mayor selectividad, actividad específica a temperatura extrema, el pH (5-9), la salinidad (hasta 5%), y la posibilidad de producción a partir de residuos renovables los hacen de alto interés comercial (Khopade et al., 2012; Kiran et al., 2010). Existe una diversidad de fuentes productoras de biosurfactantes, no obstante una fuente poco explorada es el ambiente marino (Bozo-Hurtado et al., 2012; Maneerat et al., 2006; Satpute et al., 2010; White et al., 2013). En México existen

zonas costeras que son una importante reserva natural de estos microorganismos, debido a la permanente presencia de hidrocarburos como consecuencia de las actividades donde existe exploración y explotación petrolera.

Capítulo 2. Antecedentes

El petróleo crudo es uno de los recursos naturales más importantes para México. Su exploración, explotación y transformación permiten satisfacer las necesidades energéticas de los sectores productivos del país. Asimismo, los ingresos petroleros son fundamentales para el crecimiento económico (SENER, 2012). En la actualidad los hidrocarburos se han convertido en la principal fuente de energía del mundo en donde México está ubicado como uno de los principales líderes en la producción del crudo generando el 18 % del total obtenido en el continente Americano.

En 2011, las reservas probadas mundiales de petróleo crudo se ubicaron en 1,652.6 miles de millones de barriles (MMMb), 1.9% superior respecto a las registradas en 2010. De acuerdo a la SENER (2012) el 72.4% de las reservas corresponden a los países de la Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP).

Respecto a las reservas probadas por país, Venezuela se ubicó en el primer lugar, con 17.9% del total. Arabia Saudita concentró 16.1% de las reservas mundiales en 2011. México se ubicó en el décimo octavo lugar, con 0.8% del total mundial.

La relación reserva-producción (R/P) se ubicó en 54.2 años a nivel mundial. Manteniendo las mismas condiciones de producción y descubrimientos de 2011, los países de la OPEP dispondrían de 91.5 años de petróleo crudo, mientras que la relación R/P para los países de la OCDE sería de 34.7 años (SENER, 2012).

Para evaluar las reservas se realizan actividades de exploración, perforación y explotación de nuevos yacimientos de hidrocarburos, estas se realizan tanto en la superficie como en las profundidades. En nuestro país a principios de 1993, se comenzó la exploración en plataformas marítimas fijas, extrayendo hidrocarburos a profundidades de 180 m. En el Golfo de México, se han encontrado zonas con potenciales del hidrocarburo suficientes para en el corto plazo, seguir abasteciendo al país con esta fuente de energía. En la extracción de hidrocarburos debido a la necesidad de esas profundidades, a México se le presenta un reto tanto tecnológico como de innovación al adaptar nuevos sistemas de extracción a sus condiciones de operación (Gómez-Treviño & Piña-Monarez, 2007). Uno de los principales problemas que enfrenta PEMEX es la

falta de tecnología para desarrollar la infraestructura necesaria para explotar de forma sustentable las reservas nacionales de hidrocarburos; entre ellos los yacimientos profundos, los que equivale al 50 % de los recursos prospectivos del país. La mayor parte de la tecnología existente pertenece a compañías extranjeras. Por lo que PEMEX se ve obligada a rentar plataformas y tecnología, lo que eleva considerablemente los costos de extracción y producción (CMIC, 2012).

Tanto para la búsqueda del petróleo, como para su explotación, se emplean los sondeos cuya perforación del mar requiere técnicas y equipos especializados, que constantemente son perfeccionados.

El costo promedio actual de extracción de petróleo de México es de cinco dólares por barril que durante los próximos años debido a mayores costos de exploración de acuerdo con Petróleos Mexicanos aumentará medio dólar más en promedio anual. La tendencia es que los costos se incrementaran a largo plazo. La industria petrolera continua haciendo pruebas en aguas profundas y, según la industria internacional, extraer petróleo en esas regiones representa un costo entre diez y 15 dólares por barril.

Normalmente las transnacionales reponen a sus reservas el 90 o 100 % de la cantidad que producen anualmente de petróleo, mientras que en México solo alcanza a cubrir el 26 %, estimándose que en pocos años alcanzar el 77 % mediante la aplicación de nuevas tecnología de extracción.

2.1 Explotación de petróleo en un nuevo yacimiento

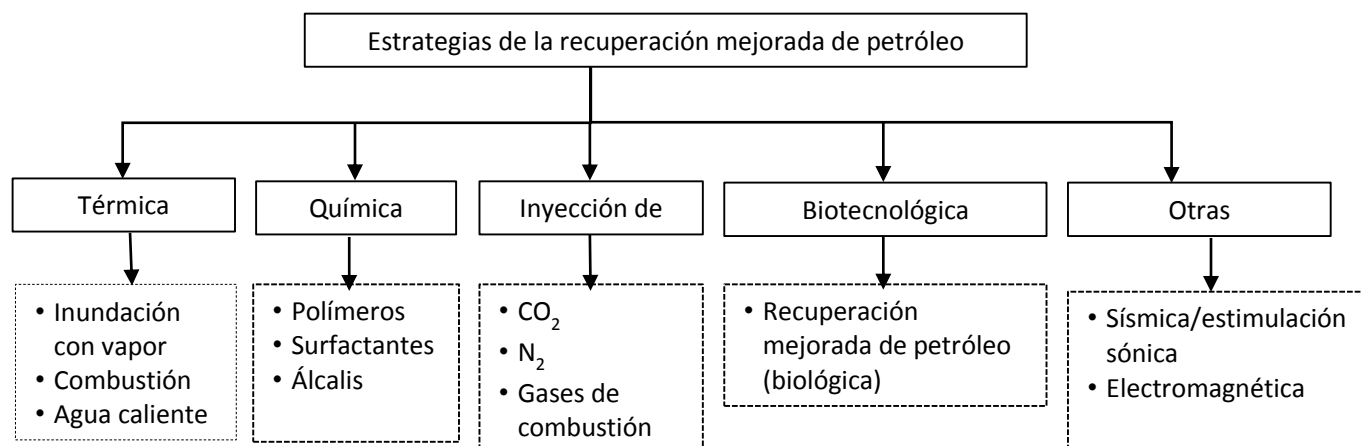
Para la producción petrolera luego de haber realizado la perforación, el pozo está en condiciones de producir. En este momento puede ocurrir que el pozo sea puesto en funcionamiento por empuje natural (donde la energía es aportada por el mismo yacimiento), lo que no ocurre en la mayoría de las perforaciones. Dependiendo de varias circunstancias, tales como la profundidad del yacimiento, su presión, la permeabilidad de la roca reservorio, etc., el fluido llegará a la superficie con caudales satisfactorios o no satisfactorios. Del volumen total del petróleo existente en el yacimiento, este puede ser recuperado en diferentes etapas de extracción.

En la extracción de petróleo en su fase de "recuperación primaria", es decir, aquella que se efectúa en función de la energía existente en el yacimiento, acudiendo en algunos casos a métodos artificiales. Dicha fase permite obtener entre un 15% y un 35% del petróleo in situ. Si se trata de petróleos viscosos, la extracción puede ser inferior al 10%.

Es común aplicar algunos medios para mejorar los valores de recuperación, por ejemplo la inyección de gas o agua en determinados pozos denominados "inyectores", con el objeto de desplazar volúmenes adicionales de petróleo hacia el resto de los pozos del yacimiento que conservan el carácter de "productores". Esto se llama "recuperación secundaria".

Además de la recuperación secundaria, se suelen aplicar otros métodos llamados de recuperación terciaria o mejorada, tales como la inyección de anhídrido carbónico (CO₂), solventes, surfactantes, polímeros, o métodos térmicos tales como la inyección de vapor, o de combustión in situ (figura 1).

Estas tecnologías de recuperación pueden extraer un promedio máximo de 45 % del petróleo original en la recuperación primaria y secundaria. Por lo tanto, estas operaciones de recuperación de petróleo convencionales a menudo dejan dos tercios del hidrocarburo en el



depósito (Brown, 2010).

Figura 1. Diagrama de las etapas del proceso de la recuperación mejorada de petróleo.

2.2 Recuperación mejorada de petróleo

Para satisfacer la demanda de energía de todo el mundo, hay una gran necesidad de producir más crudo, con la producción petrolera estancada y la baja recuperación de los métodos

convencionales, la atención se ha centrado en las técnicas de recuperación mejorada para extraer más petróleo de los yacimientos petrolíferos existentes y abandonados.

Los métodos de recuperación mejorada se aplican con sustento técnico desde los 50's, adquiriendo impulso con cada incremento en el precio del petróleo. Existen más de 350 proyectos de recuperación mejorada en el mundo, siendo atribuible a ellos el 2.2 % de la producción global (Silva Lopez, 2012). Las principales empresas dedicadas a la extracción mejorada de petróleo se muestran en la figura 2, se puede observar que la empresa OXY (Occidental Petroleum Corporation, por sus siglas en inglés) es la que tiene mayores avances en estas etapas de recuperación, sin embargo, la empresa CNPC (China National Petroleum Corporation, por sus siglas en inglés) ha logrado aplicar en producción a los biosurfactantes de origen microbiano. Por otro lado, PEMEX tiene un atraso en este tipo de tecnologías, por lo que el campo de aplicación de estos métodos la recuperación mejorada de petróleo microbiana tiene el potencial de ser rentable (Sen, 2008). Estos métodos de recuperación se refieren a que implican el uso de metabolitos de una población microbiana incluyendo biosurfactantes, biopolímeros, biomasa, ácidos, disolvente, gases y también enzimas para aumentar la recuperación de petróleo de yacimientos agotados y marginales, alargando así la vida de los pozos de petróleo (Lazar et al., 2007).

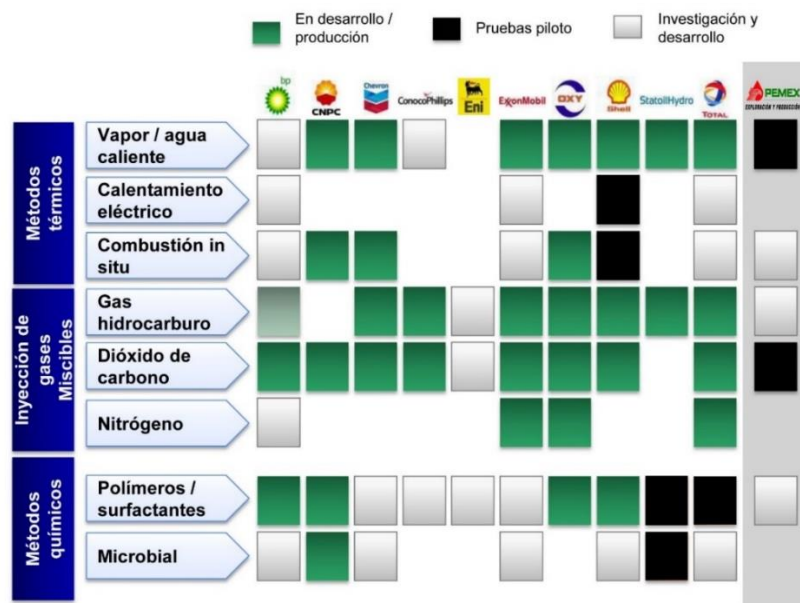
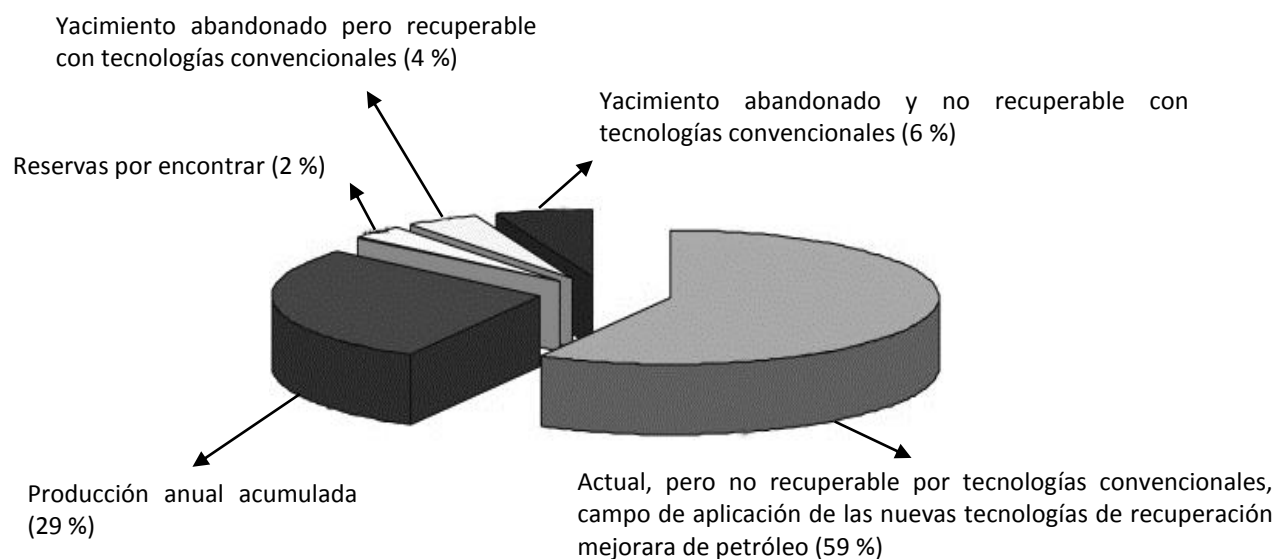


Figura 2. Experiencia de la industria a nivel Mundial en Recuperación Mejorada (Silva Lopez, 2012).

Un requisito previo a la recuperación mejorada es una revisión exhaustiva de los mecanismos físicos y bioquímicos que controlan las respuestas microbianas a los sustratos de hidrocarburos y su movilidad. Estas revisiones incorporan el análisis de los aspectos de la adhesión y la transformación de los hidrocarburos, los cambios de la membrana de los microorganismos, adhesión a la superficie celular, hidrofobia y quimiotaxis (Khire & Khan, 1994a, 1994b).

Tomando en cuenta que las reservas probadas en México son de 11.4 miles de millones de barriles (SENER, 2012), una parte importante de estas reservas sería el objetivo principal de estas técnicas de recuperación mejorada de petróleo microbiana que se estima tiene el potencial de recuperar gran parte del hidrocarburo restante, que se estima alrededor de 6612 millones de barriles que representa el 59% de la producción total, además existen yacimientos que fueron agotados por las técnicas convencionales y que se encuentran abandonados que también pueden



ser objetivo principal de esta técnica extracción mejorada, sumando por último las reservas por encontrar (2%), por lo que el potencial de aplicación de estas técnicas puede llegar a ser del 71% del total de hidrocarburos presentes en el subsuelo (figura 3).

Figura 3. Reservas probadas de hidrocarburos en México (SENER, 2012).

Sin embargo esta recuperación es un reto porque el hidrocarburo restante a menudo se encuentra en regiones de difícil acceso donde existe presión capilar en los poros. Se aplica en estos casos una estrategia combinatoria que consiste en la inyección de un fluido o fluidos

(tensoactivos) como complemento a la presión natural del depósito, donde los fluidos inyectados interactúan en un sistema roca/petróleo/salmuera para crear condiciones favorables para la máxima recuperación del hidrocarburo (Sen, 2008). Los biotensoactivos reducen la tensión interfacial entre el aceite/agua y el aceite/roca, esto reduce las fuerzas capilares que impiden que el aceite se mueva a través de los poros de la roca (figura 4). Los biotensoactivos también pueden unirse fuertemente a la interfase agua-petróleo y formar una emulsión. Esto estabiliza el aceite desorbido en agua y permite la extracción de aceite junto con el agua de la inyección (Suthar et al., 2008).

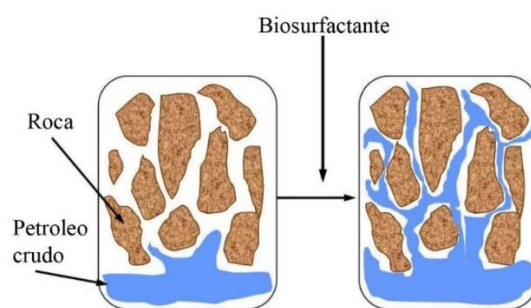


Figura 4. Mecanismo de los biosurfactantes en la recuperación de petróleo (Pacwa-Plociniczak et al., 2011).

2.3 Tipos de biotensoactivos

Los biotensoactivos mejor estudiados son los glicolípidos. Entre estos, los compuestos más conocidos son los ramnolípidos, trealolípidos, soforolípidos y lípidos de manosileritritol (figura 5), que contienen mono- o disacáridos, combinados con ácidos alifáticos de cadena larga o hidroxialifáticos. Los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* son actualmente comercializados por Jeneil Bio-surfactant, EEUU, principalmente como fungicida agrícola o como aditivo para mejorar las condiciones de bioremediación.

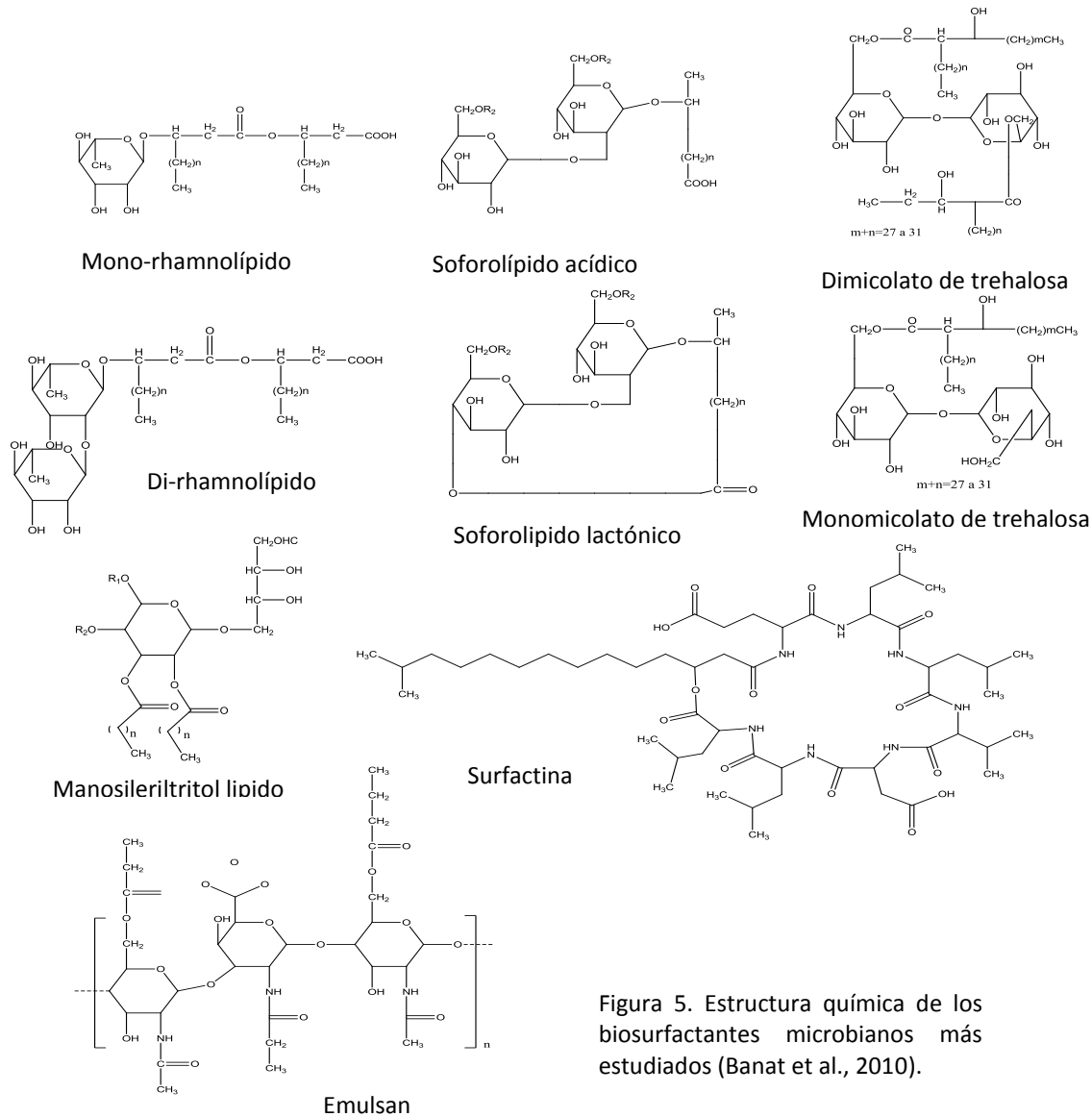


Figura 5. Estructura química de los biosurfactantes microbianos más estudiados (Banat et al., 2010).

2.4 Función de los biotensoactivos

Los biotensoactivos se acumulan en la interfase entre dos fluidos inmiscibles, o ente un líquido y un sólido. Mediante la reducción de la tensión superficial (líquido-aire) e interfacial (líquido-líquido) que reducen las fuerzas de repulsión entre dos fases diferentes y permitan que estas puedan mezclarse e interactuar más fácilmente (figura 6).

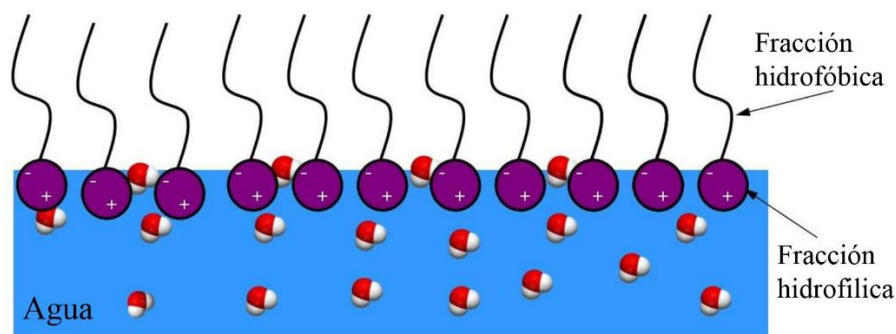


Figura 6. Acumulación de biosurfactantes en la interfase entre líquido y aire (Pacwa-Plociniczak et al., 2011).

2.4.1 Concentración micelar crítica

La actividad biotensoactiva depende de la concentración de los compuestos hasta que se obtiene la concentración micelar crítica (CMC). La CMC se define como la concentración mínima necesaria para iniciar la formación de micelas (Mulligan, 2005). A concentraciones superiores de la CMC, las moléculas del biosurfactante se asocian para formar micelas, bicapas y vesículas (figura 7). La formación de las micelas permite a los biosurfactantes reducir la tensión superficial e interfacial y aumentar la solubilidad y biodisponibilidad de los compuestos orgánicos hidrófobos.

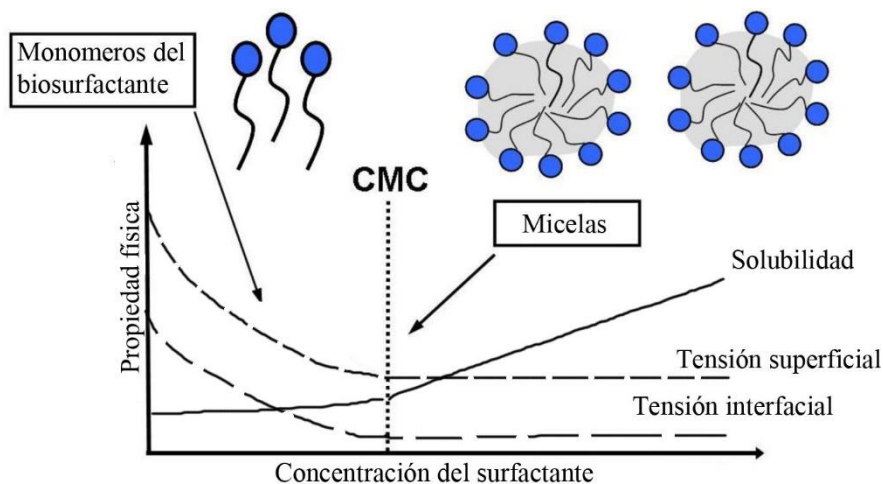


Figura 7. Relación entre la concentración del biosurfactante, superficie de tensión y formación de micelas.

En la práctica, la CMC es también la concentración máxima de monómeros de tensioactivo en agua y está influenciada por el pH, temperatura y fuerza iónica. La CMC se usa comúnmente para medir la eficiencia del tensioactivo. Un buen biosurfactante tiene una baja CMC, lo que

significa que requiere menos biotensoactivo para disminuir la tensión superficial (Desai & Banat, 1997). La formación de micelas tiene un papel significativo en la formación de microemulsiones. Las microemulsiones se forman cuando una fase líquida se dispersa en forma de gotitas en otra fase líquida, por ejemplo aceite disperso en agua (microemulsión directa) o agua dispersado en aceite (microemulsión inversa) (Desai & Banat, 1997; Nguyen et al., 2008).

2.4.2 Balance hidrofílico-lipofílico

La eficacia de un tensoactivo se determina midiendo su capacidad de cambiar las tensiones superficiales e interfaciales, la estabilización de las emulsiones y mediante el estudio del balance hidrofílico-lipofílico (BHL). El valor del BHL es una medida para indicar si un biotensoactivo relaciona la emulsión agua en aceite o aceite en agua. Este factor puede ser usado para determinar la aplicabilidad adecuada de biotensoactivos. Los emulsionantes con bajo BLH son lipófilos y estabilizan la emulsión agua en aceite, mientras que los emulsionantes con BLH alto tienen el efecto contrario confiriendo una mejor solubilidad en agua (tabla 1) (Christofi & Ivshina, 2002; Pacwa-Plociniczak et al., 2011).

Tabla 1. Valores típicos de HBL y sus aplicaciones

	BLH	Aplicación
Hidrofóbicos (solubles en aceite)	1 a 3.5	Antiespumantes
	3.5 a 8	Emulsionantes agua en aceite (Ag/Ac)
Dispersables en agua	7 a 9	Humectantes y agentes dispersadores Espumas
Hidrofílicos (solubles en agua)	8 a 16	Emulsionantes aceite en agua (Ac/Ag)
	13 a 16	Detergentes
	15 a 20	Solubilizantes

Para el caso donde se encuentren mezclas de emulsionantes o aceites, el valor del BLH se obtiene aplicando la propiedad aditiva. Para el cálculo del valor del BHL se utiliza como principio que todos los tensoactivos combinan grupos hidrofílicos y lipofílicos en una molécula y que la proporción entre los porcentajes en peso de estos dos grupos de tensoactivos no iónicos es una indicación del comportamiento que se puede esperar del producto (Pasquali et al., 2008). Por consiguiente, para calcular el valor de BHL de un tensoactivo no iónico de composición conocida, se debe estudiar primero el grupo hidrofílico.

Para el caso de biosurfactantes de origen microbiano se puede calcular el valor del BHL utilizando la fórmula propuesta por Griffin (1954), que es la adecuada cuando los tensoactivos contienen cadenas de polioxietileno y alcoholes polivalentes (como glicerol y sorbitol) como grupos hidrofílicos:

$$\text{BHL} = \frac{E+P}{5}$$

Donde E es el porcentaje en peso o masa del contenido lipofílico y P es el porcentaje en peso o masa del contenido hidrofílico.

2.5 Ventajas y desventajas del uso de biosurfactantes

La industria de exploración, extracción y producción del petróleo emplea tensoactivos en la limpieza de los tanques de almacenamiento para incrementar la solubilidad de hidrocarburos no miscibles en fases acuosas, estos tensoactivos son producidos vía química o biológica.

Los tensoactivos tanto sintéticos como biológicos son capaces de reducir la tensión superficial del agua de 72 mN m^{-1} hasta un valor cercano a 27 mN m^{-1} (tabla 2). Sin embargo, para lograr estos valores de tensión superficial el valor de la CMC es considerablemente menor para los biológicos que va desde 4 mg L^{-1} hasta 200 mg L^{-1} comparada con los químicos donde se requiere arriba de 590 mg L^{-1} .

Tabla 2. Comparación de propiedades de tensión y la CMC de biosurfactantes comparada con surfactantes sintéticos (Christofi & Ivshina, 2002)

Origen	Surfactante	Tensión superficial (nM m^{-1})	Tensión interfacial (nM m^{-1})	CMC (mg L^{-1})
Químico	Dodecil sulfato de sodio	37.7	0.02	2120
	Bromuro de cetiltrimetilamonio	30.0	5.0	1300
	Tween 20	30.0	4.8	600
	Alquilbenceno lineal sulfonato	47.0	<1.0	590
Biológico	Complejo glicolípido de <i>Rhodococcus ruber</i> AC235	26.8	0.9	54
	Dicorinomicolato de trehalosa de <i>R. Erythropolis</i>	36.0	17.0	4
	Tetraéster de trehalosa de <i>R. Erythropolis</i>	26.0	<1.0	15
	Ramrólpidos de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	29.0	0.25	50-200
	Sofrolípido de <i>Torulopsis bombicola</i>	33.0	1.8	82
	Surfactina de <i>Bacillus subtilis</i>	27.0	1.0	23

Otro aspecto importante a considerar que es que los tensoactivos de síntesis química están siendo reemplazados por lo de origen biológico (biotensoactivos), debido a que estos

últimos poseen baja toxicidad (tabla 3), son biodegradables y tienen una mejor compatibilidad con el ambiente (Jimenez Islas et al., 2010).

Tabla3. Toxicidad de los biotensoactivos comparada con surfactantes sintéticos (Christofi & Ivshina, 2002; Satpute et al., 2010)

Origen	Tensoactivo	EC ₅₀ (mg/L)
Químico	Estearato de sacarosa (DK 50)	67
	Finasol OSR-5	7
	Corexit 9507	5
	Inipol EAP 22	0.004
	Nonil fenol (óxido de etileno) ₉ -acetato (EQ 9)	78
Biológico	Complejo glicolipídico de <i>Rhodococcus ruber</i> AC235	650
	Dicorinomicolate de trehalosa de <i>R. Erythropolis</i>	49
	Tetraéster de trehalosa de <i>R. Erythropolis</i>	286
	Ramnolípidos de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	50

El potencial de los biosurfactantes en la recuperación mejorada de petróleo se estima mediante la medición de la cantidad de hidrocarburo liberado de una columna empacada de suelo después de verter una solución acuosa de biotensoactivo. Los biosurfactantes de *Pseudomona aeruginosa* pueden recuperar alrededor de 49 a 54 % de petróleo crudo de una columna de arena compactada a temperatura ambiente; de 52 a 57 % a 70°C y de 58 a 62 % a los 90°C (Bordoloi & Konwar, 2008; Liu et al., 2005). Los biosurfactantes también se pueden usar para extraer hidrocarburos a partir de esquistos de petróleo (aceite bastante parecido al petróleo que presenta una menor cantidad de azufre), se han utilizado para este fin biotensoactivos producidos *Rhodococcus erythropolis* y *Rhodococcus ruber* en esquistos de El-Lajju en Jordania (Haddadin et al., 2009).

No obstante las ventajas que puede mostrar el uso de estos biotensoactivos, existen desventajas que limitan la comercialización de estos compuestos, entre otros, los elevados costos asociados a su producción a gran escala, rendimientos y sus propiedades emulsificantes. Por esta razón, las investigaciones recientes se han enfocado tanto a la optimización de los procesos de producción como a la búsqueda de sustratos económicos, con la finalidad de disminuir los costos (Jimenez Islas et al., 2010), así como la búsqueda de nuevas cepas productoras de biotensoactivos.

2.6 Antecedentes directos

En el laboratorio de Biotecnología Ambiental se ha estudiado la biodegradación de hidrocarburos por la cepa de *Serratia marcescens* aislada de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en Poza Bellota 401 en Minatitlán, Veracruz. Machín (2000) demostró que la cepa fue capaz de degradar hasta el 80 % de benzo(a)pireno. Posteriores resultados demostraron la presencia de un biosurfactante (serrawetina) que tienen la capacidad de emulsionar el medio de cultivo lo que le permite hacer más disponible los sustratos hidrofóbicos y como consecuencia aumentar la biodegradación (Rosas-Galván, 2011). Debido a la presencia de un pigmento (prodigiosina) de la cepa silvestre, Rosas (2011) propuso generar mutantes blancas productoras de serrawetina de las que obtuvo 6 donde la cepa mutante SMRG-5 presentó buena actividad bioemulsificante.

Capítulo 3. Justificación, Hipótesis y Objetivos

3.1 Justificación

La industria de extracción de petróleo en México tiene en la actualidad bajos niveles de recuperación comparada con las industrias extranjeras por lo que esta tecnología muchas veces es rentada a las transnacionales teniendo un impacto en el precio final de los productos derivados. Del total de hidrocarburos presentes en el subsuelo, más del 55 % por las características del sitio, no es recuperable por las tecnologías tradicionales, se han desarrollado estrategias de recuperación que hacen factible esta desorción y posterior recuperación del hidrocarburo, esta consiste en la adición de tensoactivos sintéticos para facilitar la movilización del hidrocarburo, sin embargo, estos compuestos no son compatibles con el medio ambiente por su baja biodegradabilidad y toxicidad, por lo que, existen alternativas como los tensoactivos biológicos más biodegradables y menos tóxicos. Además, los microorganismos marinos ofrecen una mejor opción ya que sus características fisiológicas pueden generar estructuras novedosas con mejores actividades emulsificantes.

3.2 Hipótesis

Debido a que la biodiversidad presente en los ambientes marinos ha sido poco estudiada y que el Golfo de México ha estado expuesto de manera natural a hidrocarburos, será posible aislar nuevos microorganismos con actividades metabólicas específicas a la producción de biosurfactantes.

Estos microorganismos marinos debido a su naturaleza producirán biosurfactantes con estructuras y actividades específicas diferentes. Estas nuevas estructuras presentarán mejor estabilidad a diferentes condiciones de presión y temperatura debido a su síntesis por diferentes fuentes de carbono.

3.3 Objetivo General

Producción y caracterización de biosurfactantes de microorganismos marinos y su aplicación en la extracción biológica mejorada de petróleo.

3.3.1 *Objetivos específicos*

- Aislar e identificar microorganismos marinos del estuario de Coatzacoalcos, Veracruz y de la región del Escarpe Pérdido de Golfo de Mexico.
- Seleccionar cepas productoras de biosurfactantes.
- Seleccionar las fuentes de carbono para la producción de biosurfactantes.
- Producir biosurfactantes en fermentaciones por lote.
- Purificar y caracterizar el biosurfactante obtenido.
- Establecer las condiciones para la extracción biológica mejorada de petróleo.

Capítulo 4. Estrategia experimental

El proyecto se dividirá en tres etapas para su mejor desarrollo, primeramente se establecerá la colección biológica, seguida de los métodos de producción de biosurfactante para poder finalmente ser aplicado en la extracción mejorada de petróleo.

La colección biológica será obtenida a partir de aislados del estuario del río Coatzacoalcos a una profundidad de entre 4 y 10 metros, estos serán cultivados en medios suplementados con agua de mar artificial. Los diferentes aislados se seleccionarán en base a la actividad emulsificante (colapso de gota, difusión de aceite) y tensión superficial para determinar el potencial de producción del biotensioactivo. Una vez seleccionadas las cepas productoras se realizará el estudio del efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno sobre la producción de biosurfactantes seleccionándose el mejor medio de cultivo para la producción de biosurfactantes. Finalmente se realizarán pruebas de extracción biológica mejorada de petróleo bajo diferentes condiciones en una columna diseñada en el laboratorio para este uso (figura 9).

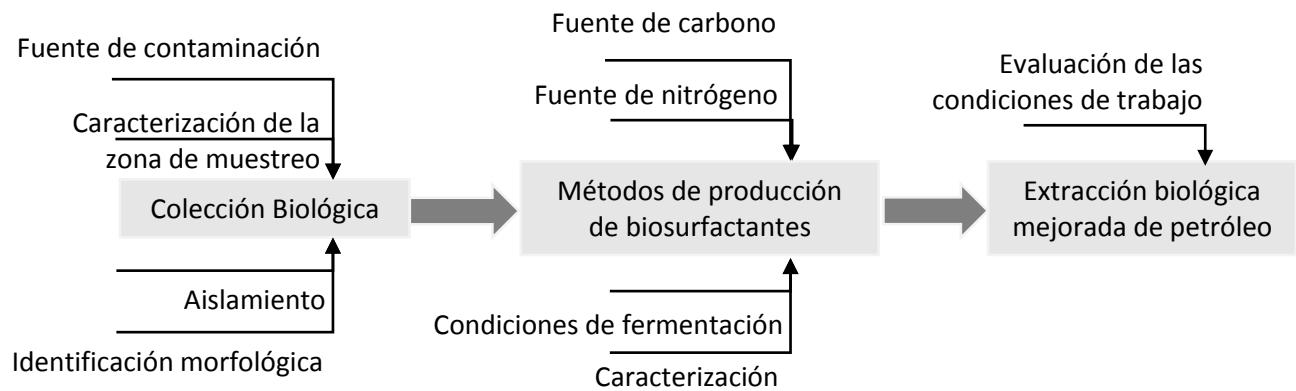


Figura 9. Estrategia experimental

Capítulo 5. Aislamiento de microorganismos de sedimentos con capacidad de producción de biosurfactantes del Estuario de Coatzacoalcos

El aislamiento microbiano y los procedimientos de selección de cepas potenciales productoras de biosurfactantes son etapas muy importantes en el establecimiento de las tecnologías de recuperación biológica mejorada de petróleo (Almeida et al., 2004). La detección de microorganismos productores se realiza generalmente mediante la medición de diversos parámetros como la tensión superficial e interfacial, y la capacidad de emulsionar aceites e hidrocarburos. Aunque este proceso garantiza la detección de cepas productoras, también es muy arduo y consume mucho tiempo de laboratorio. Para superar estas deficiencias se utilizan diferentes criterios de selección, las más utilizadas son los cultivos en medio sólido como el Sigmund-Wagner para la determinación de ramnolípidos y las pruebas hemolíticas que determina las cepas potencialmente productoras de biosurfactantes (Carrillo et al., 1996).

El procedimiento para obtener cepas potenciales productoras de biosurfactantes se describe en el siguiente diagrama.

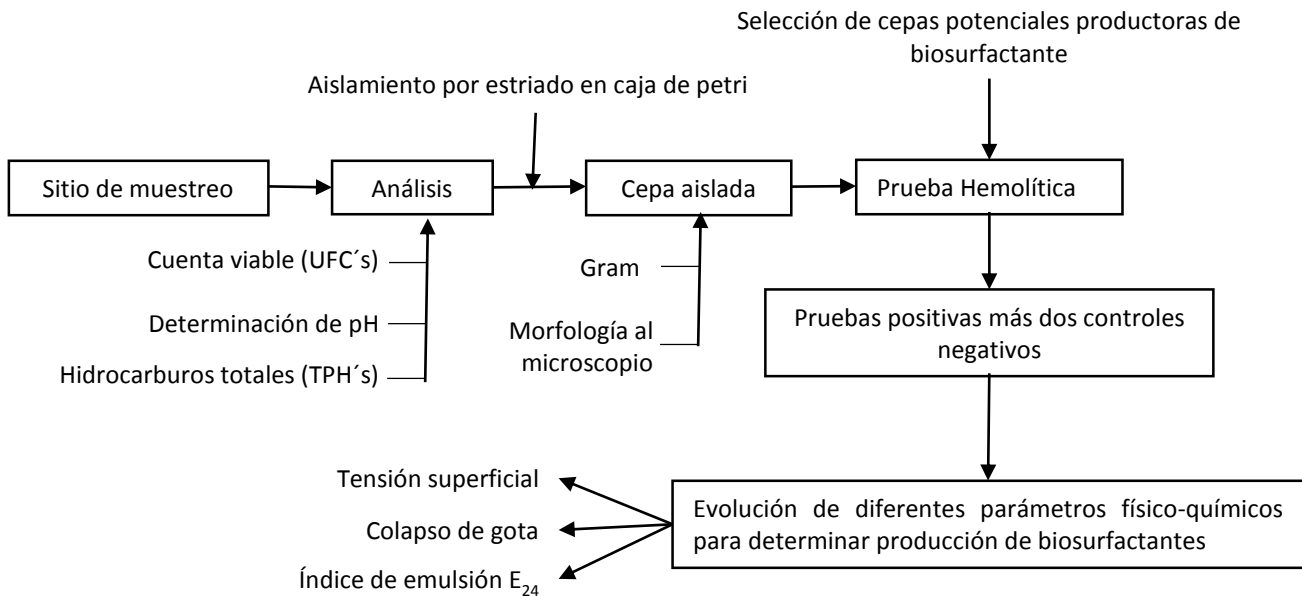


Figura 10. Estrategia Experimental para la obtención de cepas potenciales productoras de biosurfactantes.

En la figura 10 se describe la metodología para la obtención de cepas potenciales productoras de biosurfactantes del estuario de Coatzacoalcos que corresponde a los sitios de muestreo descritos en la sección 5.4.1, se realizarán análisis de UFC's, determinación de pH y de

hidrocarburos totales a los sedimentos obtenidos. Una vez obtenidas las diferentes cajas de Petri obtenidas de las diluciones seriadas, se utilizarán estas mismas para hacer el aislamiento por estriado en caja de Petri.

Las cepas aisladas se le realizarán tres pruebas para determinar su Gram, su morfología al microscopio y la prueba selectiva de hemólisis. Los resultados positivos en la prueba de hemólisis se seleccionarán por ser las potenciales productoras, y se realizarán cultivos para medir la evolución de la tensión superficial, colapso de gota e índice de emulsión.

5.1 Lugar de muestreo

5.1.1 Estuario de Coatzacoalcos

La zona industrial de Coatzacoalcos alberga el mayor complejo petroquímico con importancia para México y América Latina, su producción global es de aproximadamente 1.6 millones de toneladas/año de productos petroquímicos. Desde el establecimiento del complejo industrial en la década de los 60s, el estuario Coatzacoalcos ha experimentado un rápido desarrollo industrial y el crecimiento acelerado de la población, que, junto con otras actividades productivas como la agricultura y la ganadería, han provocado un severo impacto en los ecosistemas acuáticos de la región, acentuado en las últimas décadas. Actualmente la cuenca baja del río Coatzacoalcos es considerado uno de los lugares más contaminados de México (Espinosa-Reyes et al., 2010). Varios estudios se han llevado a cabo en los últimos 40 años en la zona, documentando los impactos ambientales sobre los ecosistemas del río Coatzacoalcos y la biota acuática de importancia comercial (Morales-Mora et al., 2014). Los estudios ambientales de la zona han reportado la presencia de hidrocarburos (Farrán et al., 1987), compuestos orgánicos volátiles (Stringer et al., 2001) y metales pesados (Rosales-Hoz & Carranza-Edwards, 1998).

El sistema hidrológico de la zona pertenece a la cuenca de México región número 29, ubicado en el Golfo de México (figura 11). El río más importante es el río Coatzacoalcos (el mismo nombre que el de la ciudad), que desemboca sus aguas en el Golfo de México con un caudal de aproximadamente 169 a $4120 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, dependiendo de la estación del año (Morales-Mora et al., 2014). Las descargas de aguas residuales industriales incluyen tres complejos petroquímicos, las plantas químicas y terminales marítimas privadas en Coatzacoalcos, y la refinería de petróleo en

Minatitlán. Todas estas descargas que se han presentado desde el inicio de operaciones de la refinería hacen probable que los sedimentos que se descargan en la desembocadura del río tengan una alta población microbiana que se ha adaptado a condiciones de alta concentración de hidrocarburos y moderadas concentraciones salinas, siendo el lugar idóneo para la toma de muestra a una profundidad de entre 2 y 10 metros del estuario (Kiran et al., 2009; Morales-Mora et al., 2014).

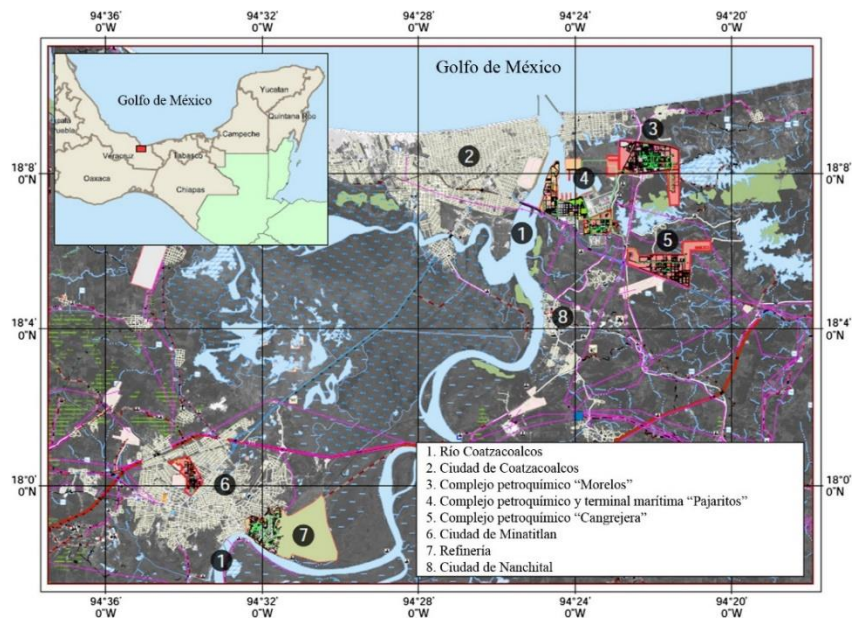


Figura 11. Área de estudio al sur de Veracruz, México.

5.2 Aislamiento de microorganismos marinos

Las muestras de sedimento marino que serán colectadas previamente se cultivan inicialmente en agar nutritivo marino (ANM) en diluciones seriadas de 10^1 a 10^5 con agua de mar filtrada estéril como diluyente para obtener cultivos puros (da Silva et al., 2013). El ANM se prepara mezclando 900 mL de la solución A y 100 mL de la solución B. Adicionalmente para preparar cajas de Petri se disuelven 15 g/L de agar bacteriológico.

Solución A		Solución B	
	[g/L]		[g/L]
Peptona de Caseína	17	Sal de grano	200

Peptona de soya	3	Sulfato de Amonio	12
Cloruro de sodio	5	Cloruro de Calcio	12
Fosfato Dipotásico	2.5		
Dextrosa	5		
Extracto de carne	1.2		

Todas la cepas seleccionadas se incuban a 10 °C durante 48 h, esta temperatura se elige ya que soporta un amplio rango de bacterias (psicrófilos y mesofilos tolerantes al frio) (Bozo-Hurtado et al., 2012; da Silva et al., 2013).

Después de la incubación, se examinarán las placas y se seleccionaran las colonias con morfología diferente para transferir a nuevas placas de agar periódicamente para su aislamiento.

5.3 Selección de microorganismos productores de biosurfactante

Debido a la procedencia de los diferentes aislados, estos se cultivaran aeróbicamente en dos diferentes medios de cultivo para la producción de biosurfactantes. Ambos medios tendrán como fuente de carbono al glicerol (10 g/L) y como fuente de nitrógeno al extracto de levadura (1 g/L), el primer medio de cultivo tendrá un medio mineral salino (MS) para simular las condiciones de donde fueron aislados con la siguiente composición:

	[g/L]
NaCl	20
KH ₂ PO ₄	3
Na ₂ HPO ₄	6
KCl	0.3
MgSO ₄	0.15

el segundo medio de cultivo (MM) tendrá la misma composición del primero solo a excepción de los 20 g/L de NaCl . Los experimentos se realizaran en frascos serológicos de 110 mL con 20 mL de volumen de trabajo por triplicado.

Una vez que se obtengan los diferentes aislados se procederá a determinar mediante dos métodos rápidos de análisis la capacidad de producción de biosurfactantes. El primer método que se utiliza para la síntesis del biotensoactivo consiste en determinar la capacidad hemolítica de los aislados, Carrillo (1996) recomienda la actividad hemolítica como primer tamiz para determinar la actividad biosurfactante. Los métodos posteriores para determinar la biosíntesis

del biotensoactivo son el método de colapso por gota, difusión de aceite y tensión superficial, descritas en la sección de métodos analíticos.

5.4 Resultados y discusión

5.4.1 Colección de muestras de sedimento marino del Estuario de Coatzacoalcos.

Seis muestras de 400 mL cada una fueron colectadas del estuario de Coatzacoalcos a una profundidad de entre 4 y 8 m. el día 8 de noviembre del 2015 en las coordenadas mostradas en la tabla 5 y representadas en la figura 12.

Tabla 5. Coordenadas de la zona de muestreo del estuario de Coatzacoalcos.

Sitio	Norte	Oeste
1	18° 9' 56.44"	94° 24' 55.72"
2	18° 9' 26.35"	94° 24' 55.58"
3	18° 9' 33.55"	94° 24' 27.14"
4	18° 9' 20.15"	94° 24' 15.08"
5	18° 8' 58.88"	94° 24' 26.13"
6	18° 9' 00.93"	94° 24' 40.31"



Figura 12. Zona de muestreo del estuario de Coatzacoalcos, Veracruz.

5.4.2 Caracterización de las zonas de muestreo

La alta exposición de hidrocarburos que ha sufrido el río Coatzacoalcos en las últimas décadas sugiere que existen características que diferencian a los sitios de muestro, es por ello

que se realizó la determinación de cuenta viable (UFC's), hidrocarburos totales (TPH's) y pH (Tabla 6).

Tabla 6. Caracterización de la zona de muestreo del estuario de Coatzacoalcos.

Sitio de muestreo	UFC's ($\times 10^5$)	TPH's (ppm)	pH
1	0.32	3800	7.4
2	1.76	1950	7.3
3	2.09	1300	7.3
4	1.17	3300	7.3
5	0.71	1500	7.2
6	2.31	1800	7.1

La concentraciones de microorganismos (UFC's) en los sitios de muestreo van desde 0.32 $\times 10^5$ en el sitio 1 hasta 2.31 $\times 10^5$ en el sitio 3, estos valores se encuentran muy por debajo de los muestreos de suelos terrestres que se pueden cuantificar en el orden de 10^8 (Machín, 2000), estos valores se deben a la características propias del sitio, si bien, se cultivaron en un medio rico en NaCl para simular las condiciones salinas del sitio, existen otros factores ambientales que pueden afectar en el resultado, arrojándonos un valor de microorganismos cultivables y no totales de la muestra.

En análisis de TPH's se complementó con el análisis de los perfiles cromatográficos que se muestran en la figura 13.

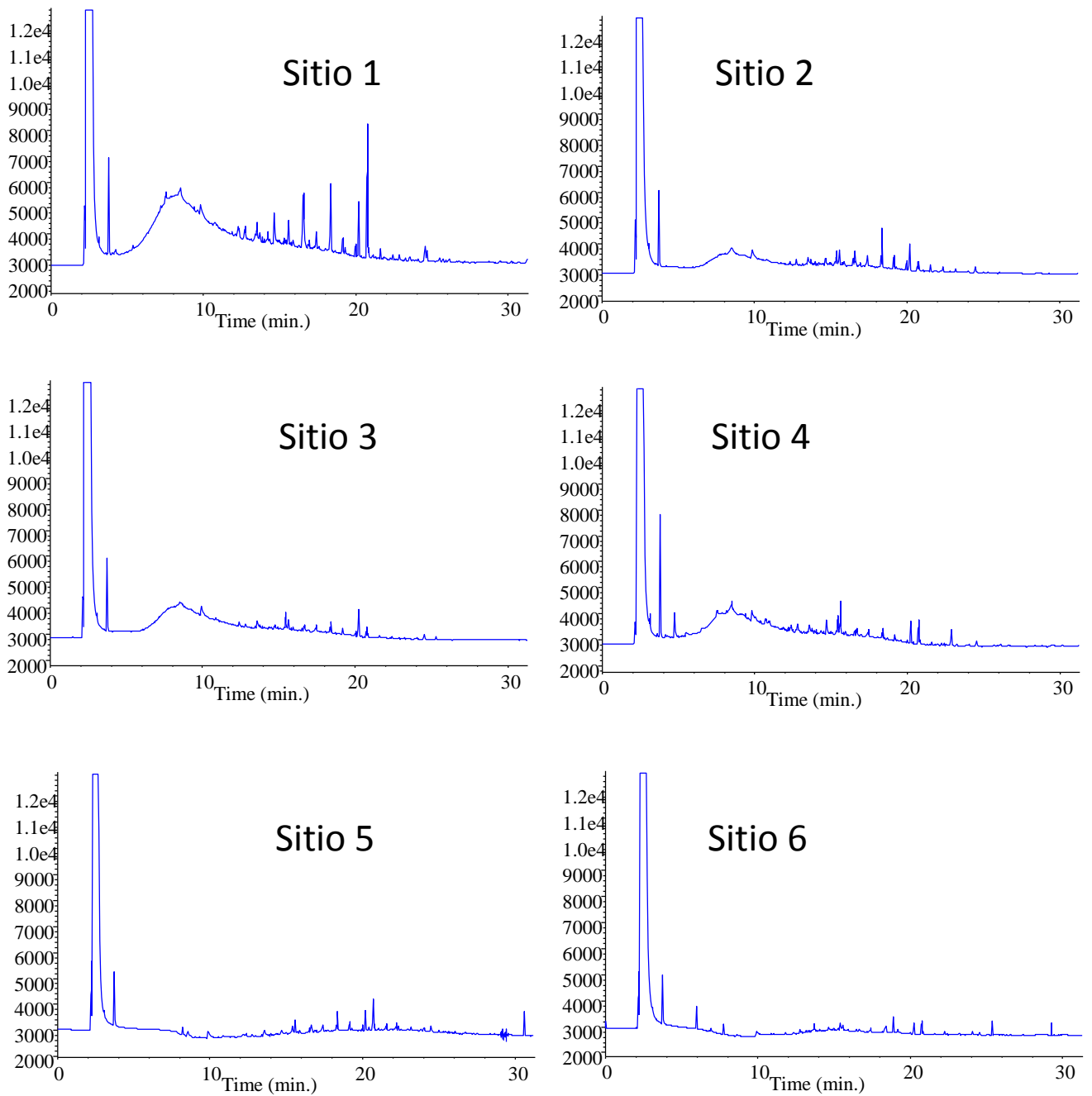


Figura 13. Perfiles cromatográficos de las zonas de muestreo del estuario de Coatzacoalcos.

La caracterización cromatográfica muestra que existen muy pocos componentes que se pueden detectar por este método analítico. El sitio 1 que tiene una concentración de 3800 ppm muestra un ensanchamiento de línea base por los componentes que no se pueden resolver, esto es característico de muestras que contienen resinas. Este mismo fenómeno se observa en los primero 4 sitios de muestreo. Los sitios 5 y 6 se observa una línea base sin ensanchamientos y con picos definidos después de los 15 min de tiempo de retención, este perfil es característicos de las fracciones aromáticas. Estos resultados se pueden confirmar realizando el método de fraccionamiento propuesto por (Machín-Ramírez et al., 2008). La presencia de compuestos aromáticos puede ser benéfica para este estudio ya que este tipo de compuestos hidrofóbicos favorecen o inducen a la producción de biosurfactantes.

Finalmente, el pH observado en las zonas de muestreo vario de entre 7.1 y 7.4, siendo la más básica en la desembocadura del rio, el agua salina tiende a aumentar los valores de pH en función de la temperatura, salinidad y profundidad de la zona de medición, para los sedimentos marinos los valores típicos de pH varían de entre 6.8 y 7.8 (Atkinson et al., 2007).

5.4.3 Aislamiento de microorganismos de sedimentos marinos

Se aislaron 27 colonias diferentes de las 6 muestras colectadas que se enlistan en la tabla 7 donde se muestra su morfología.

Tabla 7. Identificación al microscopio de las cepas aisladas de sedimentos marinos.

Clave	Morfología (100X)	Gram
Aislado 1a	Bacilo corto	-
Aislado 2a	Bacilo corto	-
Aislado 2b	Bacilo corto	-
Aislado 2c	Bacilo corto	+
Aislado 2c'	Bacilo corto	-
Aislado 2d	Bacilo largo	-
Aislado 2e	Bacilo corto	-
Aislado 2f	Bacilo corto	-
Aislado 3a	Bacilo corto	+
Aislado 3b	Cocos	+
Aislado 3c	Bacilo corto	-
Aislado 3d	Hongo	
Aislado 4a	Bacilo corto	-
Aislado 4a'	Bacilo corto	-
Aislado 4b	Bacilo corto	+
Aislado 4c	Bacilo corto	+

Aislado 4d	Bacilo corto	-
Aislado 5a	Bacilo corto	-
Aislado 5b	Bacilo corto	-
Aislado 5c	Bacilo corto	-
Aislado 5d	Bacilo corto	-
Aislado 5e	Bacilo largo	-
Aislado 5e'	Bacilo corto	+
Aislado 6a	Bacilo corto	+
Aislado 6b	Levadura	
Aislado 6c	Bacilo corto	-
Aislado 6d	Bacilo mediano	-
Aislado 6d'	Bacilo largo	-

El número corresponde a la zona de muestreo, la letra corresponde al aislado, la notación prima significa porque en el aislado original surgió la duda si existían dos especies en la placa.

De los 28 aislados obtenidos encontramos con respecto a su tinción de Gram a 7 que mantuvieron el color violeta (+), con respecto a su morfología observamos 21 bacilos cortos, 1 bacilo mediano, 3 bacilos largos, 1 coco y dos hongos.

5.4.4 Selección de microorganismos productores de biosurfactante

La hemólisis ha sido utilizada como el criterio inicial de selección de microorganismos productores por la alta probabilidad de que la hemólisis y porque la producción de biosurfactantes está asociada a este fenómeno (Bayoumi et al., 2010; Carrillo et al., 1996).

5.4.4.1 Actividad hemolítica

Una vez identificados los diferentes aislados se procedió a crecer en placas de 5 cm de agar-sangre para observar la capacidad hemolítica a las 48 horas de incubación.

En la tabla 8 se muestra el número de aislados que presentaron actividad hemolítica en placas de agar-sangre, observamos que de los 28 aislados, 8 de ellos dieron positivo a la prueba hemolítica y son potenciales productores de biosurfactantes.

Tabla 8. Actividad hemolítica de aislados de sedimentos marinos.

Sitio de muestreo	Aislados (+) hemolisis	Radio de hemólisis (mm)
2	Aislado 2c'	1
3	Aislado 3a	1
4	Aislado 4d	3
5	Aislado 5c	3
5	Aislado 5e'	1

6	Aislado 6a	7
6	Aislado 6c	1
6	Aislado 6d'	1

De las diferentes zonas de muestreo los aislados donde se observó mayor capacidad hemolítica fue en la zona de muestreo 6, donde los más grandes halos de inhibición observados (7 mm) fueron del aislado 6a, seguida de la 6c y la 6d' con un radio de inhibición de 3 mm, en la figura 14 se muestra además la caja control sin adición de microorganismos. Para esta prueba de hemólisis se pretendió utilizar como control positivo a *Serratia marcescens* SM3 reportada como productora de biosurfactante (Rosas-Galván, 2011), sin embargo esta no creció muy probablemente por la alta concentración de cloruro de sodio presente en el medio (20 g/L).

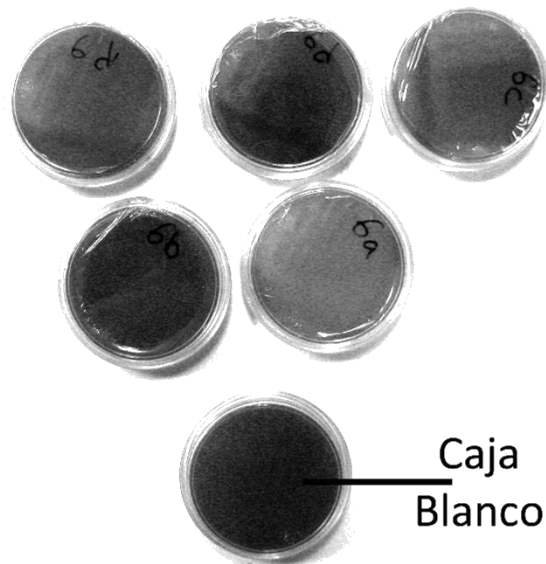


Figura 14. Actividad hemolítica de los aislados de sedimentos marinos de la zona de muestreo 6.

Se ha reportado ampliamente el uso de la técnica de hemólisis para cuantificar surfactina y ramnolípidos, además para la selección de nuevos aislados productores de biosurfactantes, se sabe además que los diámetros de hemólisis están directamente relacionados a la producción y cuantificación de biosurfactantes (Banat, 1993; Yonebayashi et al., 2000; Youssef et al., 2004). En la figura 15 observamos los halos de actividad hemolítica que se presentaron por diferentes aislados.

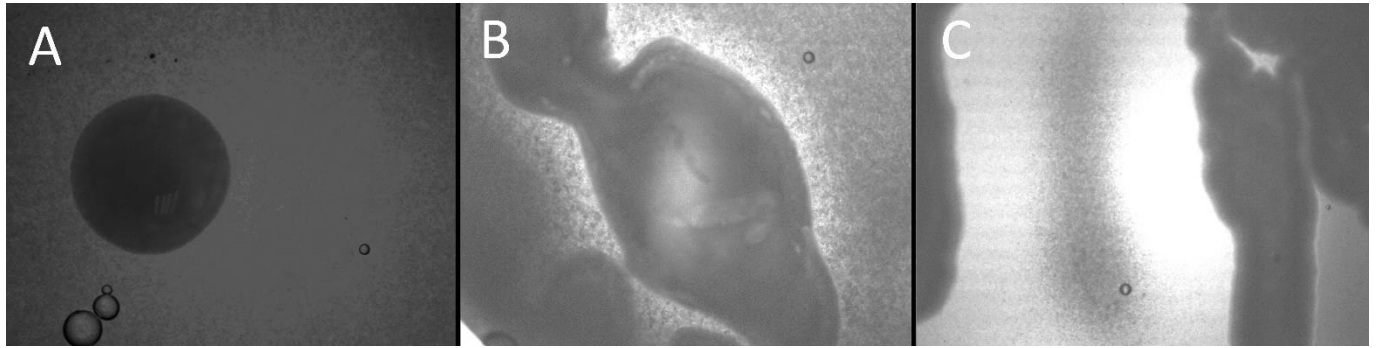


Figura 15. Halos de actividad hemolítica. A. Caja control negativo aislado 6b, B. Aislado 4d, C. Aislado 6a.

Para confirmar que la actividad hemolítica está asociada a la producción de biosurfactantes se procedió a crecerlos en medio líquido para medir la evolución de la tensión superficial, prueba de colapso por gota e índice de emulsión

5.4.4.2 Crecimiento en medio líquido de cepas aisladas de sedimentos marinos

Los 8 aislados que presentaron actividad hemolítica se probaron en medio líquido para la determinación de tensión superficial, se incluyó además en esta prueba a los aislados 6b y 6d como controles negativos para corroborar la relación en la producción de biosurfactante con la actividad hemolítica.

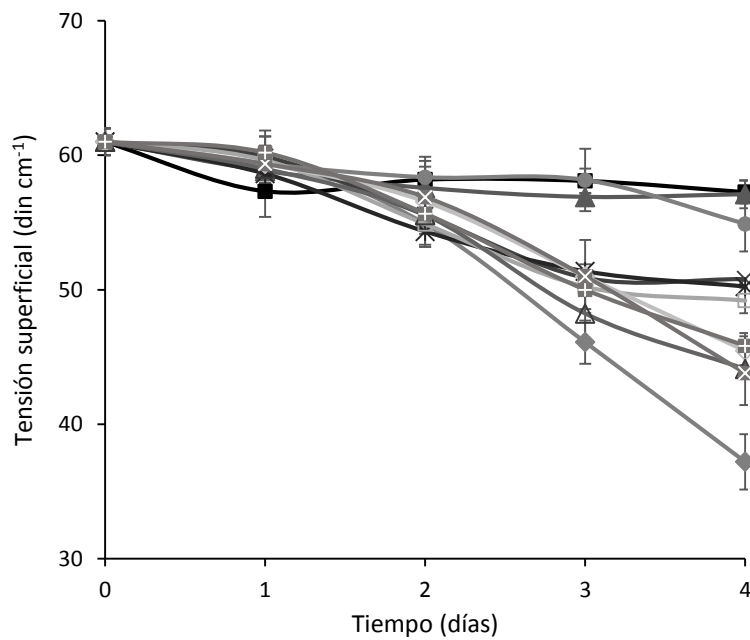


Figura 16. Evolución de la tensión superficial por los aislados de sedimentos marinos en MS. ■ Control ◆ 6a ▲ 6b × 6c ● 6d * 6d' □ 2c' ◇ 3a △ 4d X 5c + 5e'.

En la figura 16 se muestran las cinéticas de producción de biosurfactantes en 4 días de incubación en el medio MS, los aislados 6b y 6d que se utilizaron como control negativo, mostraron un comportamiento similar al control abiótico, en la tabla 9 se muestran los valores de tensión superficial de los días 3 y 4. El aislado que mostró mayor disminución de la tensión superficial fue la 6a (bacilo corto gram+) hasta un valor de 37.2 din/cm^{-1} en el día 4 de incubación, se observa que el valor es significativamente diferentes a los demás aislados ($P < 0.05$). En el día tres el valor de la tensión superficial del aislado 6a es de 46.10 din/cm^{-1} , sin embargo en este día no es significativamente diferente del aislado 4d con un valor de 48.23 din/cm^{-1} .

Tabla 9. Tensión superficial de los cultivos de aislados a los 3 y 4 días de incubación.

Aislado	Tensión superficial día 3	Tensión superficial día 4
Control	58.1 A	57.27 A
Aislado 2c'	50.23 BC	49.20 B
Aislado 3a	51.00 B	45.47 C
Aislado 4d	48.23 CD	44.10 C
Aislado 5c	51.00 B	43.80 C
Aislado 5e'	50.00 BC	45.83 C
Aislado 6a	46.10 D	37.20 D
Aislado 6b	56.90 A	57.10 A
Aislado 6c	50.90 BC	50.80 B
Aislado 6d	58.17 A	54.90 A
Aislado 6d'	51.37 B	50.23 B

Letras iguales no presentan diferencias significativas en la prueba de tukey a $P = 0.05$.

Para comparar si la actividad surfactante puede ser observada en medios sin NaCl, se cultivaron nuevamente en solo el medio mineral simple (MM) y se determinó la tensión superficial, los resultados son mostrados en la figura 17, el comportamiento de los aislados no es mismo en el día 3 de incubación, se observa que el aislado 6a no es el que obtuvo el valor menor de la tensión superficial. Al día 4 de incubación el aislado 6a fue el que obtuvo el menor valor de la tensión superficial de 45.03 din/cm^{-1} .

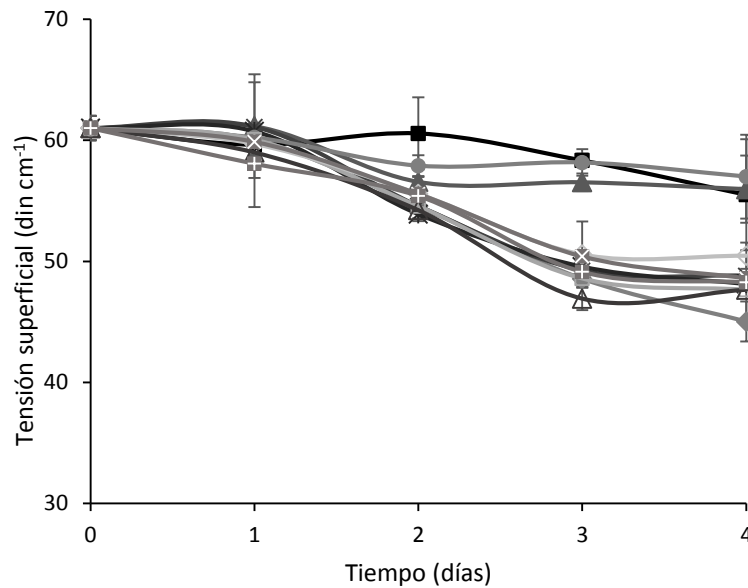


Figura 17. Evolución de la tensión superficial por los aislados de sedimentos marinos en MM. ■ Control ◆ 6a ▲ 6b × 6c ● 6d * 6d' □ 2c' ◇ 3a △ 4d ✕ 5c + 5e'.

En la tabla 10 se muestra el análisis comparativo de la disminución de la tensión superficial en los 3 y 4 días de incubación. Observamos que no se encuentran diferencias significativas para los aislados 2c', 4d, 5c, 5e', 6a, 6c y 6d para el menor valor de la tensión superficial.

Tabla 10. Tensión superficial de los cultivos de aislados a los 3 y 4 días de incubación.

Aislado	Tensión superficial día 3	Tensión superficial día 4
Control	58.33 A	55.5 A
Aislado 2c'	48.60 BC	47.67 BC
Aislado 3a	50.57 B	50.47 B
Aislado 4d	46.93 C	47.67 BC
Aislado 5c	50.40 B	48.60 BC
Aislado 5e'	49.13 BC	48.27 BC
Aislado 6a	48.57 BC	45.03 C
Aislado 6b	56.53 A	55.97 A
Aislado 6c	49.23 BC	48.80 BC
Aislado 6d	58.17 A	57.0 BC
Aislado 6d'	49.57 BC	48.13 A

Letras iguales no presentan diferencias significativas en la prueba de tukey a P=0.05.

Se observa que los 8 aislados evaluados que presentan hemólisis pueden reducir la tensión superficial con respecto al control abiótico. Los dos aislados control, no presentaron disminución de la tensión superficial. Para confirmar que estos aislados son potenciales

productores de biosurfactantes se realizó otra prueba confirmatoria utilizando la metodología de colapso por gota

5.4.4.3 Colapso de gota

En la tabla 11 se muestran los resultados de la prueba de colapso de gota. Se utilizó como control negativo al agua y como control positivo al SDS a una concentración de 2mM. Los aislados donde se presentó este colapso fueron las 3a, 4d, 5c, 5é y 6a. Pero solo tres de ellos, la 4d, 5c y 6a dieron positivo en menos de 1 minuto de respuesta, siendo más claro el aislado 6a que fue alrededor del 30 segundos para el colapso de la gota en la superficie del aceite (figura 18).

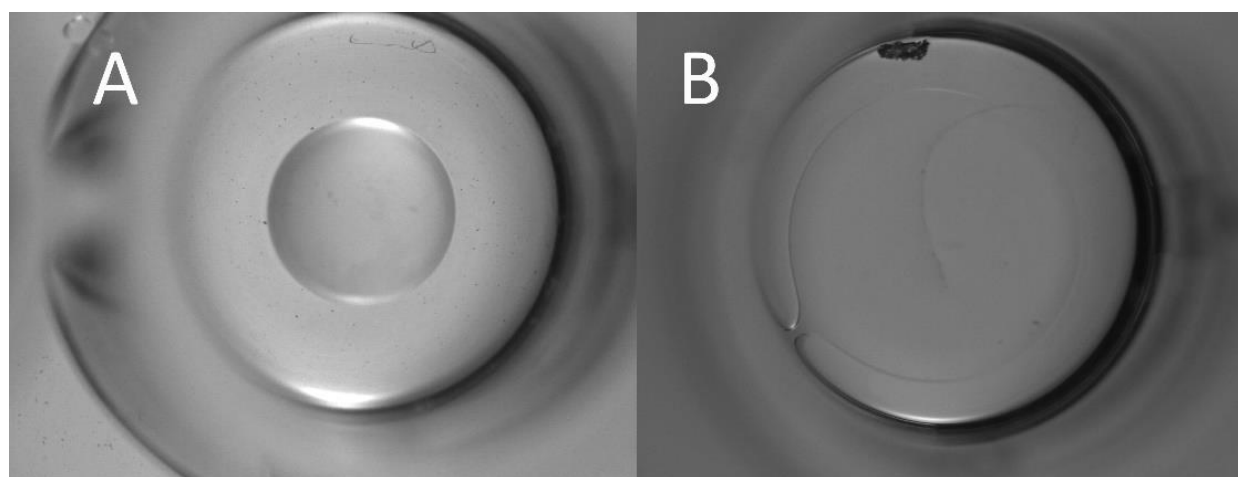


Figura 18. Colapso por gota. A. Control agua, B. Aislado 6a positivo. (Leica 12.5X).

Tabla 11. Colapso de gota de los sobrenadantes

Aislado	Colapso
Control	Negativo
Aislado 2c'	Negativo
Aislado 3a	> 1 min
Aislado 4d	< 1 min
Aislado 5c	< 1 min
Aislado 5e'	> 1 min
Aislado 6a	< 30 seg
Aislado 6b	Negativo
Aislado 6c	Negativo
Aislado 6d	Negativo
Aislado 6d'	Negativo

5.4.4.4 Índice de emulsión (E_{24})

En la tabla 12 se muestran los valores del E_{24} a los 4 días de incubación. El aislado que mostro un mayor índice de emulsión fue el 6a con un 36 % de emulsión seguida por el aislado 4d con el 16 %.

Tabla 12. Índices de emulsión de los aislados de sedimentos marinos crecidos en MS

Aislado	Índice de emulsión (%)
Aislado 2c'	3
Aislado 3a	7
Aislado 4d	16
Aislado 5c	13
Aislado 5e'	7
Aislado 6a	36
Aislado 6b	0
Aislado 6c	0
Aislado 6d	0
Aislado 6d'	10

En la tabla 13 se muestra un resumen de resultados para la selección de cepas productoras de biosurfactantes. Se obtuvieron 28 aislados de los cuales 8 dieron positivo a la prueba de hemólisis. Estos aislados fueron utilizados para la producción de biosurfactantes, realizando las técnicas de tensión superficial, colapso de gota e índice de emulsión. Los aislados seleccionados demostraron su capacidad de disminución de la tensión superficial, sin embargo, fue muy poca la producción de biosurfactantes ya que solo 3 aislaron colapsaron la gota de agua en un tiempo menor a 1 minuto. La última prueba realizada fue la de índice de emulsión donde se observa que el aislado 6a fue el que su sobrenadante presenta un mayor porcentaje de emulsión.

Tabla 13. Resumen de los resultados obtenidos de los diferentes aislados de sedimentos marinos.

Clave	Morfología (100X)	Gram	Hemólisis (mm)	Tensión superficial $mN m^{-1}$	Colapso (min)	E_{24} (%)
2c	Bacilo corto	+	1	49.20 B	Negativo	3
3a	Bacilo corto	+	1	45.47 C	> 1 min	7
4d	Bacilo corto	-	3	44.10 C	< 1 min	16
5c	Bacilo corto	-	3	43.80 C	< 1 min	13
5e'	Bacilo corto	+	1	45.83 C	> 1 min	7
6a	Bacilo corto	+	7	37.20 D	< 30 seg	36
6b	Levadura		0	57.10 A	Negativo	0

6c	Bacilo corto	-	1	50.80 B	Negativo	0
6d	Bacilo mediano	-	0	50.23 B	Negativo	0
6d'	Bacilo largo	-	1	54.90 A	Negativo	10

5.5 Conclusiones

Se obtuvieron 28 aislados de sedimentos marinos del estuario de Coatzacoalcos, de los cuales se encontraron dos hongos y 26 bacterias.

De los aislados obtenidos se encontraron 8 con actividad hemolítica, de los cuales el aislado 6a fue el que presentó mayor actividad.

El protocolo planteado para la selección de bacterias productoras de biosurfactantes arrojo como bacteria potencial productora a la 6a, sin embargo, los cultivos con menores resultados pueden aun ser analizados por otras técnicas como difusión en placa de aceite y prueba de swarming.

La relación concentración de biosurfactante – hemólisis/tensión superficial debe ser analizada en la selección de un mejor medio de cultivo para aumentar la concentración del biosurfactante y poder realizar una caracterización del mismo.

El medio de cultivo seleccionado para enriquecer las poblaciones microbianas deberá contener fuentes de carbono hidrofóbicas para dirigir la selección a microorganismos productores de biosurfactantes.

El aislado 6a crecido en medio MS bajo la tensión superficial a 37.2 mN m^{-1} en 4 días de incubación, este mismo aislado presentó un índice de emulsión de 36 % y dio positivo a la prueba de colapso por gota.

Este aislado será utilizado para identificación y producción de biosurfactantes en fermentador.

Capítulo 6. Selección de medios de cultivo para el aislamiento de microorganismos de columna de agua y sedimentos provenientes del Golfo de México con actividad biotensoactiva y bioemulsificante

6.1 Golfo de México

El Golfo de México forma parte de la región del Gran Caribe y se le considera la cuenca de aguas protegidas mas grande del Océano Atlántico con 1.8 millones de km². Este es un sistema semi-cerrado con una entrada de agua oceánica por el Mar Caribe a través del canal de Yucatán , que tiene una profundidad de 1900 m, y con una salida al Océano Atlántico a través del estrecho de la Florida entre la Península de Florida y Cuba, en donde la profundidad es alrededor de 900 m. El Golfo alcanza los 3700 m, en su parte mas profunda en la fosa Sigsbee y los 200 m en sus grande extensiones de plataforma continental (Aguilar et al., 2007).

6.1.2 Zona 2. Escarpe y Cinturón Plegado Perdido

El Cinturón Plegado Perdido (CPP) se ubica en el Golfo de México, en aguas profundas de México y Estados Unidos. Está formado por la franja de pliegues orientada de nor-noreste a sur-suroeste que tienen núcleo salino autóctono y están armados en un paquete sedimentario que va desde el Jurásico Superior hasta el Terciario.

El CPP se ubica en el Golfo de México, en aguas profundas de las zonas económicas de México y Estados Unidos. En México comprende un área aproximada de 27230 m². Fisiográficamente se encuentra en la parte nor-occidental de la planicie de Sigsbee y al oriente del escarpe perdido. Geológicamente, el CPP está formado por la franja de pliegues que tienen núcleo salino autóctono, armados en un paquete sedimentario que va desde el Jurásico superior hasta el Neógeno, asi como otros pliegues parásitos, que se han formado a partir del ascenso de la sal. Su geometría, distribución geográfica y desarrollo estructural proviene de la interpretación de información sísmica, exclusivamente. La franja plegada se orienta de noreste a suroeste y se puede identificar, en México, al oriente de una zona muy elevada, en la cual existen pocos y desorganizados reflejos bajo la superficie de suelo marino, debido a que se interpreta un cuerpo masivo de sal alóctna somera que impide enfocar reflejos mas profundos por debajo (figura 19).

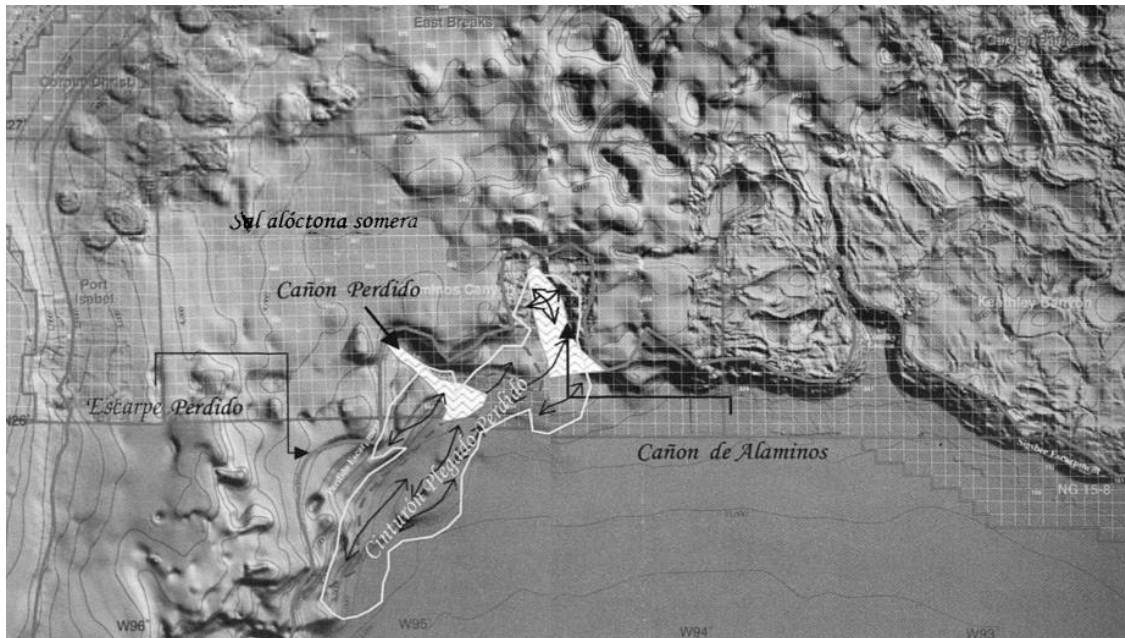


Figura 19. Mapa fisiográfico del noreste del Golfo de México.

6.2 Factores que afectan la producción de biosurfactante

La producción de biosurfactantes puede ser espontánea o inducida por la presencia de compuestos lipófilos, por variaciones de pH, temperatura, aireación y velocidad de agitación, o bien, cuando se presentan problemas de estrés, tales como una baja concentración de nitrógeno (Bhardwaj et al., 2013). Otros factores fisicoquímicos se presentan a continuación

6.2.1 Fuente de carbono

La fuente de carbono juega un papel importante en el crecimiento y la producción de biosurfactantes por microorganismos y varía de especie a especie. Por ejemplo, *Torulopsis bombicola* presenta rendimientos bajos cuando se utilizan en combinación diferentes fuentes de carbono como aceites de canola, glucosa y soya que si se utilizan esos mismos por separado (Cooper & Paddock, 1984; Kim et al., 1997), *Candida lipolítica* redujo la tensión superficial de agua destilada de 71 a 32 din/cm cuando fue crecido sobre residuos industriales, y cuando además fue suplementado con glucosa se obtuvieron mayores rendimientos (Rufino et al., 2007; Sarubbo et al., 2001), *Candida antarctica* es capaz de convertir n-alcenos en lípidos de manosiltritol con un alto rendimiento (Kitamoto et al., 2001) y *Candida ingens* cambia la estructura del biosurfactante cuando se modifica la composición del medio añadiendo ácidos

grasos (Anderson & Henrysson, 1996), es así que existe una relación directa entre el tipo de sustrato con los rendimientos y el tipo de biosurfactante producido.

6.2.2 Fuente de nitrógeno

Este es el segundo suplemento mas importante para la producción de biosurfactantes por microorganismos. En los procesos fermentativos, la relación carbono/nitrógeno afecta la acumulación de metabolitos. Altas relaciones C/N (es decir, bajos niveles de nitrógeno) limitan el crecimiento bacteriano, lo que favorece el metabolismo celular hacia la producción de metabolitos. En contraste el exceso de nitrógeno conduce a la síntesis de material celular y limita la acumulación de productos (Abouseoud et al., 2008; Robert et al., 1989; A. Santos et al., 2002). Se han utilizado diferentes fuentes orgánicas e inorgánicas para la producción de biosurfactantes, para *Pseudomona aeruginosa* NaNO_3 demostró ser mas eficaz que $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Mulligan & Gibbs, 1989; Santa Anna et al., 2001). Esto se debe a que la asimilación de nitratos es mas lenta en comparación al amonio y simula limitaciones de nitrógeno, que es favorable a la formación de ramnolípidos.

6.2.3 Condiciones de fermentación

Las condiciones de crecimiento (temperatura, pH, velocidad de agitación y oxígeno) también pueden influir en la producción del biosurfactante. Diferentes especies de microorganismos productores de biosurfactantes pueden crecer de entre un pH 5.5 y 7.8. Diferentes procesos microbianos se ven afectados por incluso pequeños cambios de temperatura que pueden ir desde 20 hasta 30 °C. El tiempo de incubación también ejerce un efecto significativo sobre la producción del biosurfactante. Los microorganismos producen biosurfactante en diferentes intervalos de tiempo, la producción máxima se puede encontrar desde los 5 días de incubación hasta los 11 días. Por otra parte, un aumento de la velocidad de agitación favorece la acumulación del biotensoactivo (D. K. Santos et al., 2016).

6.3 Rutas metabólicas para la producción de biosurfactantes

Los sustratos hidrofílicos se utilizan principalmente por los microorganismos para el metabolismo celular y la síntesis de la fracción polar de un biotensioactivo, mientras que los sustratos hidrofóbicos se utilizan exclusivamente para la producción de hidrocarburos de un biotensioactivo (Desai & Banat, 1997; Weber et al., 1992). Diversas rutas metabólicas están implicadas en la síntesis de los precursores para la producción de biosurfactantes y dependen de la naturaleza de las principales fuentes de carbono empleadas en el medio de cultivo. Por ejemplo, cuando los carbohidratos son la única fuente de carbono para la producción de un glicolípido, el flujo de carbono se regula de tal manera que ambas vías lipogénicas (formación de lípidos) la formación de la fracción hidrofóbica a través de la vía glucolítica se suprimen por el metabolismo microbiano como se puede ver en la figura 29. Un sustrato hidrofóbico, tal como glucosa o el glicerol, se degrada hasta formar los compuestos intermediarios de la vía glicolítica, tales como la glucosa 6-fosfato, que es uno de los principales precursores de carbohidratos que se encuentran en el residuo hidrofóbico de un biotensioactivo. Para la producción de los lípidos, la glucosa se oxida a piruvato a través de la glucólisis y el piruvato posteriormente se convierte en acetil-CoA, que produce la malonil-CoA cuando se une con oxaloacetato, seguido por conversión en un ácido graso, que es uno de los precursores para la síntesis de los lípidos.

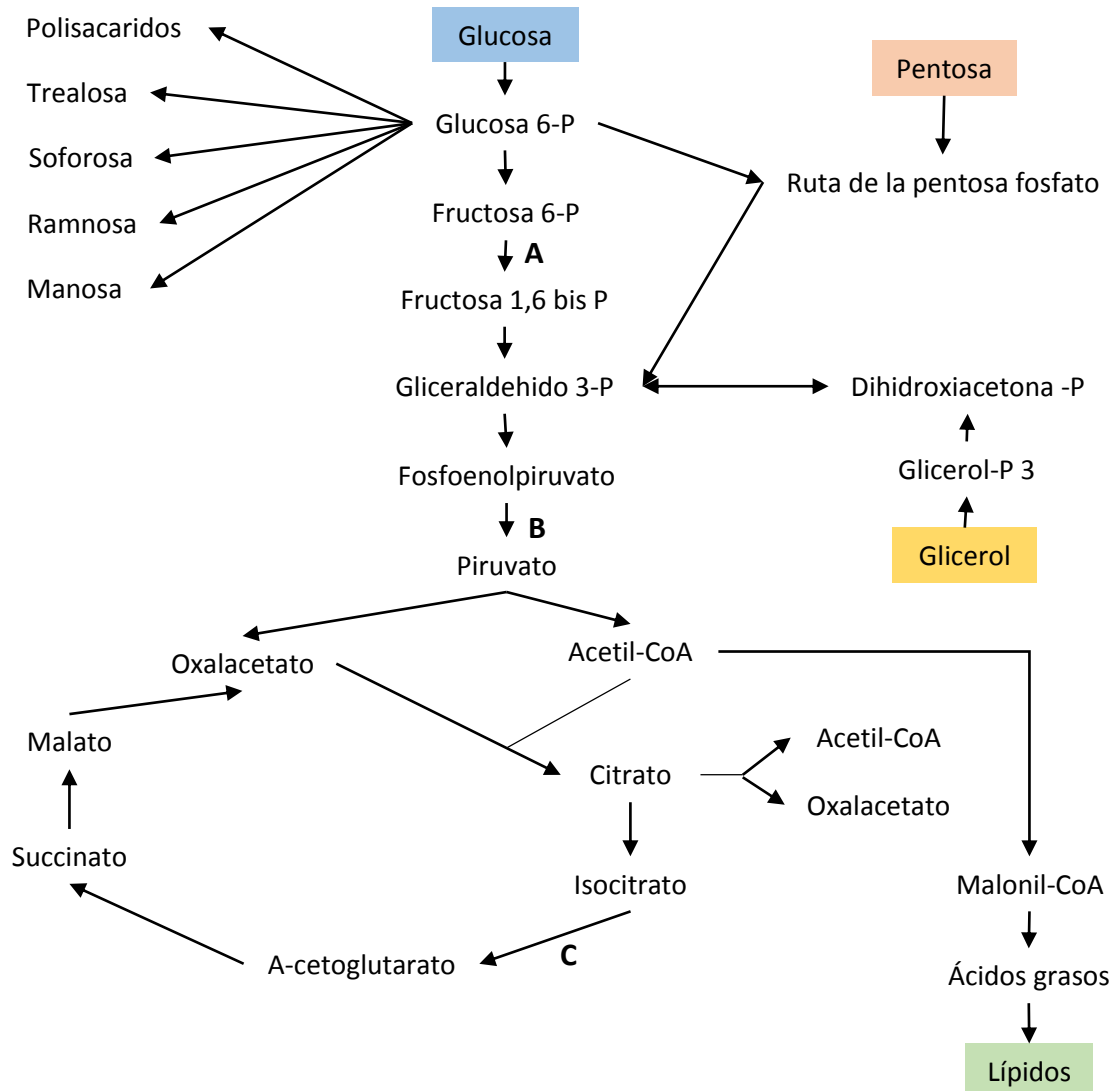


Figura 20. Intermediarios del metabolismo relacionados con la síntesis de precursores de biosurfactantes con el uso de carbohidratos como sustratos. Regulación enzimática para el control del flujo de carbono: **A)** fosfofructoquinasa; **B)** Piruvato quinasa; **C)** isocitrato deshidrogenasa

Cuando un hidrocarburo se utiliza como fuente de carbono, sin embargo, el mecanismo microbiano está dirigido principalmente a la vía lipolítica y gluconeogénesis (formación de glucosa a través de diferentes precursores de hexosas), lo que permite su uso para la producción de ácidos grasos o azúcares. La vía de la gluconeogénesis se activa para la producción de azúcares. Esta vía consiste en la oxidación de los ácidos grasos a través de β -oxidación a acetil-CoA (o propionil-CoA en el caso de ácidos grasos de cadena impar). A partir de la formación de acetil-CoA, las reacciones implicadas en la síntesis de precursores de polisacáridos, tales como la glucosa 6-fosfato, son esencialmente la inversa de los implicados en la glicólisis. Sin embargo, las

reacciones catalizadas por la piruvato quinasa y la fosfofructoquinasa-1 son irreversibles. Por lo tanto, se requieren de otras enzimas exclusivas para el proceso de gluconeogénesis para evitar tales reacciones. En la figura 21 se muestran las reacciones principales a través de la formación de glucosa 6-fosfato, que es el precursor principal de polisacáridos y disacáridos formado para la producción de la fracción hidrofílica de glicolípidos.

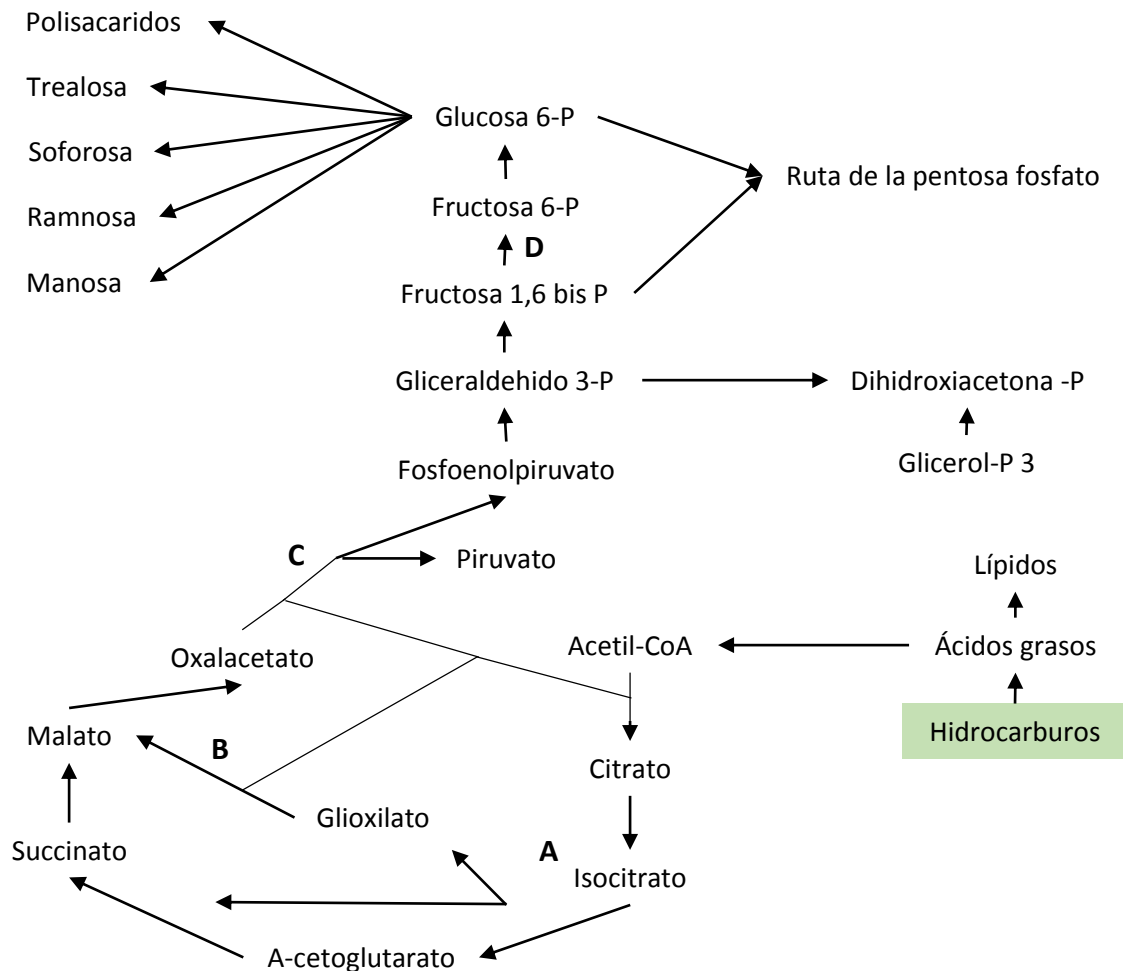


Figura 21. Intermediarios del metabolismo relacionados a la síntesis de precursores de biosurfactantes utilizando como fuente de carbono a los hidrocarburos. Enzimas de regulación: **A**) isocitrato liasa; **B**) Malato sintasa; **C**) Fosfoenolpiruvato; **D**) Fructosa-1.

Los biosurfactantes producidos para poder aplicarse en yacimientos petrolíferos se les deben de realizar diferentes pruebas de estabilidad, ya que serán expuestos a diferentes condiciones de presión, temperatura, salinidad y pH (Brown, 2010). La producción de biosurfactantes y sus rendimientos en presencia de parafinas provoca que los microorganismos

no presenten limitaciones para crecer y metabolizar a alta presión, altas temperatura y diferentes concentraciones salinas (Sakthipriya et al., 2015a, 2015b)

6.4 Metodología

La campaña oceanográfica Met-01 se realizó en el buque oceanográfico UAT-1 que tiene su embarcadero en la ciudad de Tampico, Tamaulipas. Los sitios de muestreo se seleccionaron en función de las futuras áreas de explotación de hidrocarburos en la región geológica al norte del cinturón plegado de Perdido (tabla 14)

Tabla 14. Coordenadas de los sitios de muestreo de la campaña Met-01

Sitio	Longitud [E]	Latitud [N]	Profundidad estimada (m)
E1	96	25.83	600
E2	95.5	25.83	1500
E3	94.5	25.83	2800

Los muestreos en columna de agua se llevarán a cabo con una roseta de muestreo en donde se montarán 12 botellas Niskin de 20 litros y equipos CTD LADCP/ADCP. Los sensores, previamente calibrados, con que contará el CTD serán para el registro de profundidad, temperatura, salinidad, densidad, oxígeno disuelto y fluorimetría. En un primer lance cercano al fondo, se registrarán estos parámetros, para definir la profundidad de los muestreos en el máximo de clorofila y en el mínimo de oxígeno. El muestreo en la masa de agua “intermedia” se ha situado de manera sistemática en los 1000 m, profundidad en donde constantemente se registra una densidad entre 26.5 y 26.7, característica de esta masa de agua.

Los sedimentos serán colectados con un nucleador de caja en cada una de las estaciones (figura 20). Una vez que se ha recuperado el nucleador de caja y que está asegurado en la cubierta, se evacúa el agua que cubre los sedimentos hasta el techo de la caja y se procede a efectuar submuestreos.



Figura 22. Derrotero Metagenómica Agosto 2015

Durante la campaña Met-01, se tomaron alícuotas de las muestras de columna de agua y sedimento adicionándose como inóculo a frascos con medios de cultivo para el enriquecimiento de las poblaciones microbianas presentes (en presencia y ausencia de petróleo crudo Bacaf Alfa) y fueron incubados a 4 °C. Los cultivos enriquecidos se mantuvieron a 4 °C durante 20 días y se evaluó el crecimiento bacteriano UFC/ml (Cuenta viable). Se tomaron alícuotas de estos cultivos con diferentes propósitos: a) para su conservación a -20C en 50 % de glicerol; b) para su propagación en enriquecimiento en otros hidrocarburos; y c) búsqueda de actividades biosurfactantes (UAEM).

Para incrementar las poblaciones microbianas presentes y seleccionar los consorcios productores de BS y degradadores se tomaron muestras de los cultivos iniciales y se inocularon en un medio de cultivo selectivo para microorganismos productores de biosurfactantes diseñado por Rosas-Galvan et al. (2018). Los cultivos enriquecidos fueron reinoculados en medios suplementado con dos tipos de mezclas de hidrocarburos (Petróleo ligero-diafano y Petróleo crudo-Bacaf Alfa) y concentraciones (tabla 15). Estos cultivos fueron incubados a 4 °C para evaluar su capacidad tensoactiva.

Tabla 15. Mezclas de hidrocarburos empleados en la selección de consorcios degradadores de hidrocarburos.

Medio de cultivo	Fuente de carbono	
	Diáfano (ppm)	Petróleo (ppm)
1	8000	0
2	4000	1000
3	0	1000

Para la selección de organismos productores de biosurfactantes se utilizaron las técnicas de hemólisis y disminución de la Tensión Superficial. Estas pruebas fueron realizadas a los cultivos de las diferentes condiciones (Petróleo ligero-Diáfano, petróleo crudo Bacaf Alfa y una mezcla de ambos) con los consorcios obtenidos de los cultivos iniciales. Ambas pruebas son fundamentales para indicar la producción de sustancias biosurfactantes/biotensoactivas.

Una vez obtenidos los consorcios productores fueron crecidos sobre tres diferentes fuentes de carbono y dos diferentes medios minerales reportados por Mukherjee (2008) y El-Sersy (2012) para incrementar su producción de biosurfactantes.

a) Fuentes de Carbono: Los niveles de las fuentes de carbono evaluadas fueron: 10 y 20 g/L Sacarosa, Glucosa y Maltosa

b) Medios Minerales

Medio Mineral 1 (MM1) g/L

(NH ₄)SO ₄	7
Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	3.8
KH ₂ PO ₄	3.5
MgSO ₄ •7H ₂ O	7
Extracto de Levadura	0.5

(El-Sersy, 2012)

Medio Mineral 2 (MM2) g/L

NH ₄ NO ₃	3.3
K ₂ HPO ₄	2.2
KH ₂ PO ₄	0.14
NaCl	0.01
MgSO ₄	0.6
CaCl	0.04
FeSO ₄	0.2

(Mukherjee et al., 2008)

Ambos medios fueron suplementado con 0.5mL L⁻¹ de una solución traza que contiene los siguientes elementos:

ZnSO ₄ •7H ₂ O	2.32
MnSO ₄ •4H ₂ O	1.78
H ₃ BO ₃	0.56
CuSO ₄ •5H ₂ O	1
Na ₂ MoO ₄ •H ₂ O	0.39
CoCl ₂	0.42
EDTA	1
NiCl ₂	0.004
KI	0.66

Para evaluar el efecto de diferentes fuentes de carbono, dos medios minerales y de los dos consorcios microbianos (MF y MO) se propuso realizar un diseño experimental de parcelas divididas como se muestra en Tabla 16.

Tabla 16. Efecto de las fuentes de carbono, medio mineral y consorcio utilizado sobre la actividad biosurfactante. (Diseño de parcela dividida)

MM1	Sacarosa		Glucosa		Maltosa	
	MF	MO	MF	MO	MF	MO
MM2	Sacarosa		Glucosa		Maltosa	
	MF	MO	MF	MO	MF	MO

Se llevaron a cabo 12 tratamientos por triplicado (36 experimentos totales). La evolución del crecimiento microbiano y de la disminución de la Tensión Superficial (TS) fueron determinados cada 24 horas durante 15 días.

6.5 Resultados

Se colectaron muestras para el aislamiento de los consorcios microbianos a distintas profundidades de columna de agua y sedimentos obtenidas de la primera Campaña de Metagenómica de CiGOM /Septiembre 2015). Se obtuvieron 3 muestras de columna de agua de la Estación 1, 1 muestra de columna de agua de la Estación 2 y 1 muestra de sedimento de la Estación 3 (figura 20).

6.5.1 Gradientes fisicoquímicos del Golfo de México

Las zonas de muestreo en la columna de agua fueron seleccionadas de acuerdo a los registros de los sensores de la roseta, la región de máxima fluorescencia se encontró entre los 30 y 82 m de profundidad, la región de mínimo de oxígeno se encontró entre los 253 y 456 m de profundidad, agua intermedia (1000 m) se colectó cuando la profundidad fue mayor a 1100 m. Los resultados de la batimetría se muestran en la figura 23, en base a estos datos se realizó la toma de muestra.

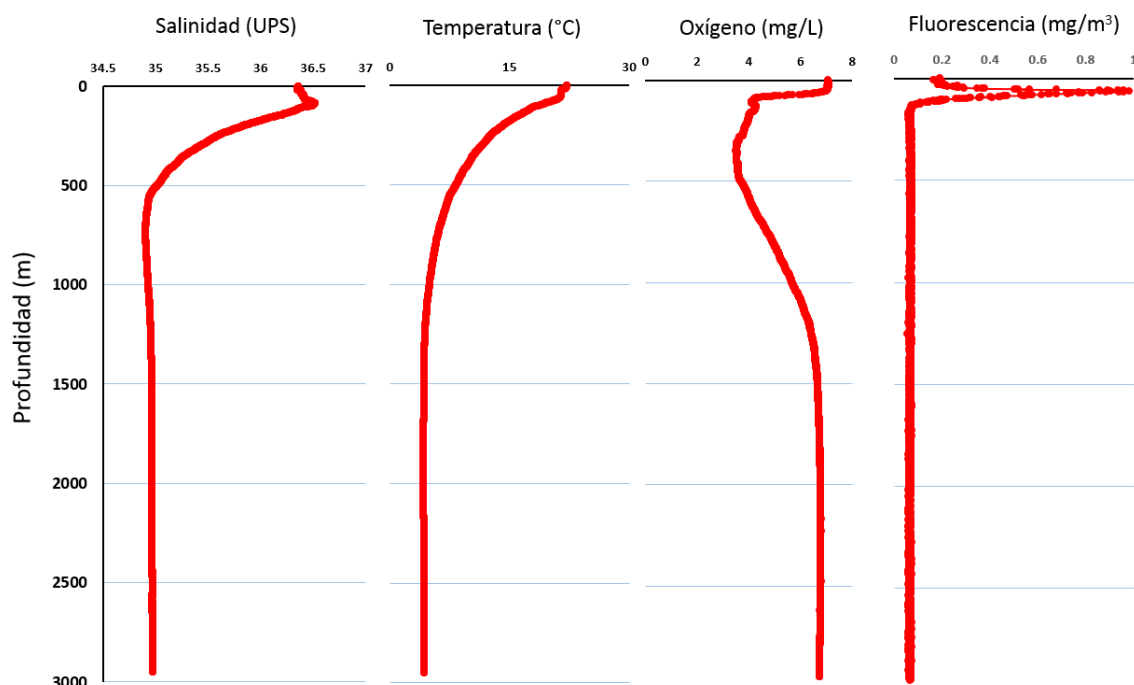


Figura 23. Batimetría del Golfo de México

6.5.2 Cultivos enriquecidos

Los cultivos enriquecidos de las muestras de las diferentes condiciones después de 20 días de incubación a 4 °C presentaron crecimiento y éste fue cuantificado utilizando la cuenta viable. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 17.

Tabla 17. Crecimiento en 20 días de incubación.

Muestra	Medio Surfactantes (UFC / mL X 10 ⁵)	Medio Degradadoras (UFC / mL X 10 ⁵)
E1 Max Fluorescencia	289	75
E1 Min Oxígeno	125	21.3

E1 Fondo	3.2	1.52
E2 1000 m	174	61.5
E3 Sedimento	0.23	0.11

Se observa que las muestras obtenidas en máximo de fluorescencia presentaron el mayor crecimiento y menor para aquellas provenientes de Sedimentos y de Fondo. Este es un resultado esperado debido a que el crecimiento se realiza en condiciones aerobias. En los cultivos con la adición de petróleo se observa emulsificación del mismo (Figura 24).

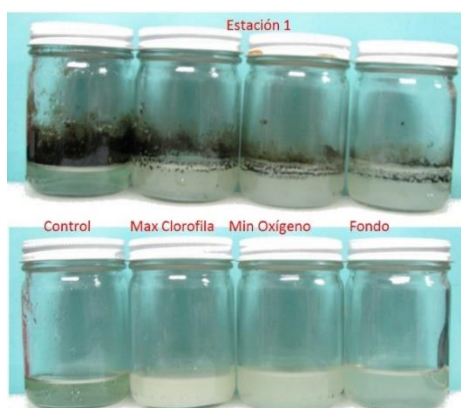


Figura 24. Crecimiento en medio líquido de las muestras de la estación 1 a 20 días de incubación.

Para continuar con la aclimatación y enriquecimiento se inocularon los consorcios a medios de cultivo fresco y con petróleo diáfano y crudo. Se observó crecimiento entre 4 y 5 días (Figura 25). A estos cultivos se evaluó la actividad biosurfactante de cada consorcio obtenido previamente.

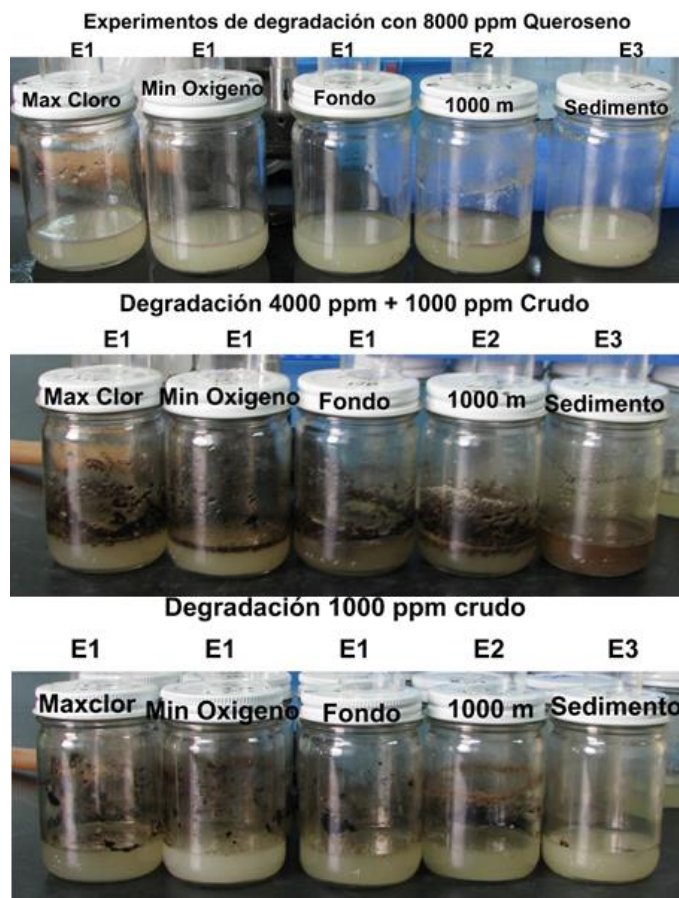


Figura 25. Cultivos para la selección de consorcios degradadores.

Para la evaluación de la actividad biosurfactante se inocularon los consorcios directamente sobre un medio con Agar-sangre para evaluar la formación de halos que indican el grado de hemólisis. En la figura 26 se muestran los resultados obtenidos del ensayo. Las pruebas de hemólisis fueron positivas para las muestras colectadas en máximo Fluorescencia y mínimo oxígeno, lo que indica la actividad biosurfactante no obstante es necesario confirmar este resultado con otras pruebas. Para ello se evaluó la disminución de la Tensión superficial a los sobrenadantes de los cultivos enriquecidos en las diferentes condiciones. En todos los casos se observó reducción de la Tensión Superficial (57.8 a 43.5 mN/m) al comparar con el medio control (63 mN/m) (Tabla 18).

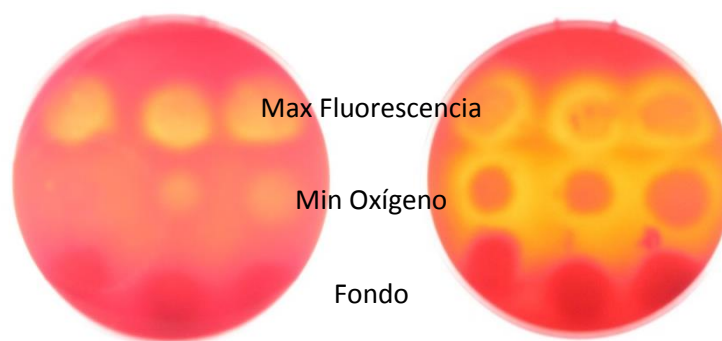


Figura 26. Actividad hemolítica de las muestras de la estación 1.

Tabla 18. Disminución de la tensión superficial de los cultivos de consorcios obtenidos del escarpe de Perdido

Muestra	Día 3	Día 4	Día 5
Control	63	61.3	62.1
E1 Max Fluorescencia	51	46.6	53
E1 Min Oxígeno	52.9	49.5	43.9
E1 Fondo	54.5	53	52.5
E2 1000 m	49.4	48.4	47.8
Sedimento	57.8	49.9	48.8

6.5.3 Efecto de la fuente de carbono y del medio mineral para mejorar la producción de biosurfactantes

Los consorcios utilizados en este estudio, fueron obtenidos previamente del sitio 1 de muestreo del Cinturón Plegado de Perdido. Para ello se utilizaron dos medios de cultivo con y sin petróleo crudo y se incubaron a 4°C durante 45 días. Posteriormente, aislados y conservados en soluciones de glicerol. Los consorcios que mostraron actividad hemolítica fueron los obtenidos por la roseta al máximo de fluorescencia (MF) y mínimo de oxígeno (MO).

En la figura 27 se presentan las cinéticas de crecimiento y evolución de la Tensión Superficial, en los diferentes medios.

Consortio obtenido de la Estación 1 – Máximo Fluorescencia (MF)-MM1

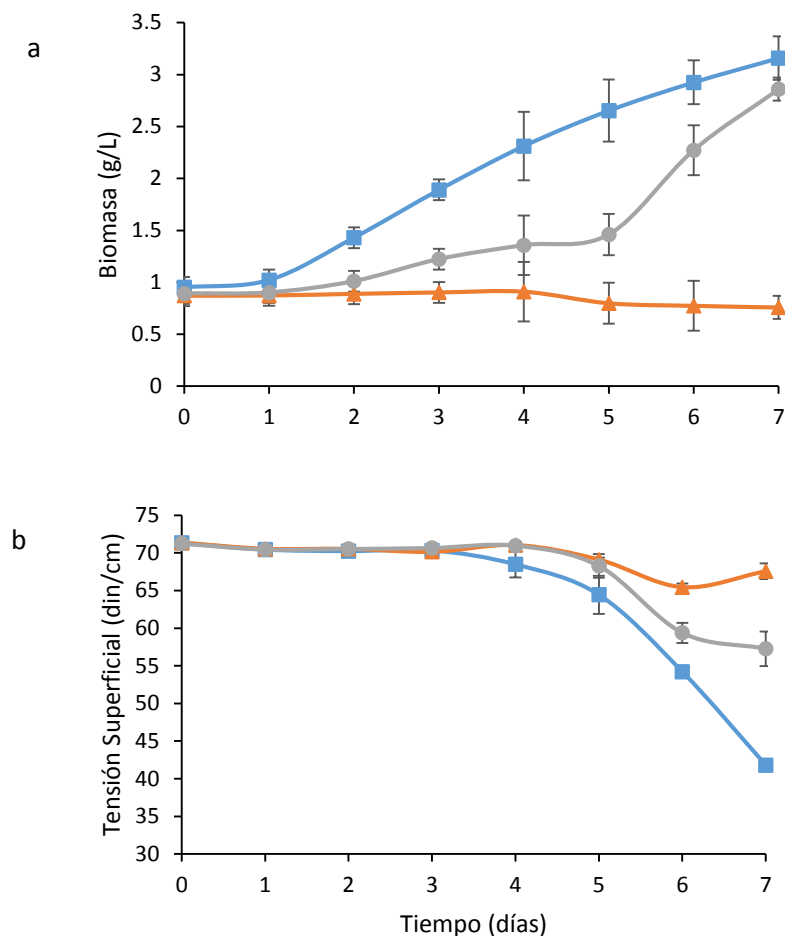


Figura 27. Cinéticas de crecimiento y de disminución de la tensión superficial del consorcio obtenido de la Estación 1 – Máximo Clorofila con el Medio Mineral 1 y tres diferentes fuentes de carbono (■ Sacarosa 20 g/L ▲ Glucosa 20 g/L ● Maltosa 20 g/L)

Se puede observar que para este medio mineral (MM1), la sacarosa utilizada como fuente de carbono favoreció el crecimiento llegando hasta una concentración de 3.16 g/L, seguida de la maltosa con una concentración final de 2.86 g/L. Mientras que los medios con glucosa como fuente de carbono no se observó un crecimiento significativo (Fig. 27a).

Con respecto a la disminución de la Tensión Superficial, se observa que hasta el día 4 la TS permanece sin cambio. A partir de 5 días se observa un cambio significativo de la disminución de la TS. A los 7 días de incubación se obtiene un valor de 41 mN/m, cuando la fuente de carbono

utilizada fue la sacarosa: Mientras que con maltosa el valor mínimo de la disminución de la TS fue de 57 mN/m (figura 27b).

En la figura 28 a y b, se presentan los resultados obtenidos con el medio mineral 2 (MM2).

Consortio obtenido de la Estación 1 – Máximo Clorofila (MC)-MM2

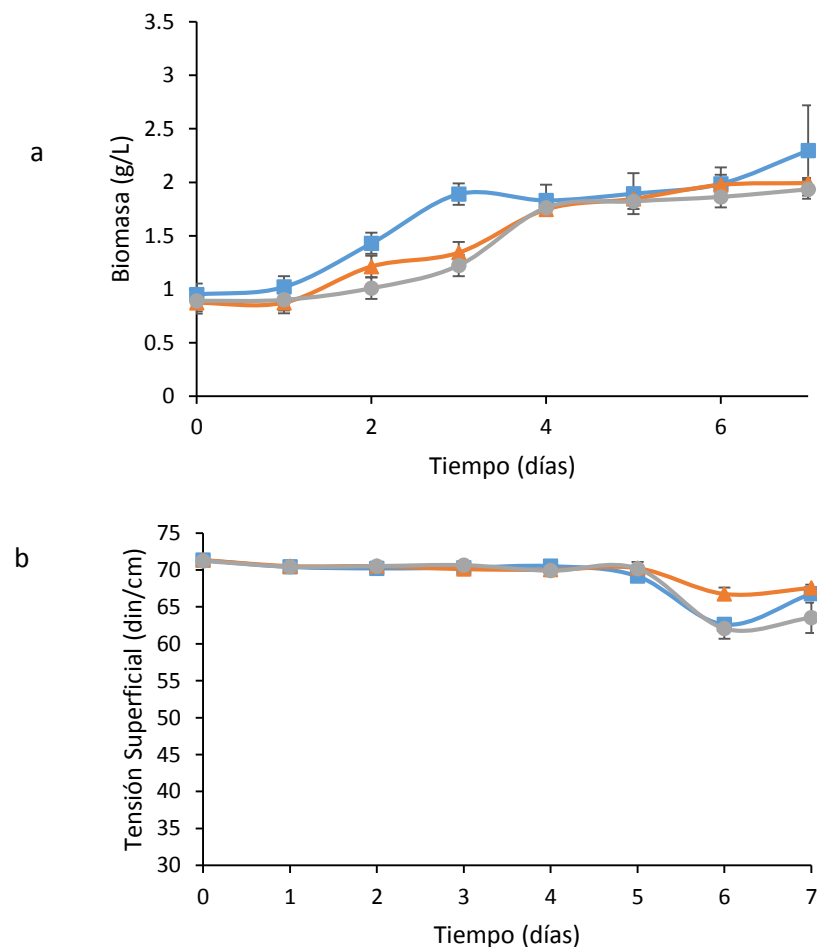


Figura 28. Cinéticas de crecimiento y de disminución de la tensión superficial del consorcio obtenido de la Estación 1 – Máximo Clorofila con el Medio Mineral 2 y tres diferentes fuentes de carbono (■ Sacarosa 20 g/L ▲ Glucosa 20 g/L ● Maltosa 20 g/L)

Se puede observar que para este medio mineral, las tres fuentes de carbono tuvieron efecto en el crecimiento celular, teniendo como valor máximo de 2.29 g/L con sacarosa como fuente de carbono, y un valor de 1.9 g/L para las otras dos fuentes de carbono (Fig. 28a).

Con respecto a la disminución de la tensión superficial (TS), no se observa un cambio significativo de la disminución de la TS sino hasta después del 5 día, los valores fueron de 63 din/cm con maltosa como fuente de carbono (Fig. 28b).

En la figura 29 a y b se presentan los resultados obtenidos para el consorcio MO en medio MM1 y con las diferentes fuentes de carbono.

Consortio obtenido de la Estación 1 – Mínimo de Oxígeno (MM1)

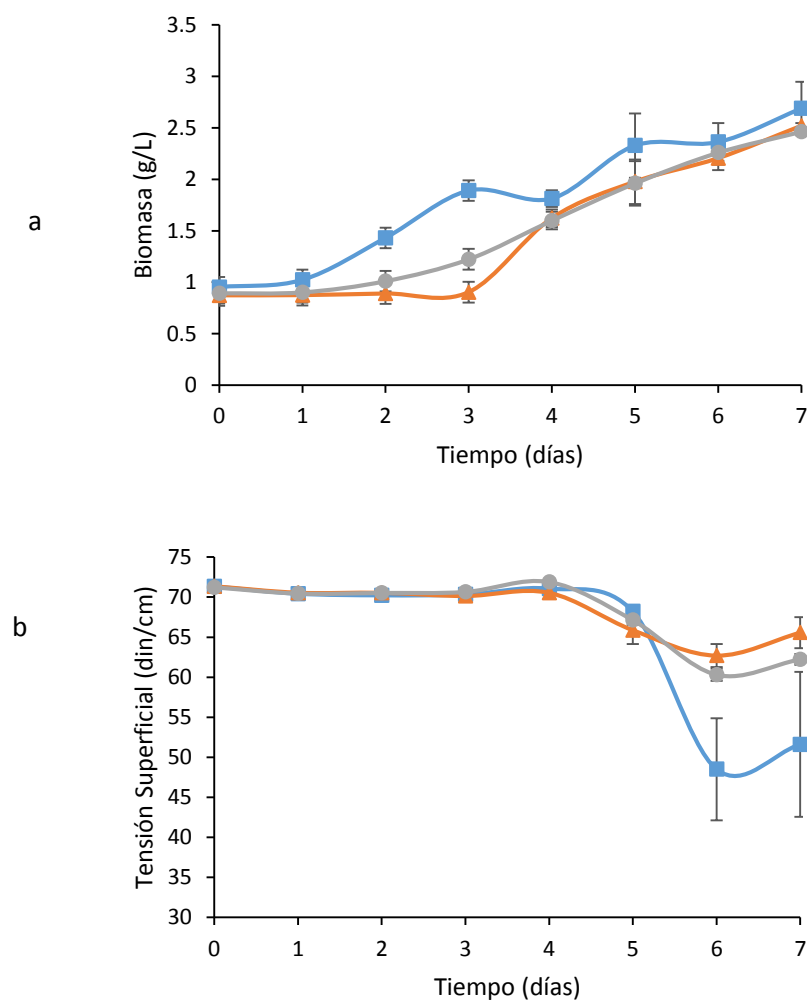


Figura 29. Cinéticas de crecimiento y de disminución de la tensión superficial del consorcio obtenido de la Estación 1 – Mínimo de Oxígeno con el Medio Mineral 1 y tres diferentes fuentes de carbono (■ Sacarosa 20 g/L ▲ Glucosa 20 g/L ● Maltosa 20 g/L).

Se puede observar que para este medio mineral, las tres fuentes de carbono tuvieron efecto en el crecimiento celular, teniendo como valor máximo de 2.68 g/L para cuando se utiliza sacarosa como fuente de carbono, y un valor de 2.5 g/L para cuando se utilizan las otras dos fuentes de carbono (figura 29a).

Con respecto a la disminución de la tensión superficial (TS), no se observa un cambio significativo de la disminución de la TS sino hasta después del 7 día, los valores fueron de 51 din/cm con sacarosa como fuente de carbono. Mientras que para maltosa y glucosa, la disminución fue hasta 62 y 65.5 mN/m, respectivamente (Fig. 29b).

Consorcio obtenido de la Estación 1 – Mínimo de Oxígeno (MM2)

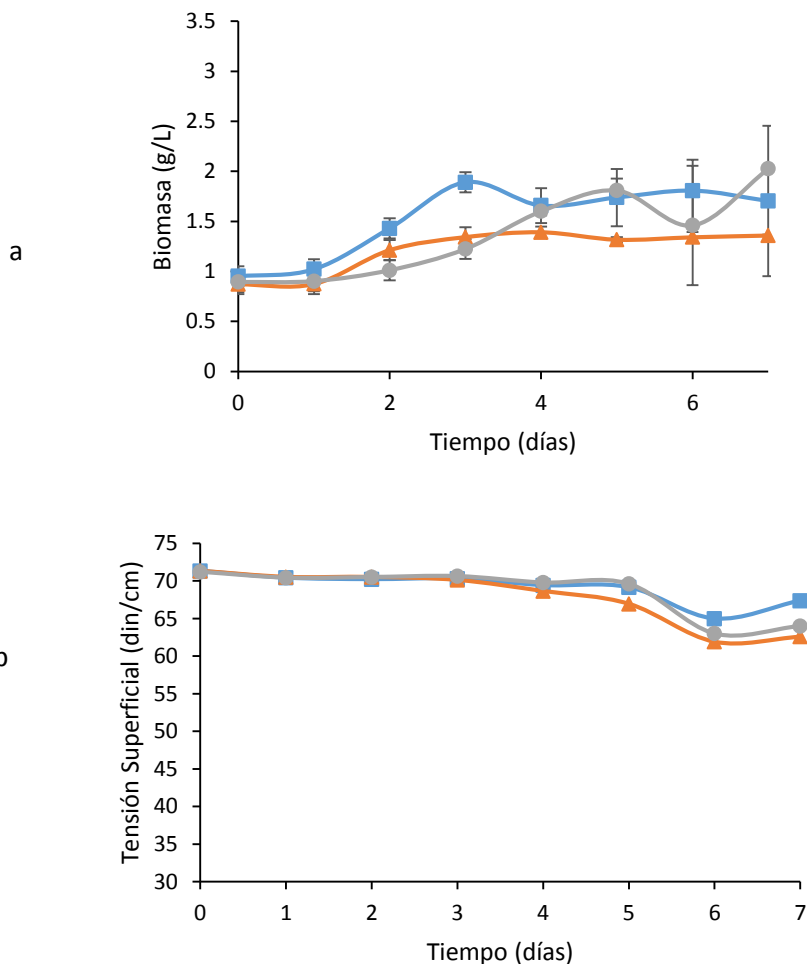


Figura 30. Cinéticas de crecimiento y de disminución de la tensión superficial del consorcio obtenido de la Estación 1 – Mínimo de Oxígeno con el Medio Mineral 2 y tres diferentes fuentes de carbono (■ Sacarosa 20 g/L ▲ Glucosa 20 g/L ● Maltosa 20 g/L)

Se puede observar que para este medio mineral, las tres fuentes de carbono tuvieron efecto en el crecimiento celular, teniendo como valor máximo de 2.02 g/L con maltosa como fuente de carbono. Mientras que valores menores de 1.7 y 1.36 g/L fueron obtenidos para sacarosa y glucosa, respectivamente (Figura 30a).

Con respecto a la disminución de la tensión superficial fue hasta el día 6 donde se aprecia levemente la disminución de la tensión superficial, siendo el menor de 62.6 din/cm con maltosa como fuente de carbono (figura 30b).

5.4.1 Efecto de las fuentes de Carbono, Medio mineral y tipo de consorcio

Análisis estadístico. Diseño de parcelas Divididas.

De acuerdo al se seleccionaron los valores obtenidos de disminución de la TS a 7 días de incubación (20 g/L). En la tabla 19 se presentan los resultados obtenidos del diseño experimental de parcelas divididas y en la Tabla 20 se presenta el análisis de ANOVA.

Tabla 19. Resultados experimentales obtenidos del crecimiento de los consorcios MC y MO en los medios MM1 y 2 y con tres fuentes de carbono.

MM1	Sacarosa			Glucosa			Maltosa		
	C	MC	MO	C	MC	MO	C	MC	MO
TS		41.8	66.8		67.5	67.5		57.2	63.5

MM2	Sacarosa			Glucosa			Maltosa		
	C	MC	MO	C	MC	MO	C	MC	MO
TS		51.6	67.4		65.5	62.6		62.2	64

Se observan que los valores de tensión superficial se encuentran en el rango de 41 a 62 mN/m para el consorcio MF, mientras que para el consorcio MO, valores de TS fueron desde 62 a 67 mN/m. En la Tabla 20 se presenta el análisis de los efectos de las variables estudiadas.

Tabla 20. Análisis de varianza de los resultados obtenidos del diseño experimental de parcelas divididas. (Software estadístico SAS System 9.0).

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	CM	F calc	Pr > F
Medio Mineral	1	175.491	175.491	18.57834	0.023
Fuente de Carbono	2	159.829	79.9145	8.46014186	0.0584
Error A					
Medio M*Fuente de C	2	259.115	129.5575	13.7155939	0.013
Consortio	1	6.586	6.586	0.69722634	0.465
Consortio*Fuente de C	2	40.052	20.026	2.12005082	0.2667
Error B					
MM*FdC*Consortio	3	28.338	9.446		

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis, los efectos significativos son aquellos valores por debajo de $p < 0.05$. En caso se observa que la combinación de fuentes presenta un efecto significativo sobre la disminución de la TS ($p = 0.013$). Mientras que en los efectos individuales el medio de cultivo presentó un efecto significativo en la disminución de la TS ($p = 0.023$). Los resultados obtenidos de estos estudios demuestran que la importancia de evaluar la composición de los medios de cultivo para producción de biosurfactantes.

Cepa aislada del Consortio MF.

Para realizar una selección de las cepas con actividad biosurfactante se consideró la actividad hemolítica como criterio de selección. Para ello las colonias aisladas de ambos consorcios fueron crecidas en medio de agar-sangre (5%). Las cepas cono formación de halo fueron consideradas como positivas. En este caso se seleccionó la que presentó el halo más grande y definido (figura 31).

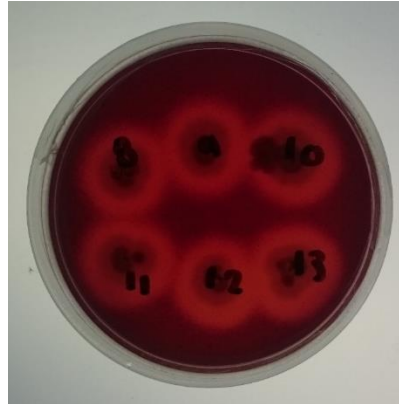


Figura 31. Aislamiento de cepas productoras de biosurfactante en medio agar sangre (prueba de hemólisis)

6.6 Conclusiones

Los consorcios seleccionados de las muestras del escarpe Perdido presentan actividad biosurfactante pueden presentar disminución de la tensión y/o Índice de emulsión.

Se observó un efecto significativo de la composición del medio en la producción del biosurfactante.

La actividad hemolítica permite seleccionar cepas con actividad biosurfactante

Se cuenta con una cepa aislada que puede ser productora potencial de biosurfactante, la cual fue obtenida después de la aclimatación en un medio con hidrocarburos y proveniente de la zona de Máxima fluorescencia.

Este aislado será utilizado para identificación y producción de biosurfactantes en fermentador.

Capítulo 7. Prospección de microorganismos marinos productores de biosurfactantes del Golfo de México

El Golfo de México tiene más filtraciones naturales de petróleo que cualquier área marina en América del Norte, liberando más de 400,000 barriles de petróleo por año. Es altamente probable que la microbiota se adapte al petróleo crudo debido a filtraciones naturales y operaciones de perforación en alta mar que ocurren en el Golfo de México. Por lo tanto, no es de sorprenderse que las comunidades bacterianas respondan rápidamente a la afluencia de petróleo crudo (Hazen et al., 2010). El estudio de la distribución y abundancia de microorganismos primarios en el medio marino es útil para comprender los grandes procesos biológicos y físicos. El Golfo de México es un gran ecosistema marino compartido por México, Estados Unidos y Cuba, y desempeña un papel fundamental en la salud económica de estos países (Schifter et al., 2017). Existen diversas especies de bacterias marinas que se encuentran predominantemente en el agua de mar contaminada con petróleo, y los compuestos que están presentes en la superficie del agua (en caso de derrames de petróleo) tienen una solubilidad muy baja que restringe el acceso de las bacterias a estos compuestos para la degradación. Los BS son producidos por bacterias marinas degradadoras de hidrocarburos en respuesta a la presencia de hidrocarburos insolubles en agua. Se cree que esto facilita la absorción de hidrocarburos por las bacterias (Ibacache-Quiroga et al., 2013; Mohanram et al., 2016; Rahman et al., 2003).

7.1 Zona 3. Bahía de Campeche en el Golfo de México

La zona de estudio dentro de la bahía de Campeche comprende a los Diapiros Salinos de la parte central de la bahía. Este sistema estructural se prolonga hacia el sureste e incide en la zona suroccidental de la Laguna de Términos en punta Xicalango y de la Isla del Carmen, Campeche (Figura 32). La zona de Diapiros Salinos la superficie del fondo es irregular, debido a la presencia de sistemas complejos de fracturas y de fallas transtensivas con movimiento lateral-izquierdo, comúnmente asociados con diapirismos salinos y que frecuentemente sobresalen del fondo marino. Hacia el noreste, en la parte profunda del Golfo de México, el diapirismo salino se prolonga hasta la zona Sigsbee a 3750 m. Estos sistemas estructurales complejos se prolongan hacia el sur, hacia la planicie costera continental de los estados del sur de Veracruz, Tabasco y Campeche, lo que se evidencia en los sistemas fluvio-deltaicos de los ríos Coatzacoalcos, Tonalá-

Mezcalapa y Grijalva-Usumacinta. En el subsuelo profundo de la costa marina y en el continental, los sistemas estructurales se prolongan hacia las cuencas salinas del Istmo, Comalcalco y Macuspana. Las irregularidades del fondo marino obedecen a patrones geométricos definidos de los intrusivos marinos (Aguayo-Camargo, 2004).

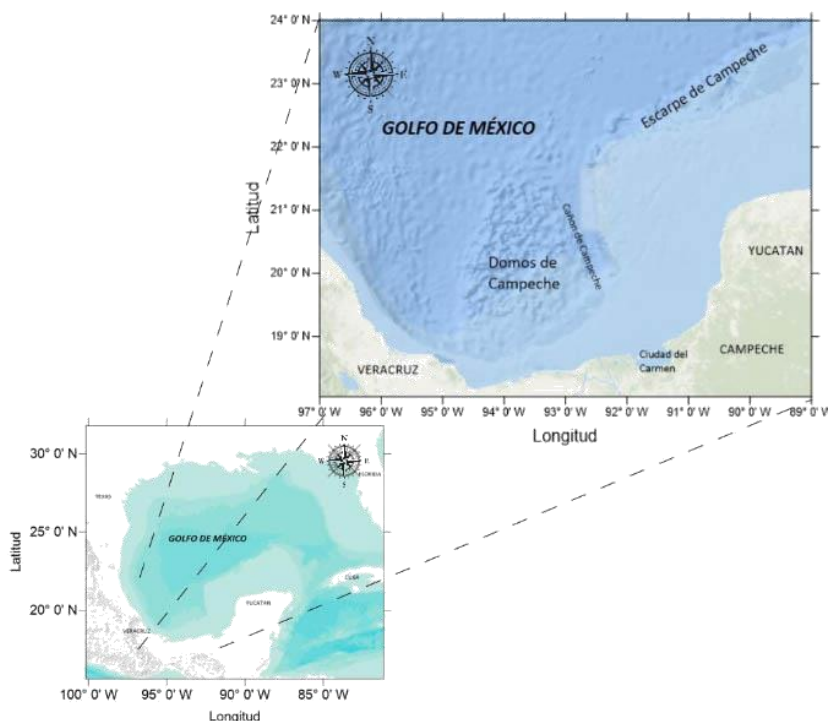


Figura 32. Mapa fisiográfico de la bahía de Campeche (Arredondo Godínez, 2016).

7.2 Materiales y métodos

7.2.1. Toma de muestra en las campañas oceanográficas

Se realizaron dos campañas oceanográficas durante mayo del 2017 y junio del 2018 a bordo del buque oceanográfico Justo Sierra-UNAM que tiene su embarcadero en la ciudad de Tuxpan, Veracruz. Los sitios de muestreo se seleccionaron en función de las futuras áreas de explotación de hidrocarburos en la región geológica al norte del cinturón plegado de Perdido y en la región donde se ubican los proyectos exploratorios denominados por PEMEX como UCHUKIL y CHALABIL, situada frente a las costas entre Coatzacoalcos y Ciudad del Carmen (figura 33). Se tomaron muestras de 18 puntos diferentes en el Golfo de México (tabla 21), en las siguientes profundidades: fluorescencia máxima, oxígeno mínimo, 1000 m, fondo marino y sedimento.

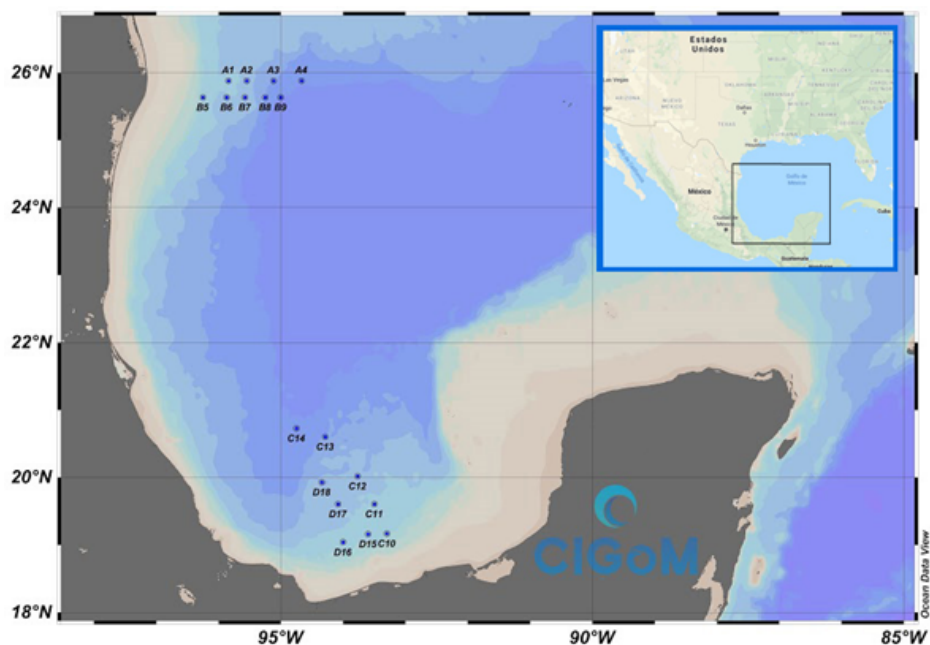


Figura 33. Derrotero de la campaña de muestreo en el Golfo de México. Las ubicaciones de todos los sitios de muestreo están representadas por puntos.

Tabla 21. Coordenadas de los sitios de muestreo de la campaña Met-01

Zona	Ubicación	Longitud [E]	Latitud [N]	Profundidad estimada (m)
Perdido	A1	-95.84	25.88	1000
	A2	-95.55	25.88	1500
	A3	-95.12	25.88	2500
	A4	-94.67	25.88	3200
	B5	-96.25	25.64	550
	B6	-95.87	25.64	1000
	B7	-95.58	25.64	1200
	B8	-95.25	25.64	2400
	B9	-95.00	25.64	3200
Coatzacoalcos	C10	-93.30	19.17	550
	C11	-93.50	19.61	1000
	C12	-93.77	20.02	1500
	C13	-94.29	20.60	2500
	C14	-94.75	20.73	3200
	D15	-93.60	19.16	600
	D16	-94.00	19.04	680
	D17	-94.08	19.61	1000
	D18	-94.34	19.93	1500

Se tomaron muestras de agua usando una roseta oceanográfica con doce botellas de muestreo Niskin de 20 L, que se montaron en una muestra de carrusel que podría activarse para tomar muestras de agua a profundidades estándar. Cada muestra de 100 L de agua de mar se

concentró a 3.5 L usando filtración de flujo tangencial. Se obtuvieron muestras de sedimento con una muestra Ekman box corer. Las muestras se homogeneizaron en un matraz, y luego 50 g de cada muestra y luego se refrigeraron a 4 ° C antes del procesamiento de laboratorio

7.2.2 Preparación de cultivos enriquecidos

Los cultivos enriquecidos se prepararon agregando 5 ml de agua de mar concentrada o 5 g de sedimento en dos matraces de 50 ml, cada matraz contenía medios artificiales agua de mar (Henson et al., 2016) con glicerol como fuente de carbono, glicerol suplementado con 0,1% de aceite crudo, y medio mínimo con 0.1 % de aceite crudo incubándose durante 45 días a 4 ° C.

Los diferentes consorcios se seleccionaron utilizando diferentes pruebas de actividad biosurfactante: actividad emulsificante (IE₂₄), disminución de la tensión superficial (TS), agar CTAB y actividad hemolítica.

7.3 Resultados y discusión

Durante las diferentes campañas de muestreo que se realizaron en la región del escarpe de Perdido y frente Coatzacoalcos descritas en la figura 33 se obtuvieron un total de 94 muestras que fueron todas inoculadas en medios selectivos de producción de biosurfactantes, adicionalmente durante la segunda campaña oceanográfica que se realizó, las muestras fueron inoculadas en medio selectivo para degradadoras de hidrocarburos, dando un total de 177 cultivos como se describen en la tabla 22.

Tabla 22. Análisis de tensión superficial, índice de emulsión, CTAB y hemólisis para los diferentes consorcios obtenidos en las diferentes campañas.

Zona	Glicerol				Aceite crudo				
	Hemolisis	CTAB	Tensión Superficial	IE ₂₄ (%)	Hemolisis	CTAB	Tensión superficial	IE ₂₄ (%)	
Estuario	3	1	1	1	0	0	0	0	
Perdido	A1	1	0	1	1	2	1	3	3
	A2	1	0	1	1	1	0	1	2
	A3	0	0	0	0	2	1	2	1
	A4	1	1	2	1	0	1	1	1
	B5	0	0	1	0	0	0	2	1
	B6	0	1	2	2	0	0	0	0
	B7	0	0	2	1	1	1	2	2
	B8	0	0	0	0	0	0	0	0
	B9	0	0	0	0	0	0	1	0
Coatzacoalcos	C10	0	0	0	0	0	3	3	
	C11	0	0	0	0	2	2	2	
	C12	1	0	1	1	0	0	0	
	C13	1	0	3	1	2	0	2	
	C14	1	1	2	0	1	1	2	

D15	0	1	2	1	1	0	2	1
D16	0	0	1	0	0	2	3	2
D17	1	1	3	0	1	1	2	2
D18	2	1	2	0	4	4	4	3

Con respecto a los cultivos cultivados en presencia de glicerol, 39.1 % presentó hemólisis, 26.1% dio positivo con CTAB, 47.8% de los cultivos redujo la tensión superficial y 26.1% presentó reducción de IE₂₄. Asimismo, con respecto a los cultivos suplementados con 0,05% de petróleo crudo, el 46.9% mostró hemólisis, el 40.6% dio positivo con CTAB, el 75% redujo la tensión superficial y el 59% mostró aumento del IE%. El 64.4% de las muestras que presentaron actividad BS se encontraron en el área de Coatzacoalcos.

En las figuras 34 y 35 se muestra el comportamiento de las diferentes muestras obtenidas de diferentes regiones y profundidades del Golfo de México para la actividad biosurfactante en términos de reducción de la tensión superficial y el incremento del IE₂₄ mostrando diferentes resultados en términos de distribución. No hubo un patrón o relación entre la reducción de la tensión superficial y el IE₂₄. Los otros parámetros utilizados para el estudio de la actividad biosurfactante, como la actividad hemolítica y el CTAB, tampoco mostraron un patrón específico. Los mejores resultados en términos de reducción de ST fueron las muestras del estuario, A2MO, A3MOH, A4MFG, B7M, C14MO, C14F, C14SH, D16FH y D16SH, mientras que los mejores resultados obtenidos en términos del IE₂₄ se obtuvieron a partir de las muestras estuario, B5FH, B6FG, C13FG y C10FH.

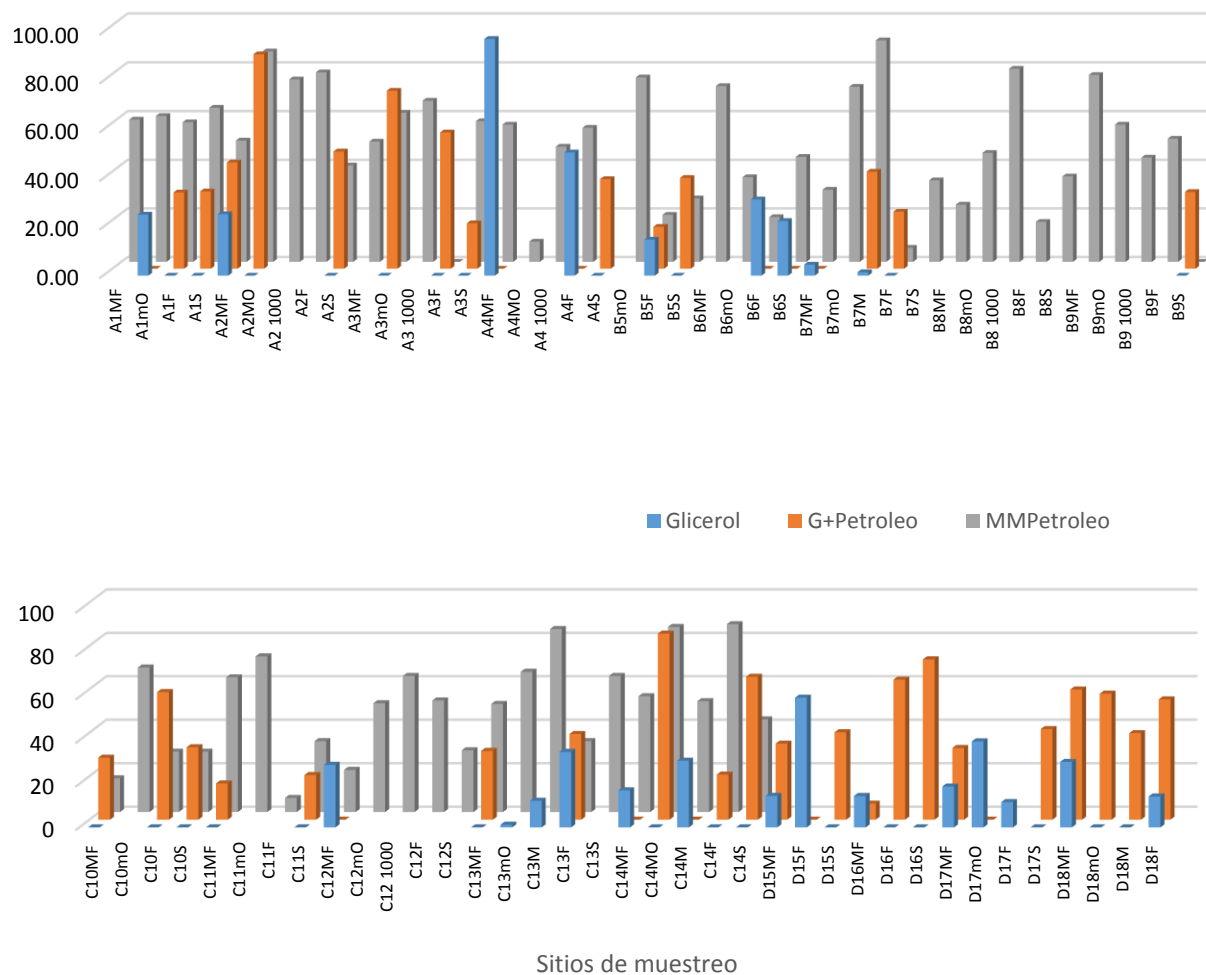


Figura 34. Selección de consorcios con actividad biosurfactante en medios enriquecidos para la disminución de la tensión superficial.

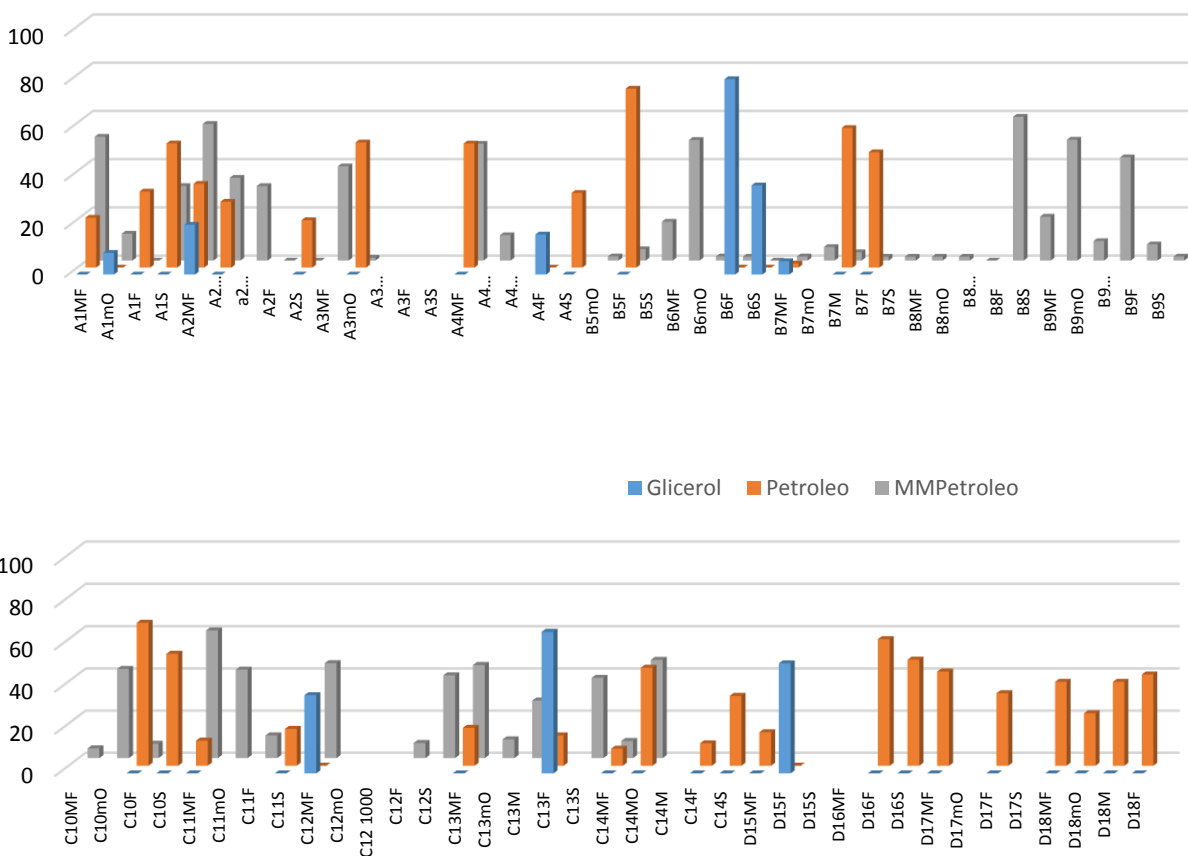


Figura 35. Selección de consorcios con actividad biosurfactante en medios enriquecidos el aumento del porcentaje del índice de emulsión.

El efecto de la profundidad para consorcios productores de Bs mostró que entre 0 y 700 m de profundidad se encontraron los microorganismos que reduce la tensión superficial (figura 36) y entre 400 y 1900 los microorganismos que aumentan el EI_{24} (figura 37), la concentración de NaCl fluctuó entre 36.35 y 34.97 g/L lo que indica que los biosurfactantes producidos presentan estabilidad a concentraciones altas de cloruro de sodio y que tienen un mas alto rango de aplicación.

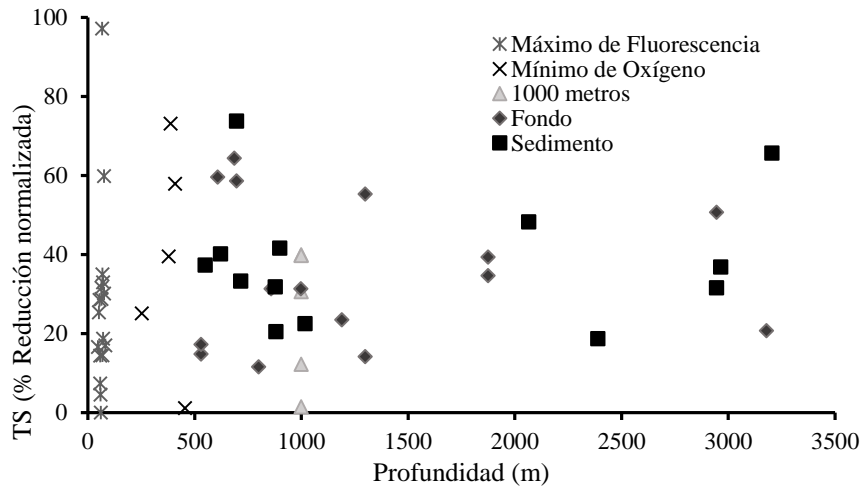


Figura 36. Tensión superficial de cultivos provenientes a diferentes profundidades

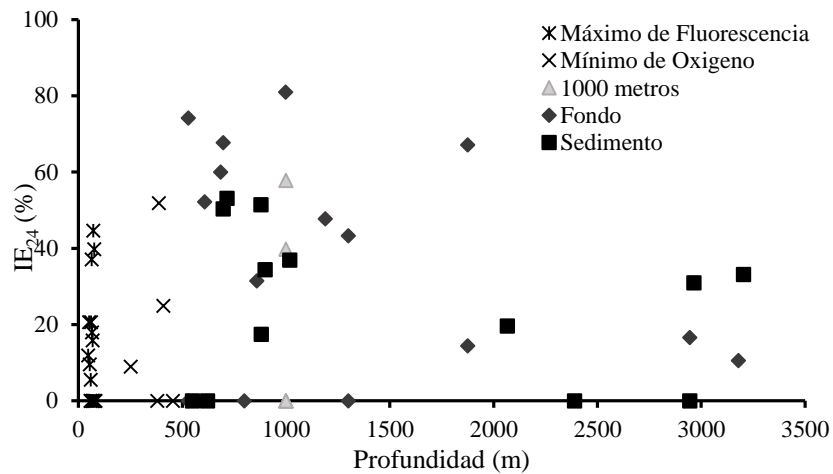


Figura 37. Índice de emulsión de cultivos provenientes a diferentes profundidades

Los consorcios obtenidos de fueron utilizados para el aislamiento de cepas bacterianas de diferentes especies. Primero, los consorcios se seleccionaron y analizaron para determinar la viabilidad de realizar este estudio basado en la producción de BS, luego, las cepas aisladas se analizaron llevando a cabo la producción de BS.

El carbono como sustrato es un factor limitante importante que afecta la producción de surfactantes microbianos. Se ha reportado que el tipo de sustrato de carbono utilizado para la producción influye tanto en la calidad como en la cantidad de BS (Das et al., 2009).

La población de microorganismos marinos se adapta a diferentes condiciones de agua de mar, como profundidad y temperatura (Baharum et al., 2010). Además, el petróleo crudo ha formado parte del ecosistema del medio marino durante millones de años, y las bacterias han estado utilizando sus hidrocarburos constituyentes como una rica fuente de carbono y energía (Hazen et al., 2016). El cultivo con medios enriquecidos utilizados para el crecimiento de consorcios microbianos afectó la selección de bacterias productoras de BS. Además, la presencia de petróleo crudo favoreció la selección de consorcios productores de BS. En la tabla 22, un mayor número de consorcios productores de BS crecieron en presencia de hidrocarburos en comparación con los que crecieron con glicerol como fuente de carbono. La selección de las diferentes muestras obtenidas de diferentes regiones y profundidades del Golfo de México para la actividad de BS (TS y EI24) mostró resultados diferentes en términos de distribución.

No hubo un patrón claro o relación entre la reducción de la TS y el IE₂₄. Este resultado puede explicarse por el hecho de que los BS y BE son metabolitos secundarios con estructuras y actividades químicas muy diferentes. Los otros parámetros utilizados para la detección de actividad de BS, como la actividad hemolítica y CTAB, tampoco mostraron un patrón específico. Por lo tanto, una comunidad microbiana puede adaptar y regular sus funciones dependiendo de la composición de la comunidad y a la presencia de diferentes sustratos (Antoniou et al., 2015). A pesar de lo anterior, existe un "conjunto central" de bacterias que se aíslan comúnmente de los consorcios marinos, ya que son consorcios obligados para la degradación del petróleo y los productores de BS (Yakimov et al., 2007).

En la columna de agua del Golfo de México, el petróleo y el gas son persistentes y afectan a las comunidades microbianas de las profundidades marinas mediante el enriquecimiento de hidrocarburos. La biosfera de aguas profundas, incluidos los sedimentos de aguas profundas, es uno de los ecosistemas marinos más grandes, y se sabe relativamente poco sobre la respuesta de estas comunidades a los hidrocarburos y sus capacidades de biodegradación a estas profundidades (Kimes et al., 2013). Las respuestas de las poblaciones también están influenciadas por los diferentes parámetros fisicoquímicos a través de la columna de agua, como las condiciones de termoclina, haloclina y pignoclina. Los estudios microbianos sugieren que las comunidades realizan importantes funciones ecológicas a diferentes profundidades (Jing et al.,

2013). De acuerdo con las distribuciones, las cepas productoras de BS se aislaron entre la superficie y a 700 m, y las cepas bacterianas productoras de BS se distribuyeron ampliamente, detectándose hasta una profundidad de 1900 m en la columna de agua. En la columna de agua, hay varios fenómenos fisicoquímicos que implican la disolución de gases por encima del 85% y el petróleo crudo cerca del 10% (Board & Council, 2003), por lo tanto, los microorganismos a diferentes profundidades pueden ayudar en los flujos de materia y energía sean encontrado (Lindh et al., 2017).

Aunque los valores de ST y EI24 determinados en este estudio variaron de una cepa a otra, presentando en algunos casos ST y sin emulsión, o viceversa; en general, la distribución ST y EI24 fueron muy similares. Las cepas productoras de BS generalmente se aislaron a 0-1000 m, con menos cepas aisladas a 3000 m, para ambos parámetros (ST y EI24).

Los biosurfactantes están teniendo cada vez más atención por sus propiedades únicas, resultado de sus condiciones de producción, menor toxicidad y mayor biodegradabilidad, en comparación con sus homólogos químicos. A pesar de que este interés está en aumento, aún no puede competir económicamente con los biosurfactantes sintéticos. Para reducir estos costos de producción se propone investigar diferentes mecanismos de para aumentar los rendimientos de producción, como el uso de diferentes materias primas de bajo costo y el mejoramiento de las condiciones de cultivo de los microorganismos (Khopade et al., 2012).

La recuperación biológica mejorada de petróleo tiene varias ventajas únicas en comparación con los métodos convencionales, ya que no consume grandes cantidades de energía, y es menos dependiente de los precios del crudo. Además los procesos microbianos crecen a un ritmo exponencial, lo que significa que potencialmente pueden producirse a bajo costo (Kaster et al., 2012).

7.4 Conclusiones

Los microorganismos productores de biosurfactantes se encuentran asociados a profundidades menores a 1200 m debido a las condiciones nutricionales y fisicoquímicas de columna de agua.

La adición de compuestos hidrofóbicos tales como hidrocarburos en la formulación del medio de cultivo está correlacionada con la actividad biosurfactante/Emulsificante

No existe relación entre la tensión superficial y el índice de emulsión ya que esto se debe a la naturaleza del biosurfactante.

Capítulo 8. Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes

8.1 Microorganismos productores de biotensoactivos

Los biosurfactantes son producidos por una variedad de microorganismos, principalmente bacterias, hongos y levaduras son diversos en su composición química, su naturaleza y la concentración que depende del tipo de microorganismo que produce un biotensoactivo en particular (Tabla 22).

Tabla 22. Lista de biosurfactante y organismo productor (Saharan et al., 2011).

Biosurfactante	Microorganismo(s)	Aplicación
Celobiolípido	<i>Ustilago maydis</i>	Compuestos antifúngicos
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>	Emulsificación de hidrocarburos
Poliolípido	<i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>R. graminis</i>	Actividad anti-proliferativa
Trehalolípido	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Nocardia erythropolis</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> , <i>Mycobacterium sp</i>	Disolución de hidrocarburos
Ornitinelípido	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>Agrobacterium sp.</i>	Bio-emulsificante
Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Leuconostoc mesenteriods</i>	Lipopéptido tensoactivo
Ram nolípido	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas chlororaphis</i> , <i>Serratia rubidea</i>	Bioremediación, propiedades antimicrobianas y de biocontrol
Carbohidrato-lípido	<i>P. fluorescens</i> , <i>Debaryomyces polymorphus</i>	Bio-emulsificante
Proteína PA	<i>P. aeruginosa</i>	Bio-emulsificante
Diglicosil diglicérido	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Bio-remediación
Célula completa	<i>Cyanobacteria</i>	Bio-floculante
Acidos grasos/lípidos neutros	<i>Clavibacter michiganensis subsp. insidiosus</i>	Bio-emulsificante
Soforolípido	<i>Candida bombicola</i> , <i>C. antartica</i> , <i>Torulopsis petrophilum</i> <i>C. botistae</i> , <i>C. apicola</i> , <i>C. riodocensis</i> , <i>C. stellata</i> , <i>C. bogoriensis</i>	Antimicrobiano, antiviral, espermicida
Liposan	<i>C. tropicalis</i>	Bio-emulsan
Lípidos de manosileritritol	<i>C. antartica</i> , <i>Kurtzmanomyces sp.</i> , <i>Pseudozyma siamensis</i>	Compuesto antifúngico
Surfactina/Iturina	<i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i>	Propiedades antimicrobianas
Subtililina	<i>B. subtilis</i>	Propiedades antimicrobianas
Aminoacid-lípido	<i>Bacillus sp.</i>	Propiedades antimicrobianas
Liquenisina	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i>	Mejoramiento de recuperación de petróleo por microorganismos
Peptido-lípido	<i>B. licheniformis</i>	Propiedades antimicrobianas
Fosfolípido	<i>Acinetobacter sp.</i>	Biorremediación
Vesículas y fimbrias	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>P. marginilis</i> , <i>P. Maltophila</i>	Biorremediación

Emulsan	<i>A. calcoaceticus</i>	Mejoramiento de recuperación de petróleo por microorganismos
Alasan	<i>A. radioresistens</i>	Biodegradación de compuestos poliaromáticos

Los trehalolípidos son producidos por diferentes microorganismos tales como, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Corynebacterium*. Sin embargo, los compuestos más estudiados de en esta clase de compuestos son dimicolados de trehalosa producidos por el género *Rhodococcus*. Los soforolípidos, por otro lado se producen principalmente por las levaduras, tales como *Candida bombicola*, *Centrolene petrophilum*, *Candida apícola* y *Rhodotorula bogoriensis*, mientras que los lípidos de manosileritritol son producidos por levaduras *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma antártica* y *Pseudozyma rugolosa*. Los lipopéptidos cíclicos son producidos por varias especies de *Bacillus* como moléculas antibióticas, entre estos, el compuesto más importante producido es la surfactina por *Bacillus subtilis* debido a su alta actividad. Una gran variedad de microorganismos incluyendo algunos *Archaea*, producen compuestos de alto peso molecular, los bioemulsans son los más ampliamente estudiados que se sintetizan por varias especies de *Acinetobacter*. El primer compuesto estudiado fue el emulsan RAG-1, un polisacárido anfifílico producido por *Acinetobacter calcoaceticus*, que es uno de los bioemulsificantes comercialmente disponibles en la actualidad (Suthar et al., 2008). Muchos microorganismos han sido aislados a partir de suelos contaminados, efluentes y de aguas residuales. Por lo tanto, estos tienen una capacidad para crecer sobre sustratos considerados potencialmente tóxicos para otros microorganismos. Por la alta relevancia de los biosurfactantes, se han explorado nuevos nichos de microorganismo productores. En particular el ambiente marino que ha sido contaminado por hidrocarburos.

8.2 Biotensoactivos de origen marino

Debido a la inmensidad de la biosfera marina, la mayor parte de los microorganismos permanece inexplorado. Estos microorganismos marinos han desarrollado un metabolismo y capacidades fisiológicas únicas para prosperar en hábitats extremos produciendo nuevos metabolitos que no están presentes en los microorganismos terrestres. Por lo tanto, este hábitat ofrece una magnífica oportunidad para descubrir nuevos compuestos tales como antibióticos,

enzimas, vitaminas, biosurfactantes, bioemulsificantes y otros compuestos de gran valor comercial (Satpute et al., 2010). Se estima que cerca del <0.1 % de los microorganismos marinos se ha explorado o investigado. Estas investigaciones son obstaculizadas principalmente, debido a la naturaleza de que son difícilmente cultivables en laboratorio.

Una de las principales características que poseen los productos provenientes de microorganismos de origen marino con respecto a los de otra fuente es que las características biológicas y funcionales de los primeros son muy diversas lo que les da la capacidad de producir una amplia gama de estructuras novedosas que pueden tener una gran aplicación en la biotecnología.

Las poblaciones marinas microbianas que se han reportado productoras de biosurfactantes y bioemulsificantes son *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Enterobacter* y algunos hongos del género *Aspergillus* (Bozo-Hurtado et al., 2012; El-Sersy, 2012; Ibacache-Quiroga et al., 2013; Khopade et al., 2012; Kiran et al., 2009; Kiran et al., 2010; Mukherjee et al., 2008; Seghal Kiran et al., 2010; Sivapathasekaran et al., 2009; Sivapathasekaran, Mukherjee, & Sen, 2010; White et al., 2013). Las moléculas tensoactivas que producen estos microorganismos son ubicuos, estos son utilizados para facilitar la solubilización de compuestos hidrofóbicos de su entorno para que puedan ser aprovechados como sustratos, sin embargo, algunos microorganismos producen biosurfactantes y bioemulsificantes sobre sustratos solubles en agua (Gunther et al., 2005), la presencia de estas biomoléculas sobre la superficie celular aumenta la hidrofobicidad y le ayuda a sobrevivir en un entorno hidrófobo. Por otro lado, debido a las diversas propiedades químicas y funcionales de los microorganismos marinos, es difícil obtener estas biomoléculas por un método selección único, haciendo esencial el desarrollo de diferentes metodologías de detección y selección (Satpute et al., 2010).

8.3 Materiales y métodos

8.3.1 Aislamiento de cepas productoras de BS

Se usaron diferentes medios bacterianos para aislar cepas productoras de BS. Los medios utilizados fueron los siguientes: 1- medio de sacarosa mínimo: 7 gL⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 3.8 gL⁻¹ Na₂HPO₄•H₂O, 3.5 gL⁻¹ KH₂PO₄, 0.7 gL⁻¹ MgSO₄•7•H₂O, 0.5 gL⁻¹ extracto de levadura, 10 gL⁻¹ de sacarosa y 15 gL⁻¹ de NaCl; 2- caldo de soya tripticaseína: 17 gL⁻¹ de peptona caseína, 3 gL⁻¹ ,

peptona de soya, 25 gL⁻¹ de NaCl, 2.5 gL⁻¹ de K₂HPO₄, 5 gL⁻¹ de dextrosa, 1.2 gL⁻¹ de extracto de res, 1.2 gL⁻¹ nitrato de sodio; y 3- Medios de agua de mar artificiales con petróleo crudo (Henson et al., 2016). Los medios de sacarosa y soya se complementaron con una solución de 0,5 ml que contenía los siguientes elementos traza: 2,32 gL⁻¹ ZnSO₄·7H₂O, 1,78 gL⁻¹ MnSO₄·4H₂O, 0,56 gL⁻¹ H₃BO₃, 1 gL⁻¹ CuSO₄·5H₂O, 0,39 gL⁻¹ Na₂MoO₄·H₂O; 0,42 gL⁻¹ CoCl₂, 1 gL⁻¹ EDTA, 0,004 gL⁻¹ NiCl₂; y 0,66 gL⁻¹ KI. El aislamiento bacteriano se confirmó mediante tinción de Gram y microscopía óptica.

8.3.2 Identificación de aislados bacterianos mediante secuenciación parcial de ADN 16S que presenten actividad biotensoactiva y bioemulsificante

Los aislados bacterianos se cultivaron en 20 mL de medio de producción de BS óptimo en matraces Erlenmeyer de 50 ml, durante 24 h. El ADN genómico se purificó y preparó con una concentración final de 50 ngμL⁻¹ utilizando el kit de preparación mini Zymoclean Quick g-DNA TM comprado en Zymo Research Corp. El ADN genómico se secuenció usando el servicio de secuenciación Macrogen (Corea) con el primer 27-F y 907-R para la amplificación de las regiones 3 y 4 del gen de ARN 16s. Los resultados se procesaron usando el software Bioedit, y BLAST y el análisis de alineación múltiple se llevó a cabo usando el banco de genes NCBI y CLUSTAL W, respectivamente. Los análisis filogenéticos se llevaron a cabo utilizando el software phylogeny.fr.

8.4 Resultados y discusión

Una vez que se analizaron los cultivos enriquecidos (consorcios) se procedió al estudio de las cepas bacterianas aisladas de los mejores. El análisis filogenético relevó la presencia de 11 géneros que incluyen 48 % Enterobacteriaceae, 2.04 % Pseudomonadaceae, 2.04 % Shewanellaceae, 4.08 % Idiomarinaceae, 16.33 % Pseudoalteromonadaceae, 4.08 % Vibrionaceae, 4.08 % Rodhospirillaceae, 2.04 % Staphylococcaceae, 10.20% Bacillaceae, 4.08 % Micrococcaceae y 2.04 % Microbacteriaceae (Figura 6).



Figura 35. Distribución de familias bacterianas en los consorcios obtenidos.

Los aislados se obtuvieron de los mejores consorcios y se seleccionaron como se describió anteriormente. La reducción de la TS y el incremento del IE₂₄ se analizaron para aislamientos bacterianos obtenidos de los consorcios que presentan una alta reducción de ST y EI₂₄ (Tabla 23). Los mejores resultados para TS se obtuvieron con *Enterobacter* sp. La cepa presenta valores superiores al 58% después de 9 días de incubación, mientras que los mejores resultados para IE₂₄ se obtuvieron con *Thalassospira* sp. con valores superiores al 71%.

Tabla 23. Actividad biosurfactante de aislados de diferentes zonas del Golfo de México.

Aislado	Identidad (%)	TS (% reducción)	Índice de emulsión (%)	Hemolysis	CTAB	Swarming
<i>Idiomarina</i> sp	99	25.43	68.46	-	-	++
<i>Enterobacter</i> sp	98	58.7	47.5	-	-	+
<i>Bacillus</i> sp	97	40.57	30.33	+	-	+
<i>Pseudomonas</i> sp	99	32.13	38.2	-	+	+
<i>Thalassospira</i> sp	95	7.55	71.19	+	-	+

Capacidad de producción de BS de cepas marinas

Las cepas aisladas de los consorcios estudiados no mostraron una producción significativa de BS en comparación con la mezcla de microorganismos presentes. La amplia variedad de tipos de BS, vías biosintéticas y mecanismos reguladores afecta directamente la producción de BS, ya que están influenciados por las respuestas al estrés, la privación de nutrientes o como respuestas de detección de quórum.

Existen numerosas razones potenciales por las que algunos organismos no se han logrado aislar, o por qué algunos organismos se pueden crecer en algunas circunstancias pero no en otras, a pesar de que están presentes en el cultivo inicial. Puede ser por una dependencia de un compuesto no suministrado o una combinación de compuestos, los umbrales de concentración específicos de los compuestos o un requisito especial para la selección. También hay evidencia de que muchos taxones están inactivos y se pueden cultivar después de la liberación estocástica de la latencia. Esto puede evitar el aislamiento de ciertos taxones que siempre son bajos en abundancia, o aquellos que no han alcanzado este umbral en el tiempo asignado (Henson et al., 2016).

Se ha reportado que las cepas aisladas pertenecientes a los diferentes géneros producen metabolitos secundarios de interés. Por ejemplo, *Idiomarina* generalmente se aísla a profundidades superiores a 800 m (Song et al., 2013) y produce lipasas. Las lipasas tienen diversas aplicaciones industriales que van desde el uso en la fabricación de detergentes y papel hasta la producción de lípidos estructurados, biodiesel y BS (Li et al., 2014; Li & Yu, 2014). *Enterobacter* es una cepa productora de BS que presenta actividad bajo condiciones extremas de temperatura y salinidad. Se ha demostrado que las BS producidas por *Enterobacter* tienen efectos sobre la recuperación mejorada de petróleo cambiando las condiciones de humectación en una recuperación favorable (Hajibagheri et al., 2018). *Bacillus* produce uno de los biosurfactantes más efectivos y potentes, surfactina, un tipo de lipopéptido. *Bacillus subtilis*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* pueden sintetizar surfactina. Se ha reportado que algunas cepas de *Bacillus* reducen el ST de 72 a 27 mN m⁻¹ durante la fermentación (Heryani & Putra, 2017a, 2017b). Se sabe que las *Pseudomonas* producen glucolípidos con una fuerte actividad emulsionante, y pueden reducir la tensión superficial del agua a menos de 30 mN m⁻¹. Por lo tanto, estos géneros son candidatos prometedores para la comercialización de productos industriales y en la biorremediación. Finalmente, *Thalassospira* es un género que se creó recientemente en 2002, y actualmente tiene 8 especies con nombre válido que pertenecen a la familia *Rhodospirillaceae*. Hay un reporte de una cepa *Thalassospira* como productora de lipasa (Kai & Yan, 2016), y otra para la biodegradación del petróleo crudo (Rizi et al., 2017). Se sabe que *K* posee potentes enzimas oxidantes, e incluso se ha reportado que ciertas

especies degradan compuestos como los hidrocarburos poliaromáticos (HAP) y los alcoholes polivinílicos (PVA) (Nogi et al., 2014).

De las cepas obtenidas se continuaron los estudios de producción de biosurfactante en fermentador para elucidación de estructuras con *Staphilococcus* sp y de estudios de biodegradación con *Sphingomonas* sp.

8.5 Conclusiones

Se han identificado por 16s a 13 géneros de bacterias.

Los géneros identificados corresponden a productores de biosurfactantes y biodegradadores de hidrocarburos.

La actividad biosurfactante que se encuentra con la presencia de consorcios es diferente cuando se encuentran cepas aislada, lo que indica que existe una sinergia en la producción, o bien, se producen familias de biosurfactantes que mejoran esta actividad.

Capítulo 9. Producción de biosurfactantes

9.1 Producción y optimización

En muchos casos, los organismos producen biosurfactantes a partir de hidrocarburos insolubles en agua u otros sustratos hidrófobos tales como ácidos grasos y aceites vegetales (Ferraz et al., 2002; Haba et al., 2000). De las diferentes especies de bacterias que producen biotensioactivos las más eficientes son *Pseudomonas sp.* (ramnolípidos; glicolípidos); *Rhodococcus sp.* (trehalolípidos; glicolípidos) y *Bacillus subtilis* (surfactina; lipopéptido).

A pesar de las características favorables para el medio ambiente de mayor biodegradabilidad, baja toxicidad, mejores propiedades de formación de espuma en comparación con sus homólogos químicos sintéticos, la comercialización de estos biosurfactantes microbianos no ha tenido gran impacto debido en gran parte a sus costos de producción. En la actualidad los costos de producción de la mayoría de los biosurfactantes no compiten con los surfactantes químicos. Se plantean diferentes estrategias para hacer el proceso más rentable donde se incluye: 1) desarrollo de los bioprocesos más eficientes, incluyendo la optimización de las condiciones de fermentación y los procesos de purificación, 2) uso de sustratos baratos y de desecho (Raza et al., 2009; Thavasi et al., 2007, 2008), 3) desarrollo de cepas superproductoras (figura 35).

Las propiedades antimicrobianas han añadido un mayor interés en la elaboración de mayores ensayos de producción. Sin embargo, las investigaciones relacionadas a la producción a gran escala se limita principalmente a los microorganismos *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Candida* (Mukherjee et al., 2006).

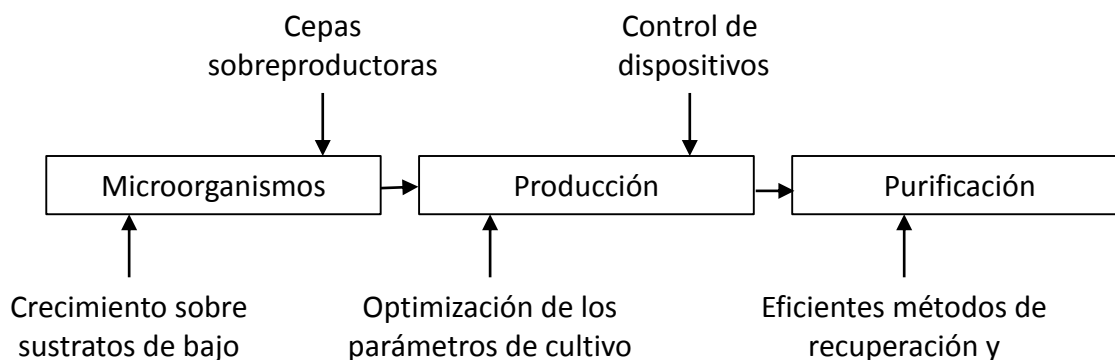


Figura 35. Diferentes estrategias de reducción de costos de producción de biosurfactantes.

Se han utilizado subproductos industriales en la producción de biosurfactantes como aceite de cacahuate, residuos de refinería y licor de maíz como sustratos en la producción de glicolípidos por *Candida esférica*, jugo de manzana para la *Pseudomona aeruginosa*. Otros sustratos como barras de jabón, aceite de frituras y aceite de motor se han utilizado pero con limitaciones debido a la necesidad de un procesamiento de purificación más costoso. El glicerol que viene como subproducto del proceso del biodiesel se ha estudiado como materia prima para la elaboración de biosurfactantes (Zheng et al., 2008).

Los diseños experimentales tienen gran aplicación para la optimización de la producción de tensoactivos. Metodologías de superficie de respuesta se han reportado para las cepas de *Rhodococcus spp.* creciendo en hexadecano, *Gordonia sp.* en la producción de glicolípidos, *Bacillus circulans* optimizando las condiciones de cultivo (Franzetti et al., 2009; Mutalik et al., 2008; Pal et al., 2009; Sivapathasekaran, Mukherjee, Ray, et al., 2010), también pueden existir un aumento significativo en el rendimiento desarrollando nuevos dispositivos de control, como el control de oxígeno (Kronemberger Fde et al., 2008).

El proceso de purificación representa la mayor parte del mayor costo total de un producto biotecnológico. Las técnicas de aislamiento más comunes para biosurfactantes utilizan la precipitación, extracción con disolventes y purificación cromatográfica. Los biosurfactantes de bajo peso molecular implican una etapa de purificación opcional y el uso de diferentes solventes orgánicos de acuerdo a la hidrofobicidad y al BHL de los compuestos. Los ramnolípidos generalmente se precipitan por acidificación y se extraen utilizando acetato de etilo, los

soforolípidos se extraen normalmente con *n*-hexano, mientras que para los trehalolípidos se utiliza una mezcla cloroformo-metanol. El metanol también se utiliza como disolvente para la extracción de lipopéptidos después de una precipitación por acidificación. Los biosurfactantes de alto peso molecular generalmente se extraen del caldo de cultivo por precipitación con sulfato de amonio y purificación por diálisis (Smyth et al., 2010). El costo de estos tratamientos impide el escalamiento a nivel industrial. Por estas razones las investigaciones se dirigen hacia el desarrollo de la extracción a bajo costo.

Con respecto al desarrollo de cepas productoras, la manipulación genética sigue siendo limitada, la mayoría de los estudios se dirige a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* debido en parte a su potencial y al conocimiento más detallado de su genoma. La mutagénesis aleatoria se ha empleado usando rayos gamma o N-metil-N'-nitrosoguanidina se ha reportado que aumenta la producción de ramnolípidos en comparación de cepas silvestres (Mukherjee et al., 2006).

9.3 Preparación de inóculos y condiciones de cultivo

El inóculo se prepara en matraces de 100 mL conteniendo inicialmente 10^6 UFC mL⁻¹ y se cultiva en agitación orbital (150 rpm) a 28° C por 4 días. El medio de cultivo contiene 2 % de glicerol, 0.5 % de peptona, y 3% de extracto de levadura preparado en agua de mar artificial (Khopade et al., 2012).

9.4 Producción de biosurfactante

La producción del biosurfactante se llevará a cabo en un fermentador de 10 L con el medio de cultivo seleccionado con un volumen de trabajo de 5 L. A pH 7, temperatura de 30°C y agitación constante de 200 rpm durante 96 horas. Posteriormente, los cultivos celulares se centrifugarán para la separación de la biomasa y el sobrenadante.

El caldo de cultivo es centrifugado (10000 rpm, 20 min, 4 °C) para remover células y poder ser utilizado en las recuperación mejorada de petróleo. De igual forma al sobrenadante libre de células se le determinará la tensión superficial y el índice de emulsión.

Esta cepa MC1DM fue crecida en el medio mineral MM1 y con sacarosa como fuente de carbono. Los resultados del crecimiento y de la disminución de la Tensión superficial se presentan en la figura 36.

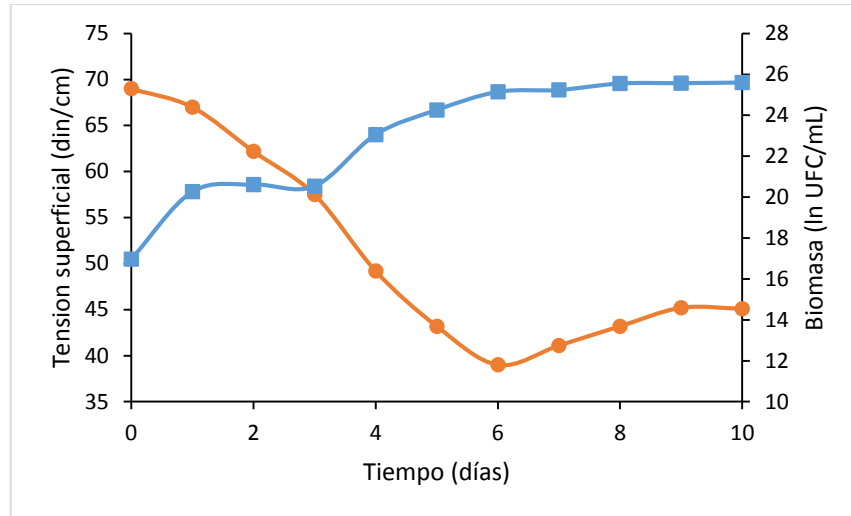


Figura 36. Cinética de crecimiento y disminución de la tensión superficial para la cepa aislada del consorcio obtenido de la estación 1 – Máximo clorofila. MC1DM. En fermentador de 2 L.

Se puede observar que a diferencia de los experimentos en matraces, se ve una disminución de la tensión superficial desde los primeros días de incubación hasta llegar a un valor mínimo de 39 mN/m a los 6 días de incubación. Con respecto al crecimiento se observa una etapa de adaptación hasta el tercer día, posteriormente la biomasa se incrementa hasta alcanzar la fase estacionaria a partir del sexto día, que corresponde con el menor valor de la TS.

Capítulo 10. Biodegradación de hidrocarburos

Biodegradación de Hidrocarburos por consorcios que presentan actividad biosurfactante aislados de la columna de agua y sedimentos durante las campañas de Metagenómica (2016 y 2017)

Los consorcios que fueron seleccionados por presentar actividad biosurfactante fueron capaces de degradar petróleo crudo como única fuente de carbono (0.1 %; BACAF) a 4 °C en periodo de 24 y 36 meses.

Los resultados de la actividad biosurfactante (r_{TS} y IE_{24h}) y porcentaje de biodegradación de 15 consorcios se presentan en las tablas 1 (Campaña Met-02-Abril-2017) y Tabla 2 (Campaña MMF-01-abril-2016). Asimismo, se presentan en las figuras 1-15, de los perfiles de degradación de petróleo crudo para los 15 consorcios, 6 consorcios (Campaña Met-02-Abril-2017) y 9 consorcios (Campaña MMF-01-abril-2016), con sus respectivos controles abióticos.

Tabla 1. Resultados obtenidos de la actividad biosurfactante y biodegradación de HTP de los consorcios aislados a diferentes profundidades de la columna de agua y sedimento de las zonas del Cinturón Plegado de Perdido y de Coatzacoalcos en el Golfo de México.

Consortio	% Reducción de la Tensión Superficial normalizada	% Emulsión (IE_{24h})	% Biodegradación * HTPs (Area-CG-IF)
A2MF	43.4	62.6	35.62
A2MO	88.1	27.32	36.07
A4MF	43.75	51.44	15.71
C12MF	21.8	45.03	24.09
C14F	85.6	ND	18.45
C14MO	86.9	46.61	40.66

*(Petróleo Bacaf (0.1 %) +MM después de 24 meses a 4 °C). Campaña Oceanográfica Met-02 (Abril 2017). MF: Max Fluorescencia; MO: Min Oxígeno; F: Fondo y Sed: Sedimento. Zonas de muestreo del Cinturón Plegado de Perdido: A y B. Zonas de muestreo de Coatzacoalcos: C y D. MM: Medio Marino; ND: No Determinada.

En las condiciones mencionadas anteriormente, se observa que los consorcios obtenidos de la Campaña 2017, fueron capaces de degradar el crudo desde 15 a 40 %, en todos los cultivos se observó actividad biosurfactante/emulsificante. Aunque no se observó una correlación en todos los casos. El mayor porcentaje de biodegradación fue observado cuando el porcentaje de reducción de la tensión superficial e índice de emulsión fueron mayores. Los perfiles obtenidos indican que la fracción más degradada fue la fracción alifática en 24 meses (figura 7-15). Para demostrar la biodegradación de ésta fracción será necesario realizar el fraccionamiento del hidrocarburo remanente.

Campaña Oceanográfica Met-02 (Abril 2017)

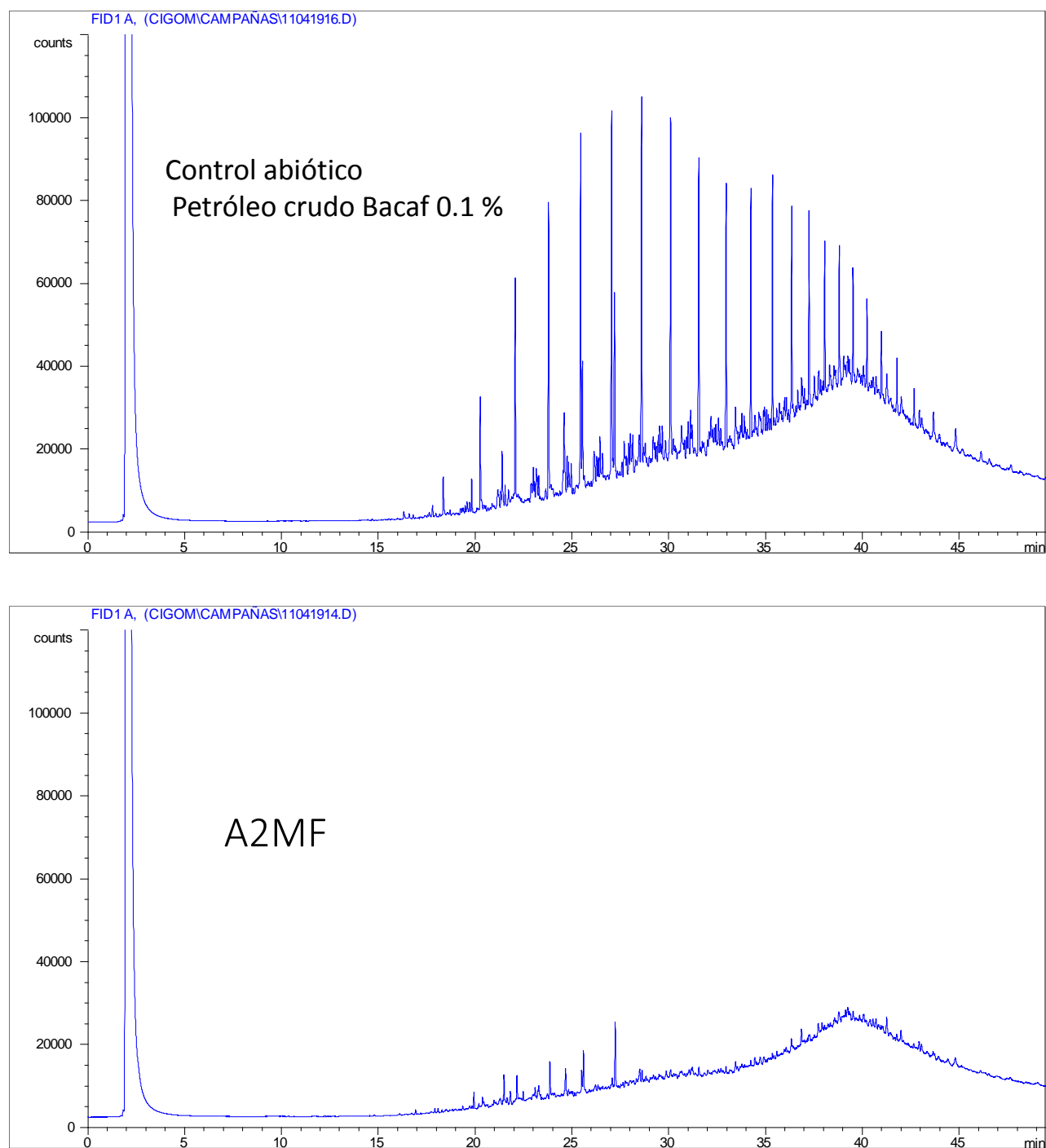


Figura 1. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de HTP después de 24 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio A2MF (Max Fluorescencia) obtenido de la zona del Cinturón Plegado de Perdido, Golfo de México. Petróleo crudo Bacaf 0.1 %, incubación a 4°C.

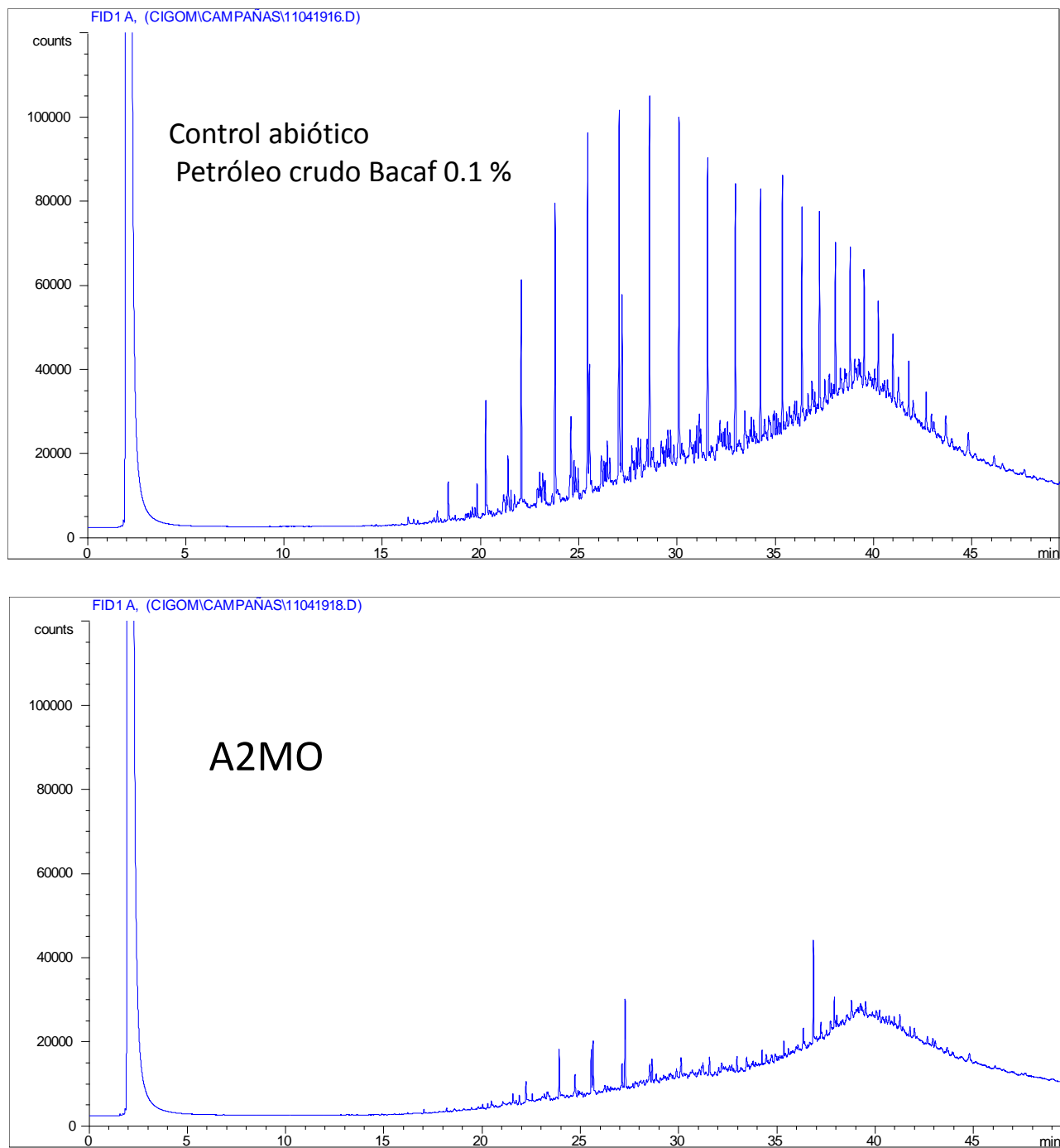


Figura 2. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de HTP después de 24 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio A2MO (Min Oxígeno) obtenido de la zona del Cinturón Plegado de Perdido, Golfo de México. Petróleo crudo Bacaf 0.1 %, incubación a 4°C.

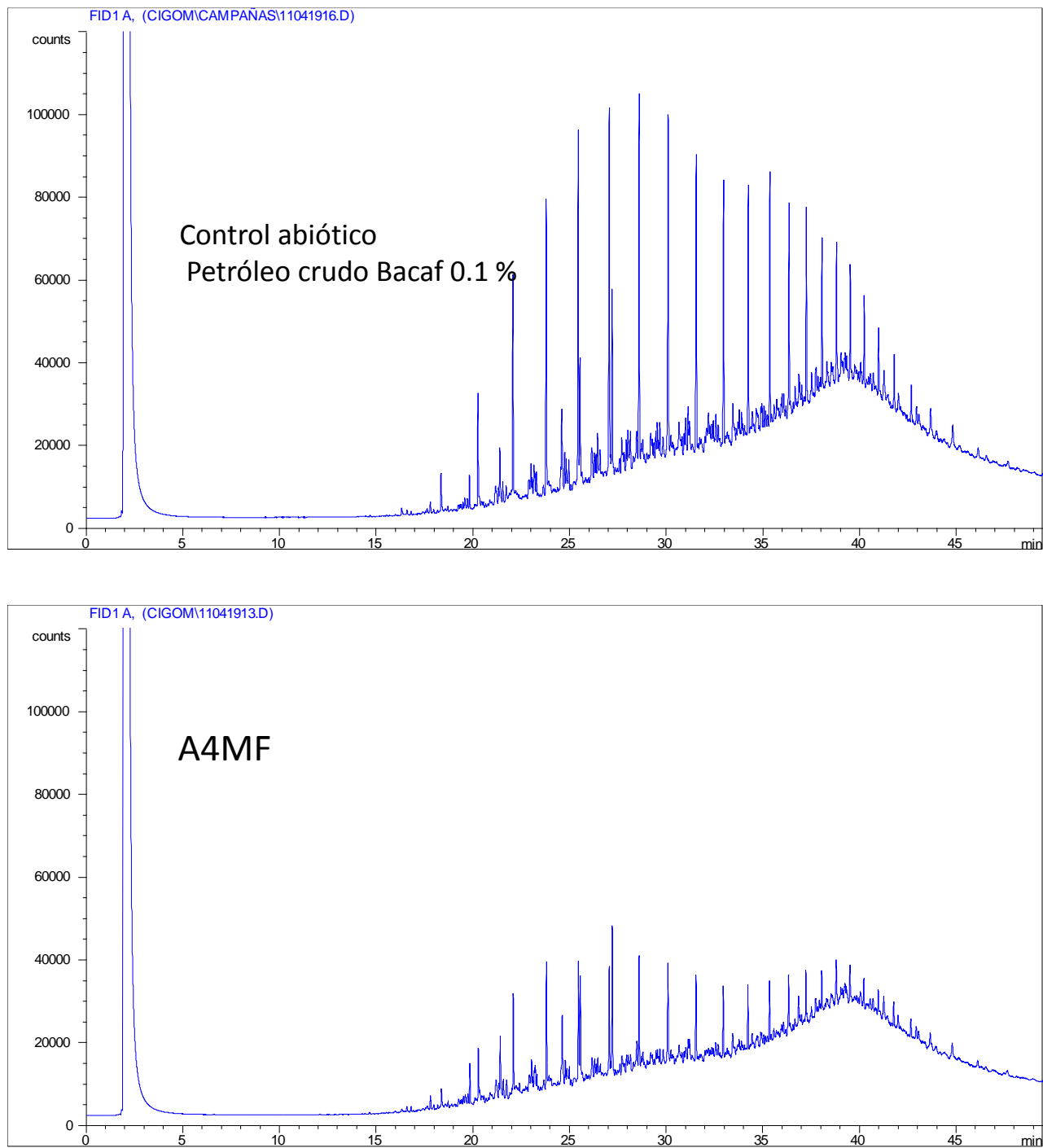


Figura 3. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de HTP después de 24 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio A4MF (Max Fluorescencia) obtenido de la zona del Cinturón Plegado de Perdido, Golfo de México. Petróleo crudo Bacaf 0.1 %, incubación a 4°C.

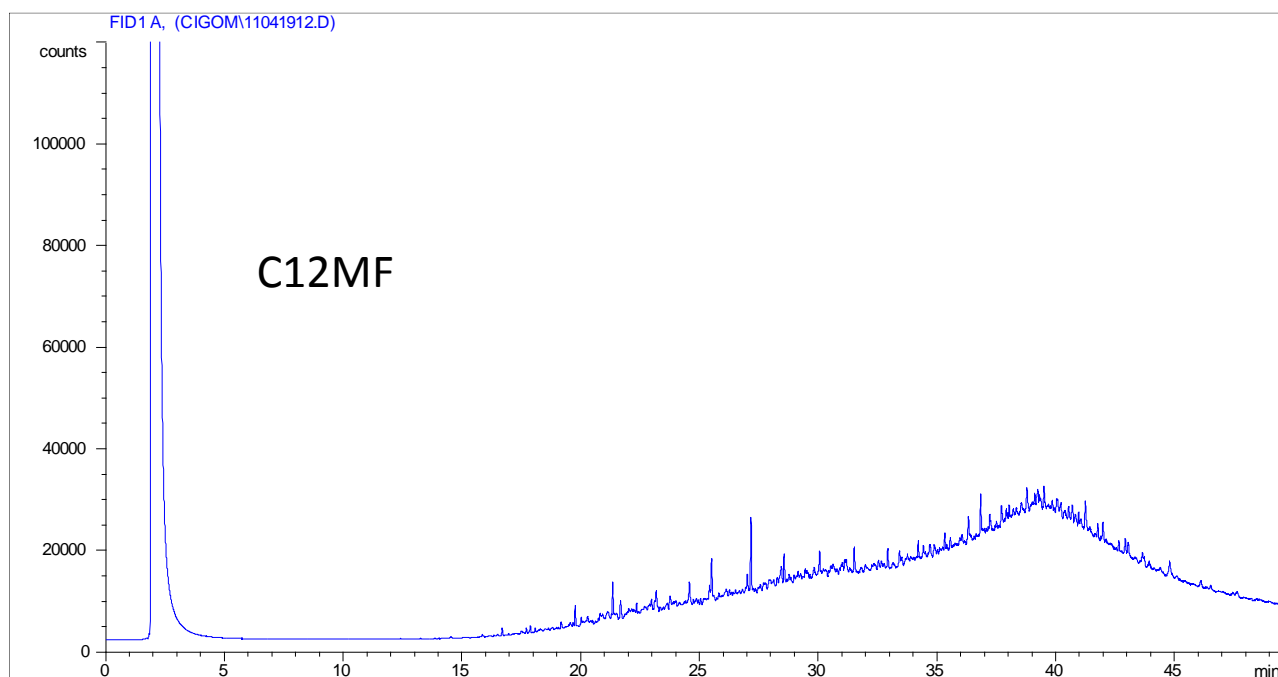
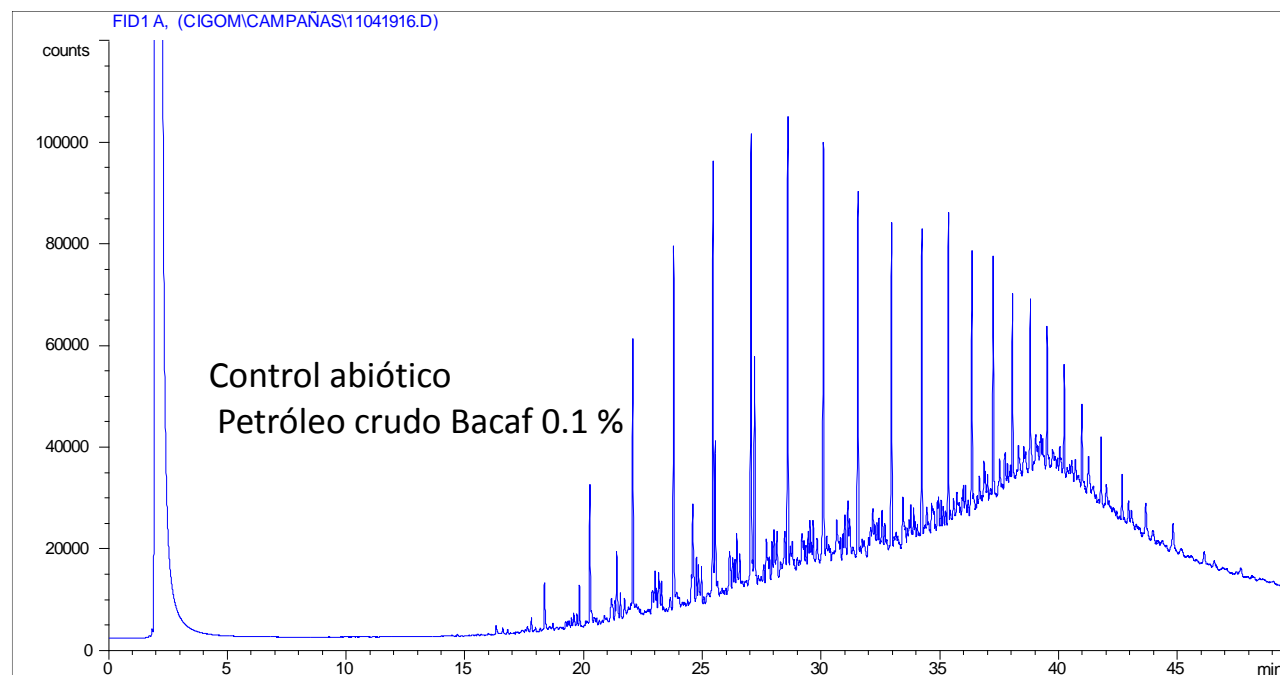


Figura 4. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de HTP después de 12 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio C12MF (Max Fluorescencia) obtenido la zona de Coatzacoalcos, Golfo de México. Petrónimo crudo Bacaf 0.1 %, incubación a 4°C.

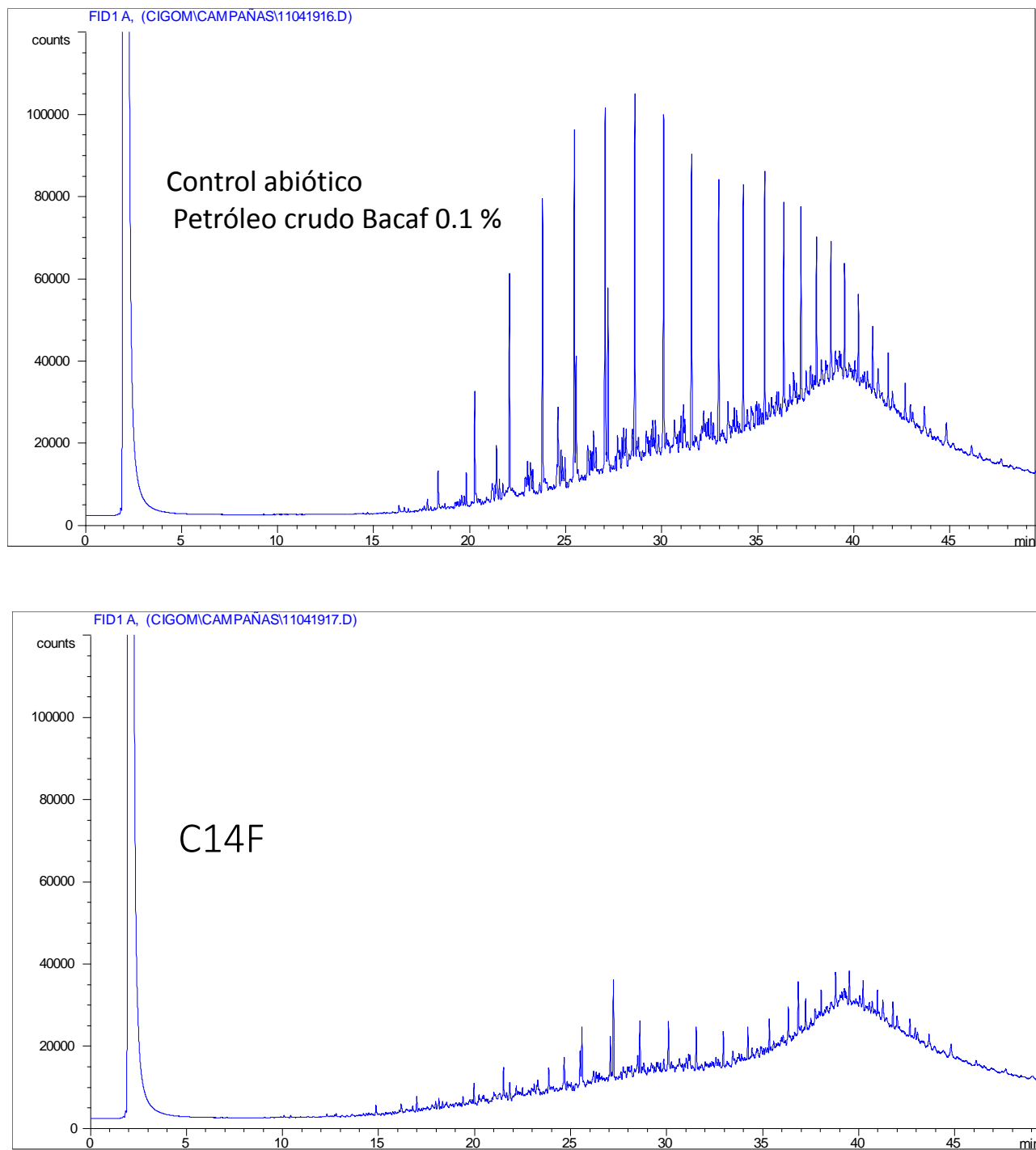


Figura 5. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de HTP después de 24 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio C14F (Fondo) obtenido de la zona de Coatzacoalcos, Golfo de México. Petróleo crudo Bacaf 0.1 %, incubación a 4°C.

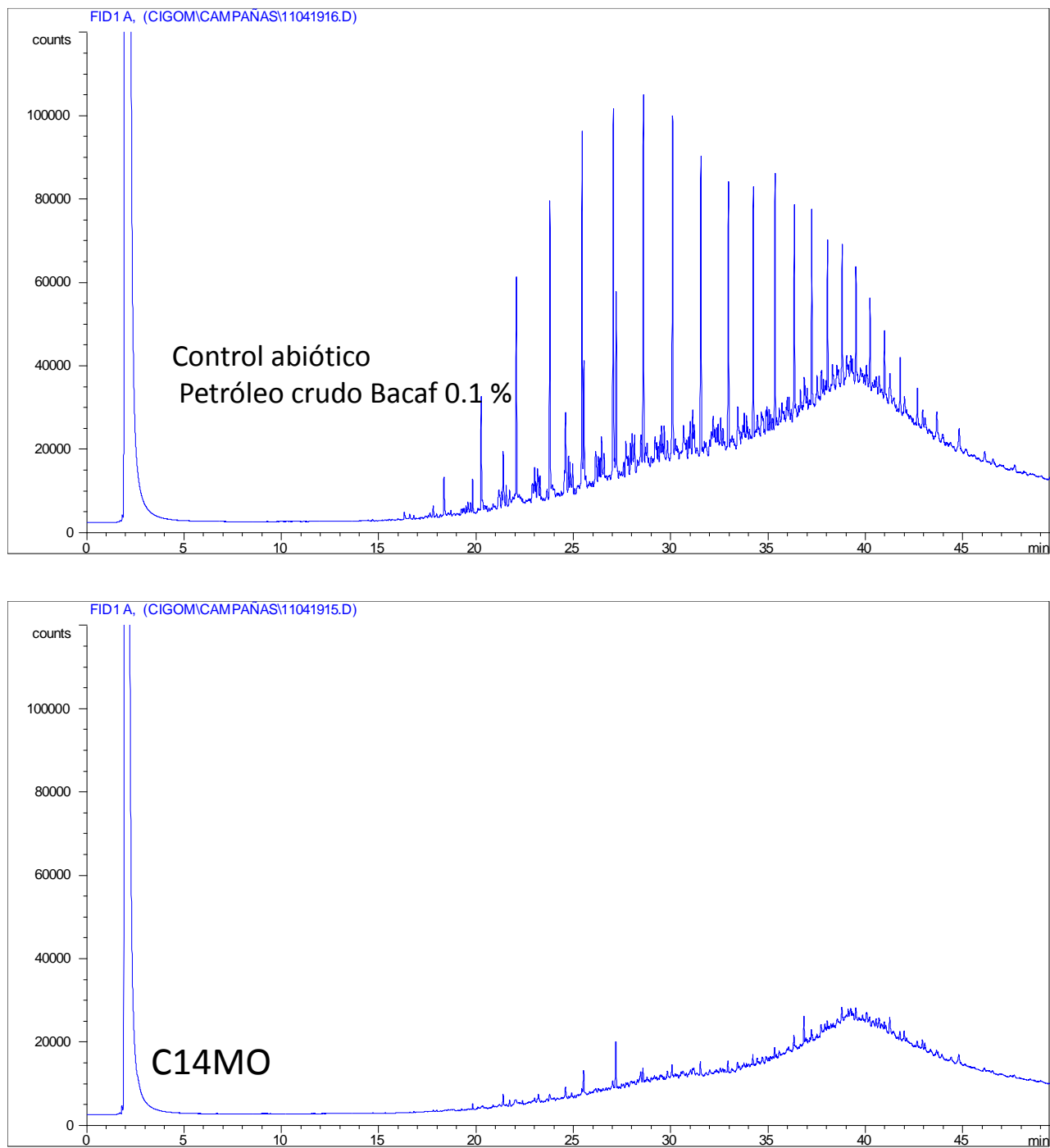


Figura 6. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de HTP después de 24 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio C14MO (Min Oxígeno) obtenido de la zona de Coatzacoalcos, Golfo de México. Petróleo crudo Bacaf 0.1 %, incubación a 4°C.

Campaña Oceanográfica MMF-01 (Abril 2016)

Tabla 2. Resultados obtenidos de la actividad biosurfactante y biodegradación de HTP de los consorcios aislados a diferentes profundidades de la columna de agua y sedimento de las zonas del Cinturón Plegado de Perdido y de Coatzacoalcos en el Golfo de México.

Consortio	% Reducción de la Tensión Superficial normalizada	% Emulsión (IE _{12h})	% Biodegradación * HTPs (Area-CG-IF)
A3MO	59.32	31.4	76.73
A3F	18.71	ND	73.12
A4MF	60.02	44.1	76.60
B6F	26.72	56.60	74.70
B7MF	4.54	ND	77.90
B7F	14.0	47.81	66.22
C14MF	17.05	ND	81.61
C14Sed	64.03	33.15	76.28
D16Sed	52.35	50.37	69.85

*(Petróleo Bacaf (0.1 %)+ MM después de 36 meses a 4 °C. MF: Max Fluorescencia; MO: Min Oxígeno; F: Fondo y Sed: Sedimento. Zonas de muestreo del Cinturón Plegado de Perdido: A y B. Zonas de muestreo de Coatzacoalcos: C y D. MM: Medio Marino; ND: No Determinada

Para el caso de los consorcios obtenidos en la Campaña 2016. En las mismas condiciones mencionadas anteriormente, se observa que los consorcios fueron capaces de degradar el crudo desde 66 a 81 %, en todos los cultivos se observó actividad biosurfactante/emulsificante. Aunque no se observó una correlación en todos los casos. El mayor porcentaje de biodegradación fue observado cuando el porcentaje de reducción de la tensión superficial y índice de emulsión fueron mayores. Los perfiles obtenidos indican que las fracciones alifática y aromática fueron degradadas en un periodo de 36 meses (figura 7-15). Para demostrar la biodegradación de ambas fracciones será necesario realizar el fraccionamiento del hidrocarburo remanente.

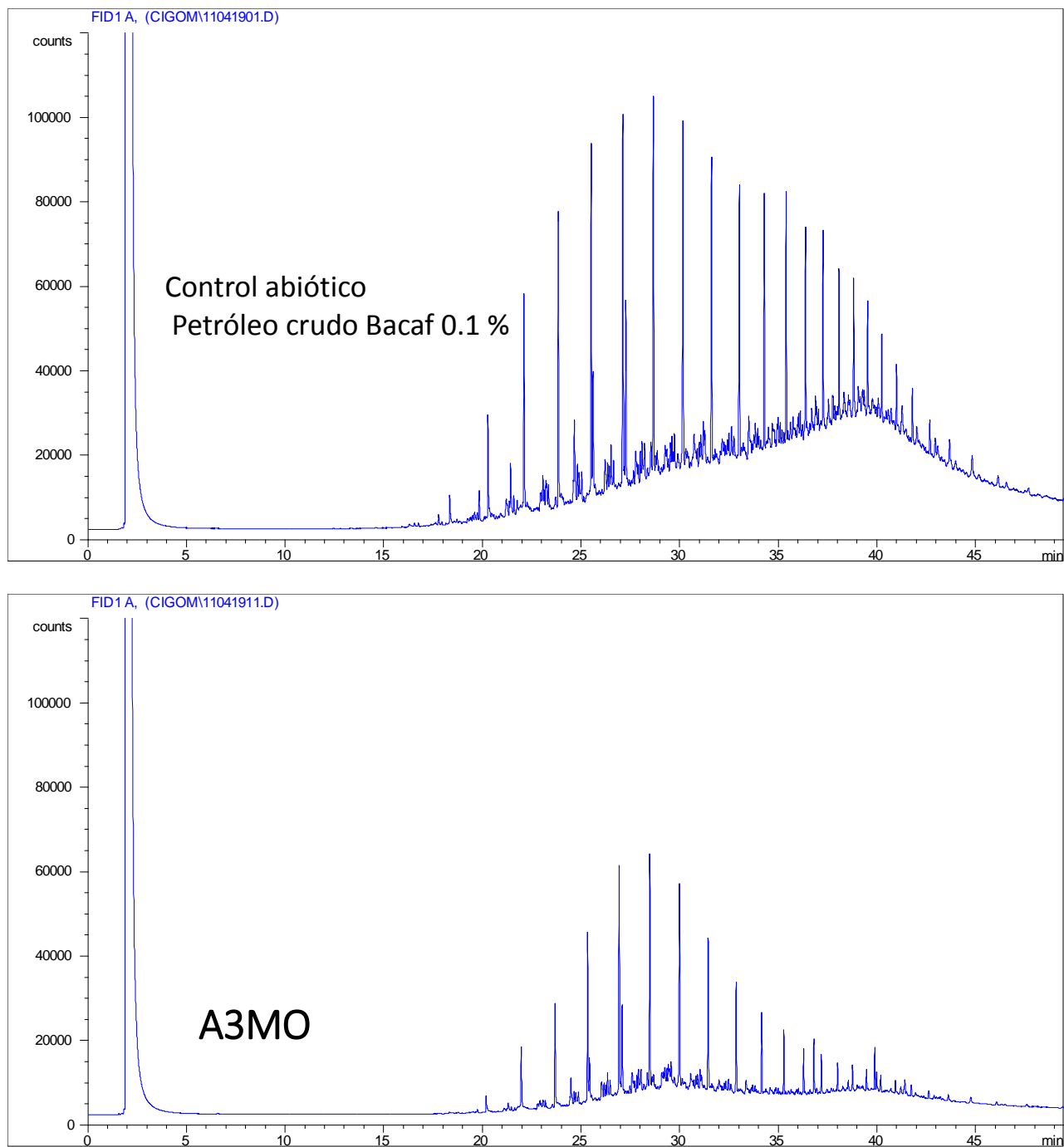


Figura 7. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de HTP después de 36 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio A3MO (Mínimo de Oxígeno) obtenido de la zona del Cinturón Plegado de Perdido, Golfo de México. Petróleo crudo Bacaf 0.1 %, incubación a 4°C.

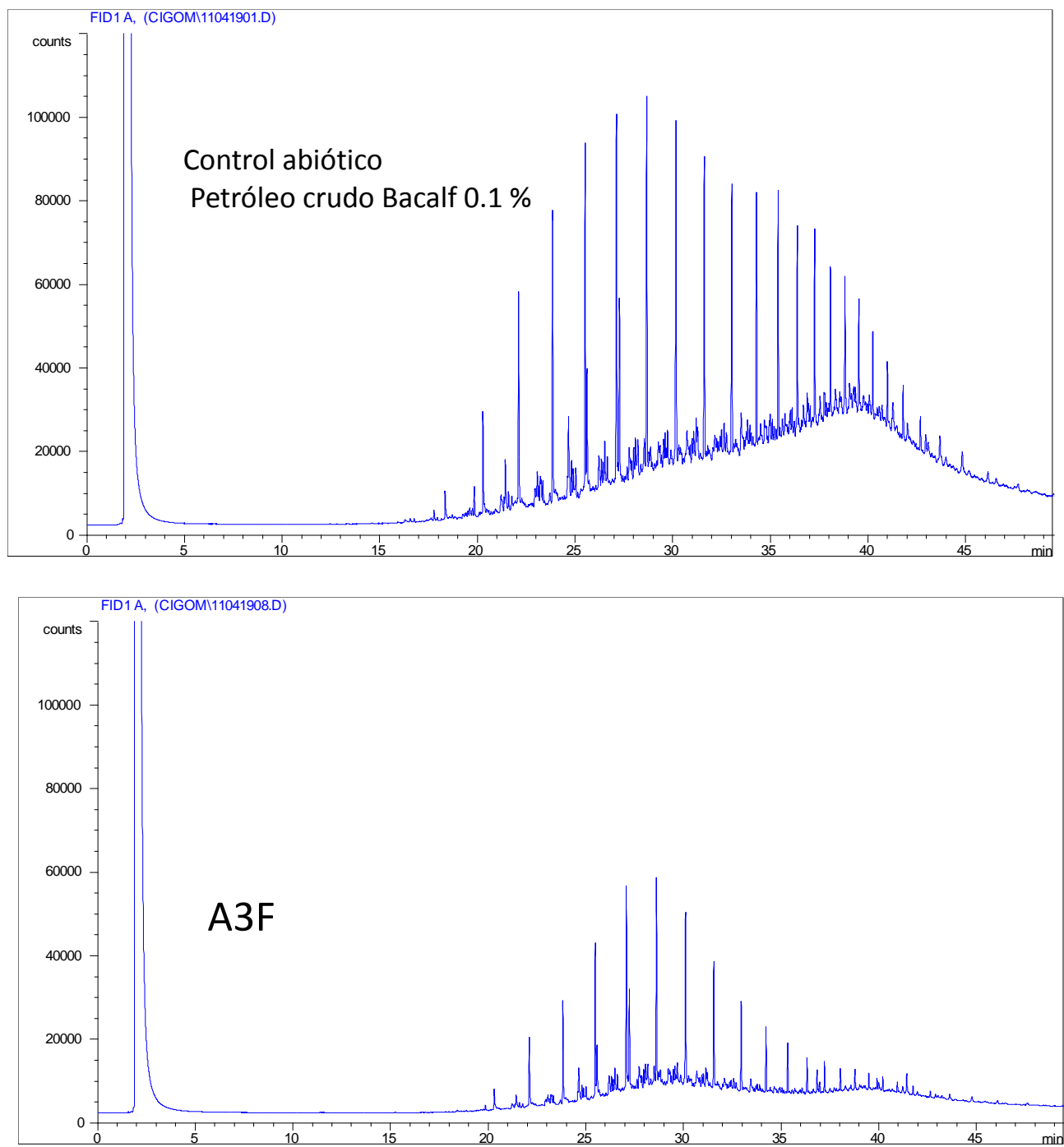


Figura 8. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de HTP después de 36 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio A3F (Fondo) obtenido de la zona del Cinturón Plegado de Perdido, Golfo de México. Petróleo crudo Bacalf 0.1 %, incubación a 4°C.

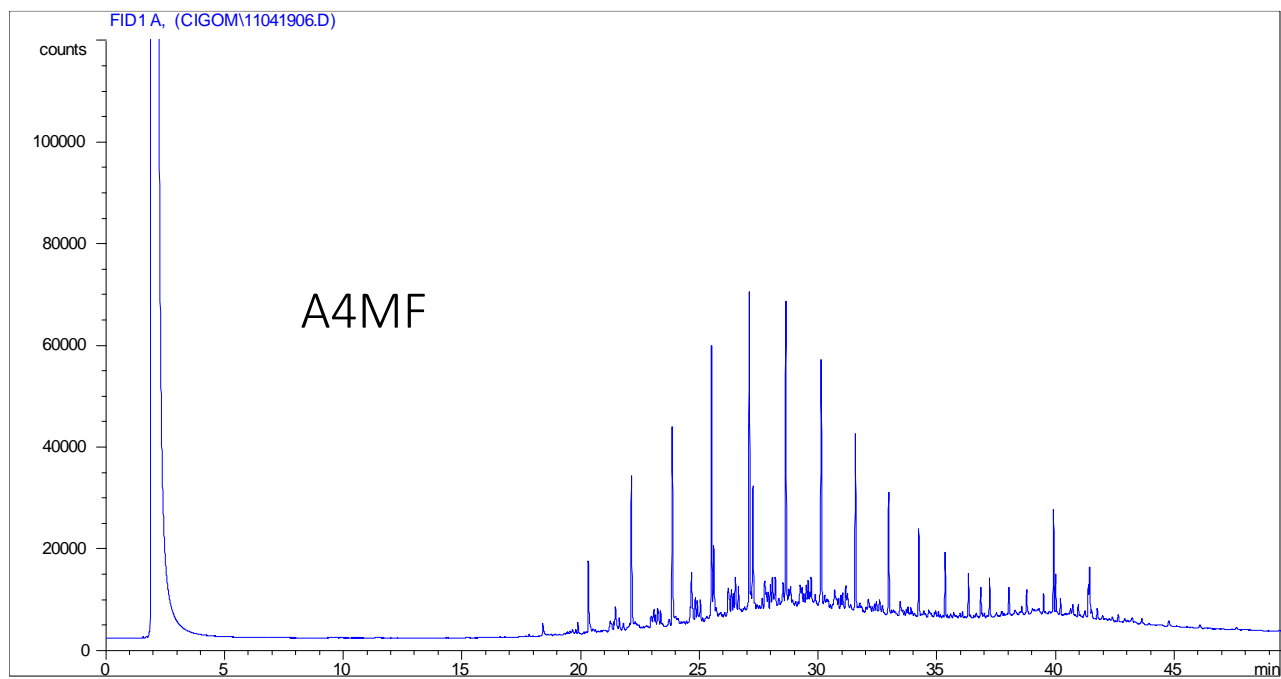
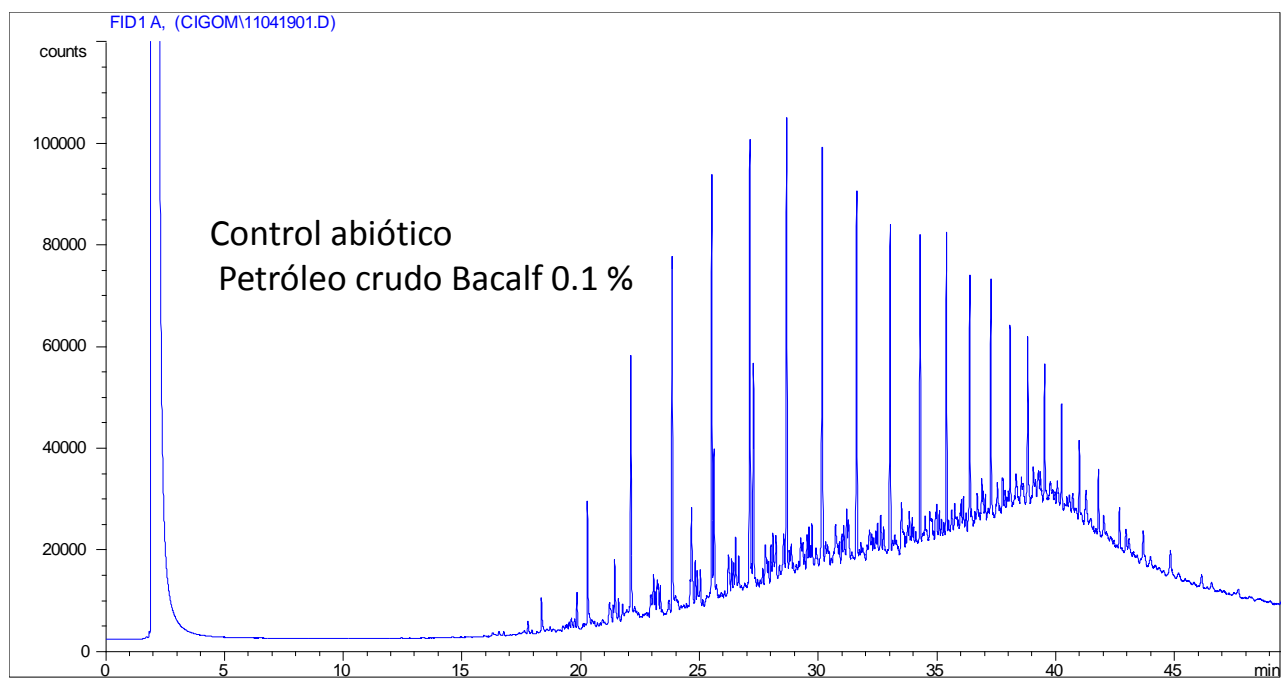


Figura 9. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de HTP después de 36 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio A4MF (Max Fluorescencia) obtenido de la zona del Cinturón Plegado de Perdido, Golfo de México. Petróleo crudo Bacalf 0.1 %, incubación a 4°C

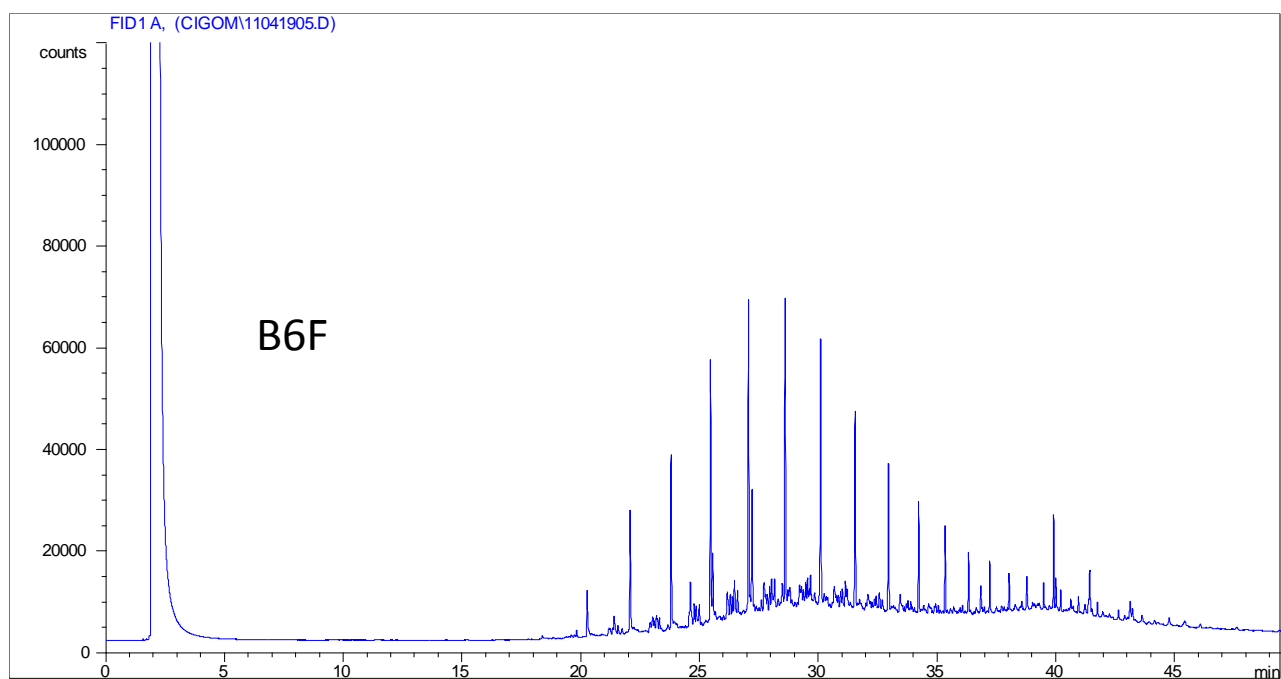
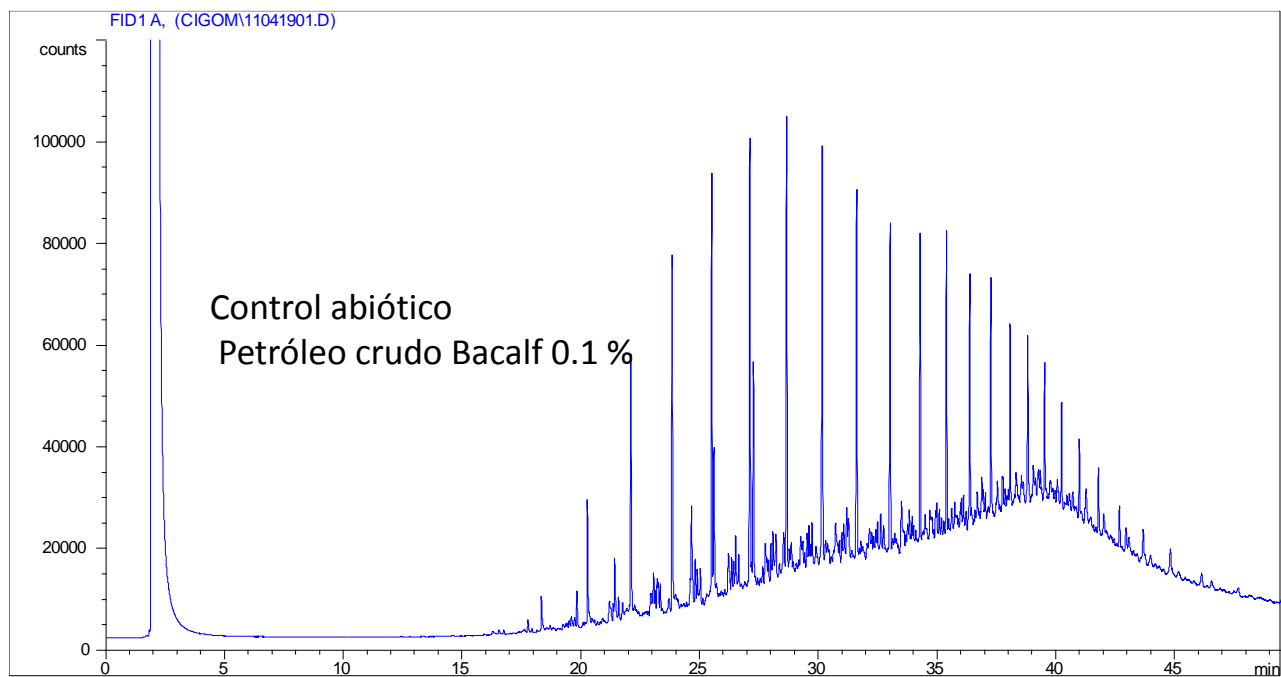


Figura 10. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de HTP después de 36 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio B6F (Fondo) obtenido de la zona del Cinturón Plegado de Perdido, Golfo de México. Petróleo crudo Bacalf 0.1 %, incubación a 4°C.

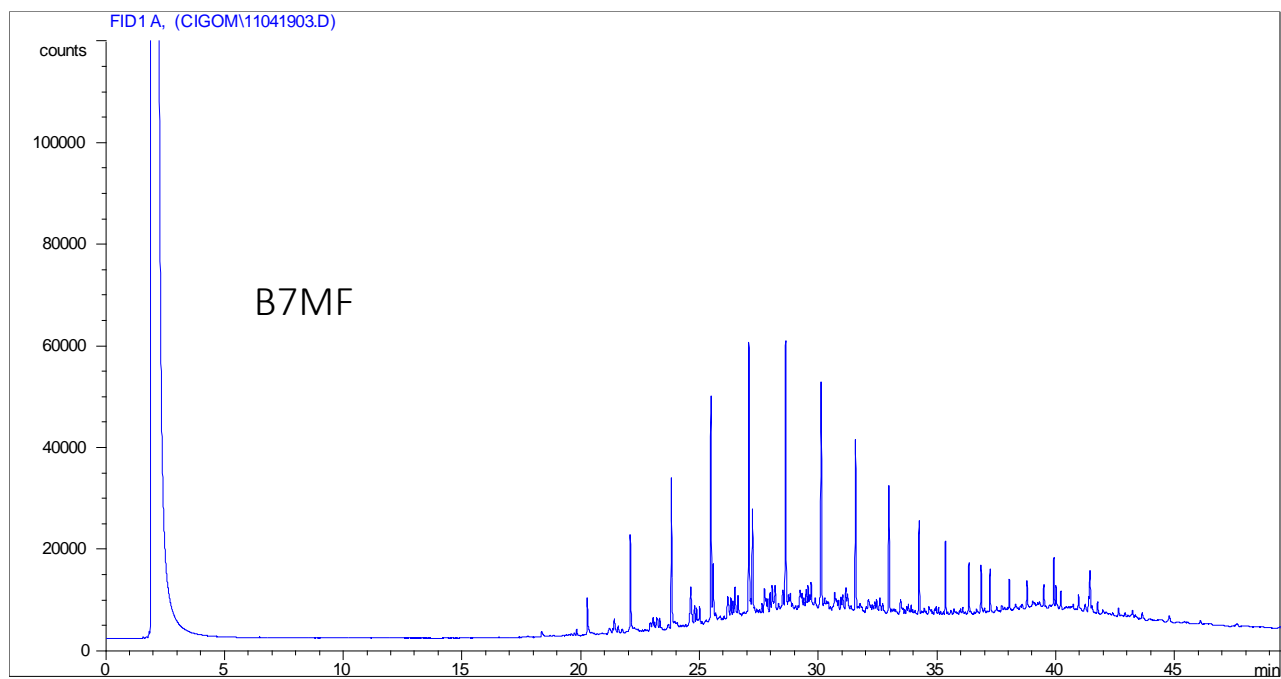
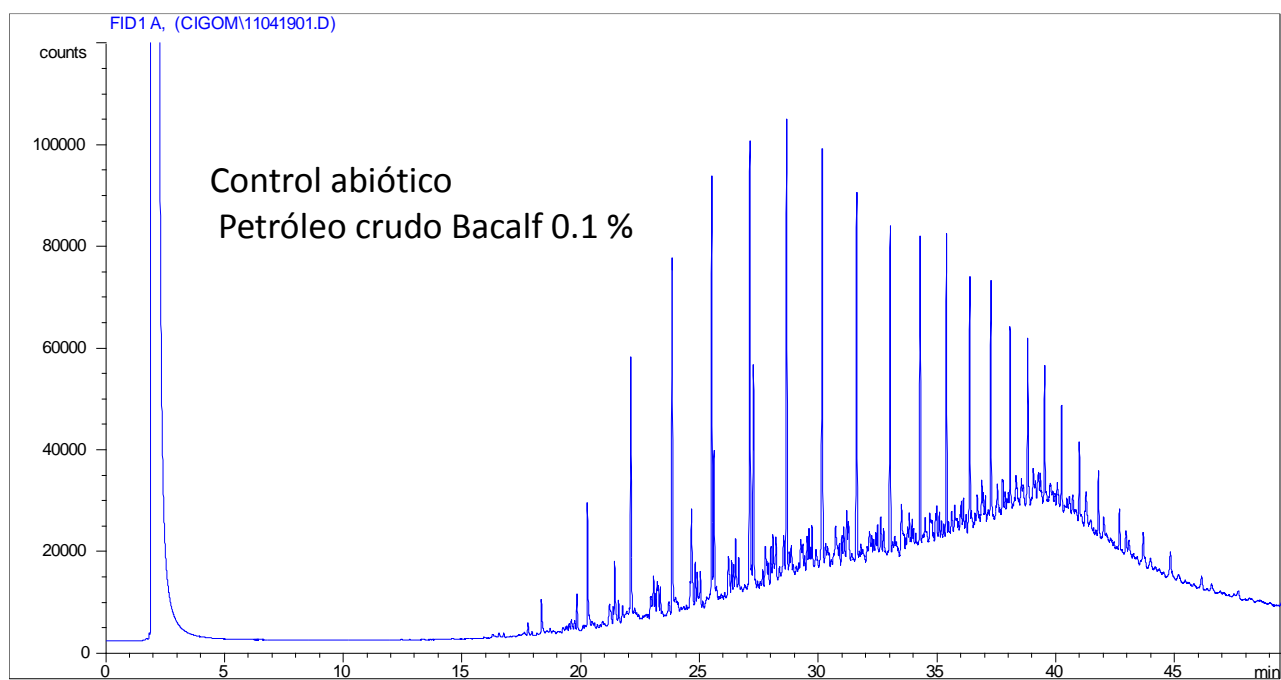


Figura 11. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de HTP después de 36 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio B7MF (Max Fluorescencia) obtenidos de la zona del Cinturón Plegado de Perdido, Golfo de México. Petróleo crudo Bacalf 0.1 %, incubación a 4°C.

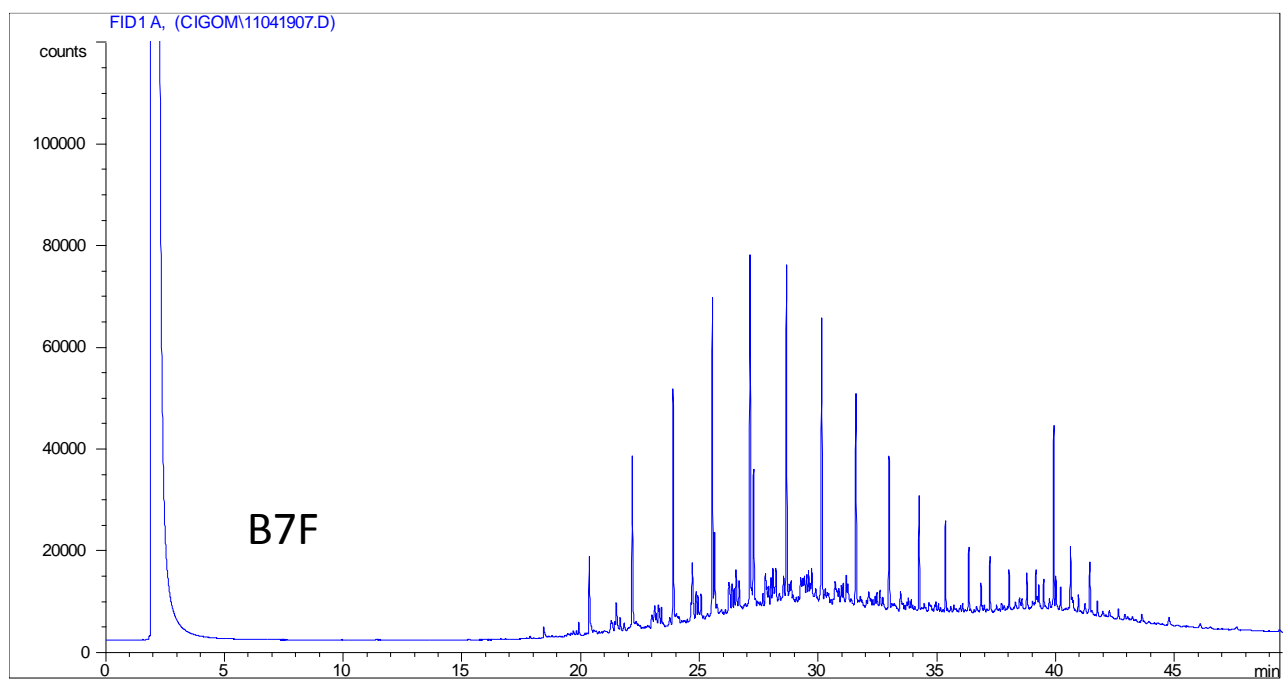
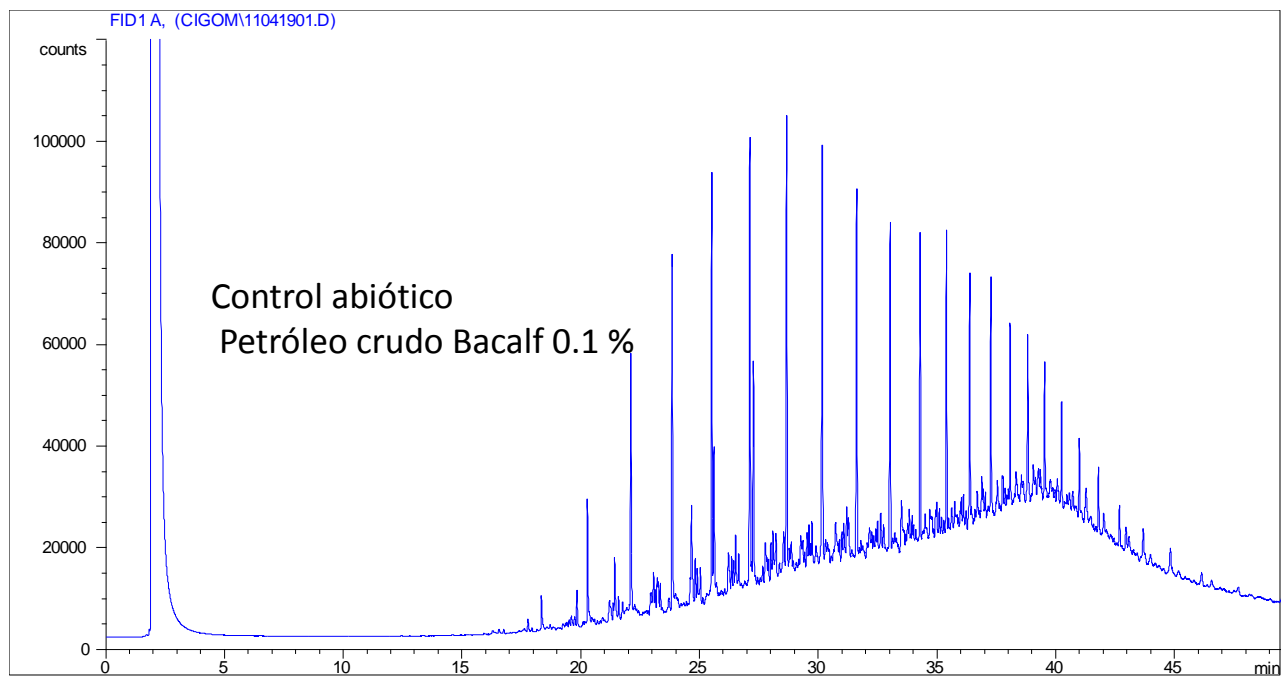


Figura 12. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de HTP después de 36 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio B7F (Fondo) obtenidos de la zona del Cinturón Plegado de Perdido, Golfo de México. Petróleo crudo Bacalf 0.1 %, incubación a 4°C.

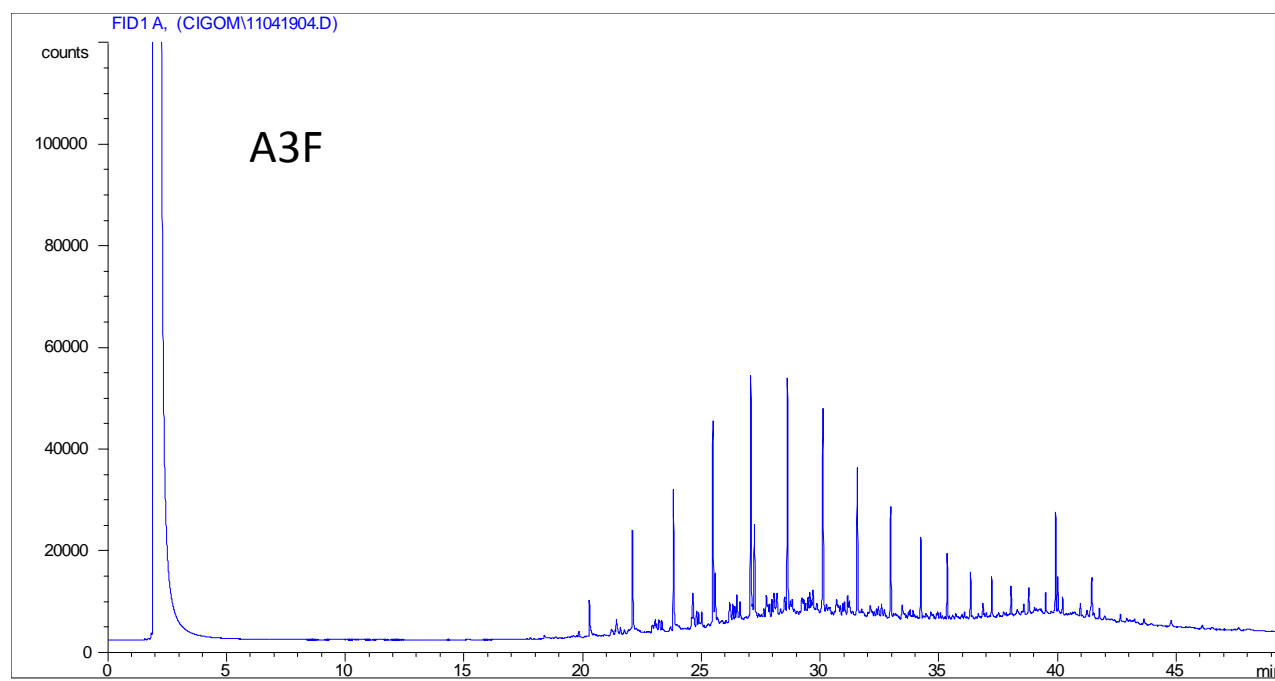
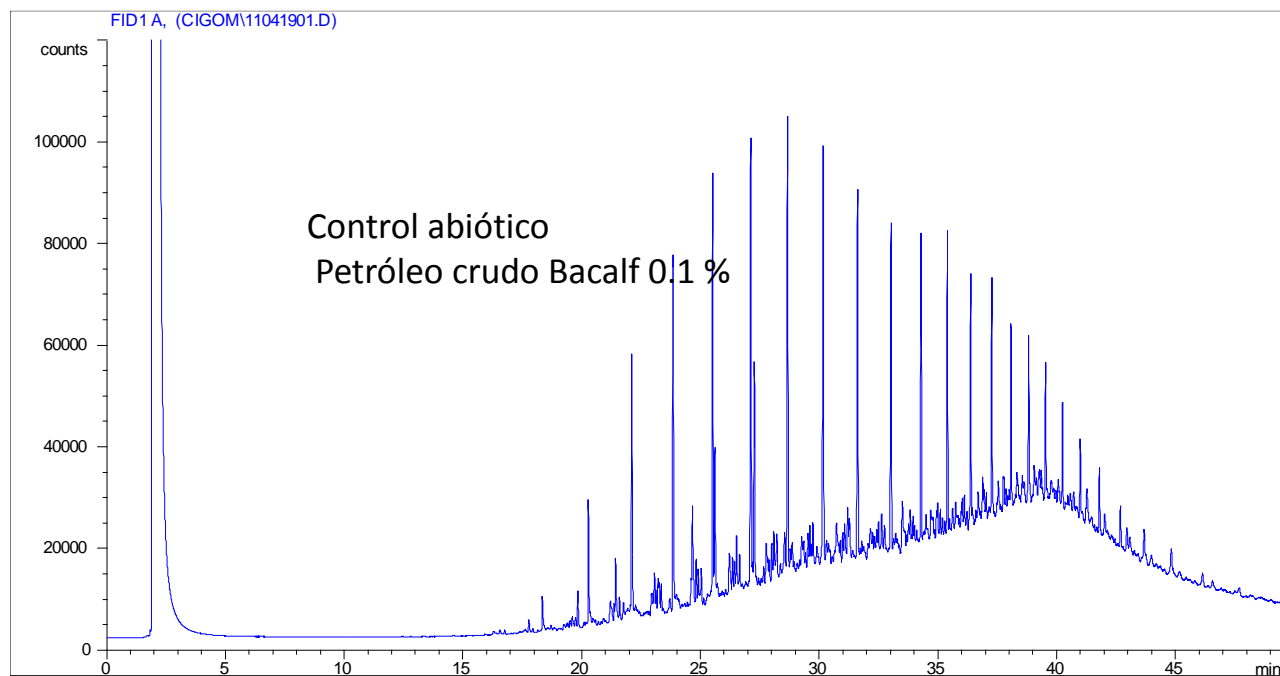


Figura 14. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de HTP después de 36 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio A3F (Fondo) obtenido de la zona del Cinturón Plegado de Perdido, Golfo de México. Petróleo crudo Bacalf 0.1 %, incubación a 4°C.

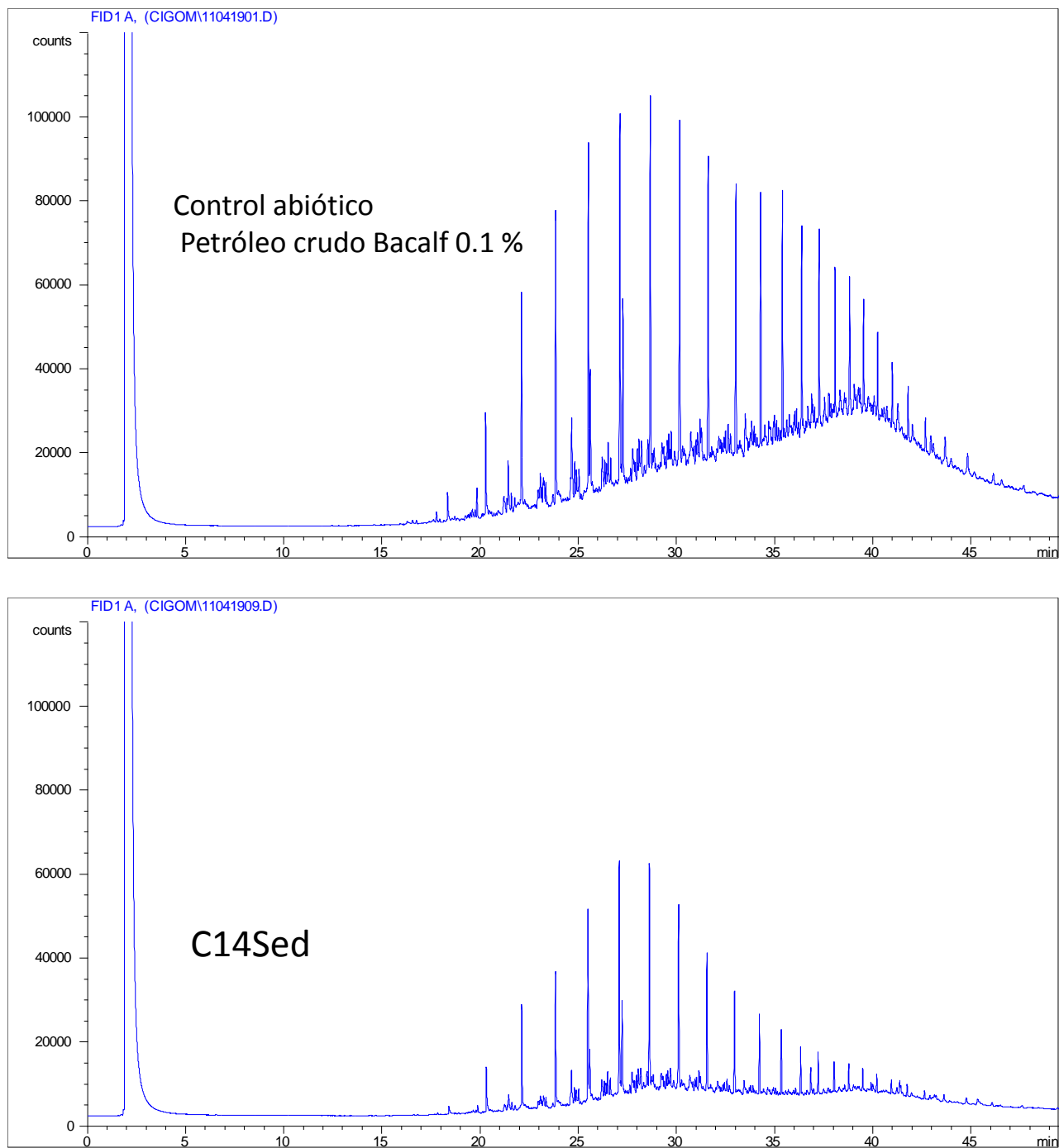


Figura 13. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de HTP después de 36 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio C14 Sed (Sedimento) obtenido de la zona de Coatzacoalcos, Golfo de México. Petróleo crudo Bacalf 0.1 %, incubación a 4°C.

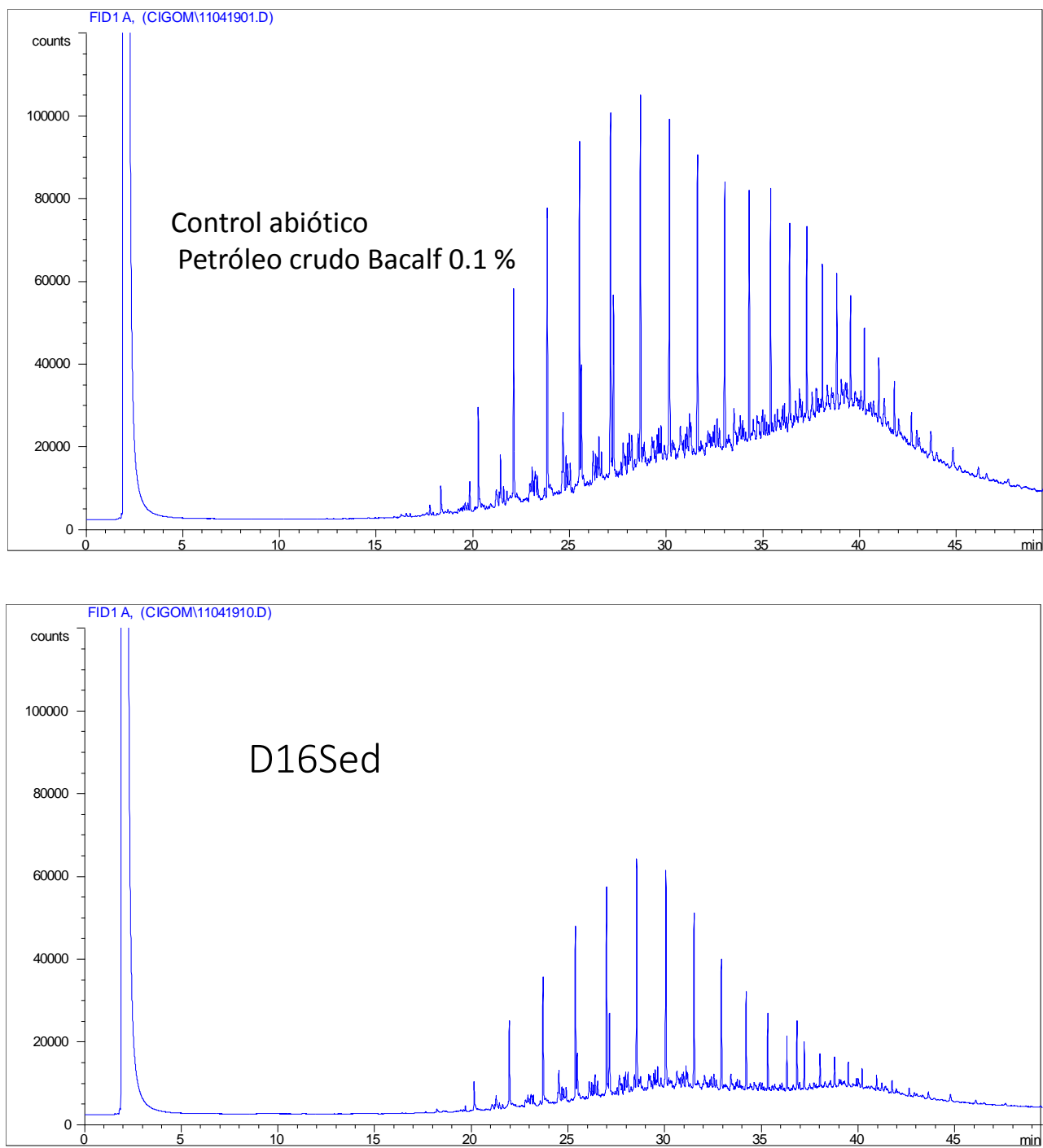


Figura 15. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de HTP después de 36 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio D16Sed (Sedimento) obtenido de la zona de Coatzacoalcos, Golfo de México. Petrónimo crudo Bacalf 0.1 %, incubación a 4°C.

Biodegradación de las fracciones alifáticas, aromáticas, resinas y asfaltenos por consorcios que presentan actividad biosurfactante aislados de la columna de agua y sedimentos durante las campañas de Metagenómica (2016 y 2017)

Se seleccionaron dos tratamientos de cada campaña para realizar fraccionamiento SARA y conocer porcentajes de degradación correspondientes (tabla 3). Los perfiles obtenidos de la fracción alifática y aromática se muestran en las figuras 16-23.

Tabla 3. Porcentajes de degradación de las fracciones (SARA) de diferentes tratamientos de las campañas 2016 y 2017.

Consortio Fracción	Control Abiotico %	A2MF %	C14MO %	A4MF %	C14SED %
Degradados	0	29.88	26.10	70.78	78.42
Saturados	35.97	31.93	29.78	8.44	6.60
AlkilAromáticos	25.25	6.57	10.99	2.98	1.54
Resinas no ácidas	4.60	6.21	7.05	2.32	1.25
Resinas ácidas	13.10	8.31	7.28	3.30	3.21
Remanente	4.62	3.14	4.31	1.47	1.10
Asfaltenos	16.46	13.97	14.49	10.71	7.88

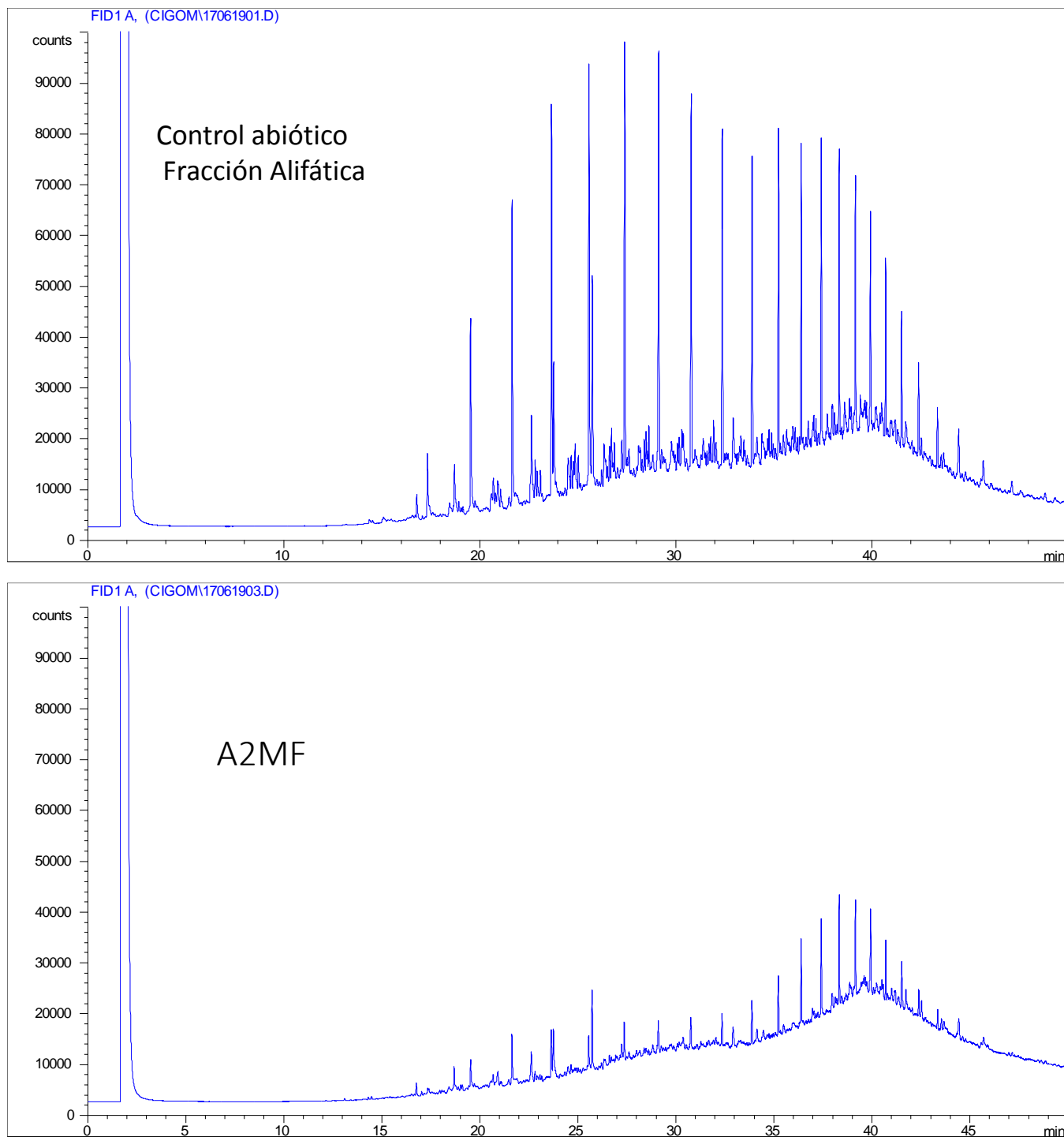


Figura 16. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de Alifáticos después de 24 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio A2MF obtenido de la zona de Perdido, Golfo de México. Petróleo crudo Bacaf 0.1 %, incubación a 4°C.

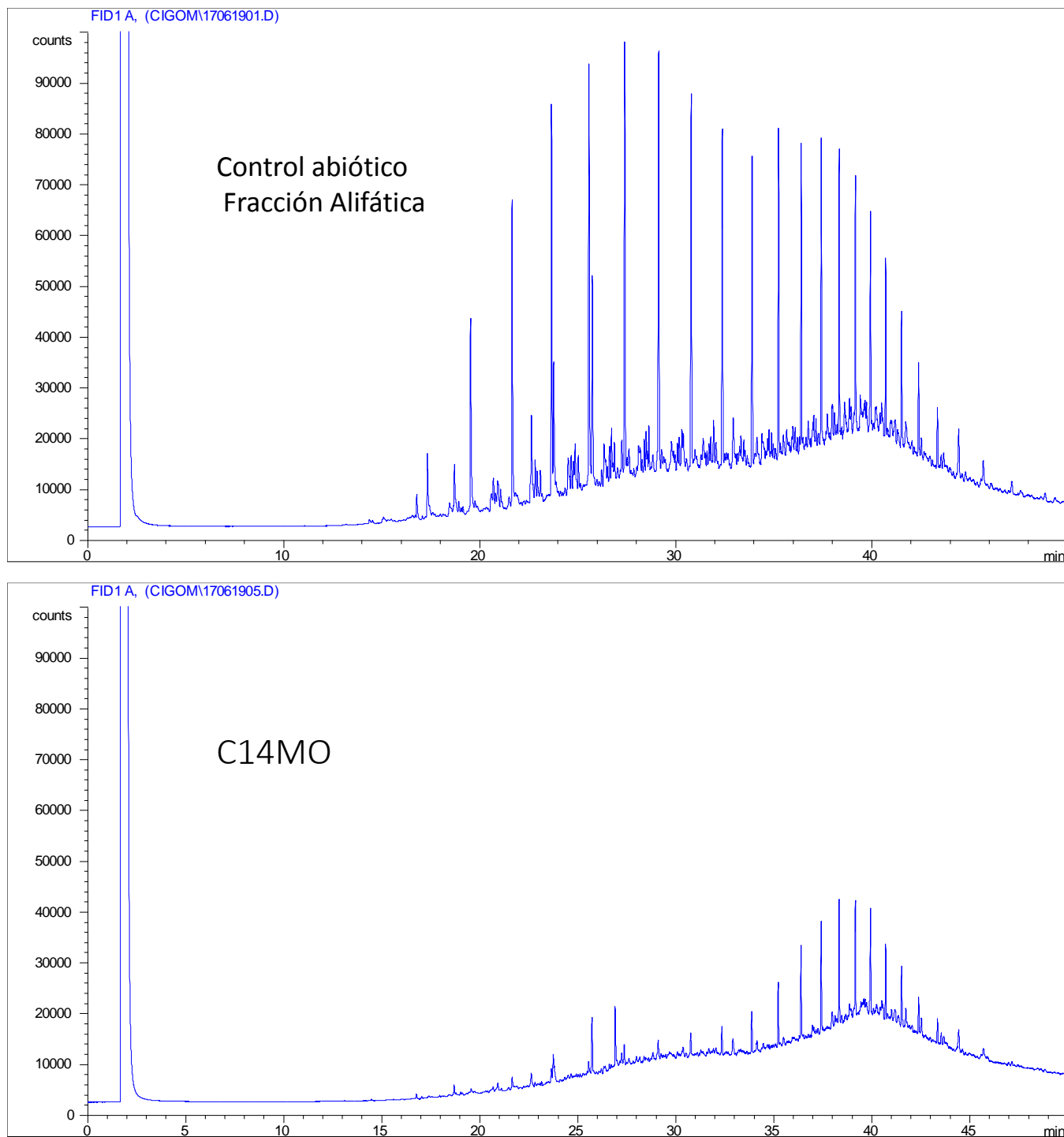


Figura 17. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de Alifáticos después de 24 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio C14MO obtenido de la zona de Coatzacoalcos, Golfo de México. Petróleo crudo Bacaf 0.1 %, incubación a 4°C.

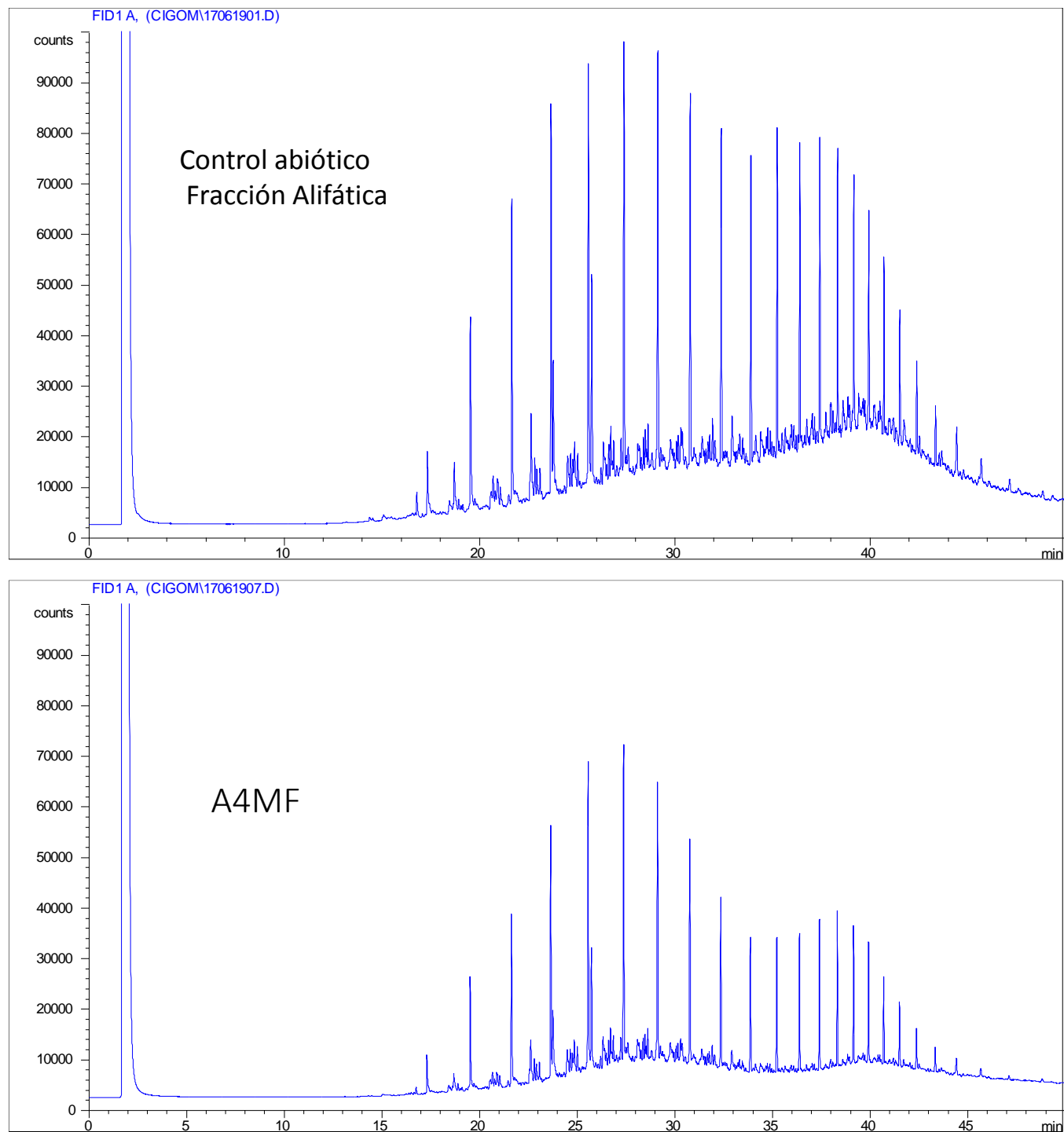


Figura 18. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de Alifáticos después de 36 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio A4MF obtenido de la zona de Perdido, Golfo de México. Petróleo crudo Bacaf 0.1 %, incubación a 4°C.

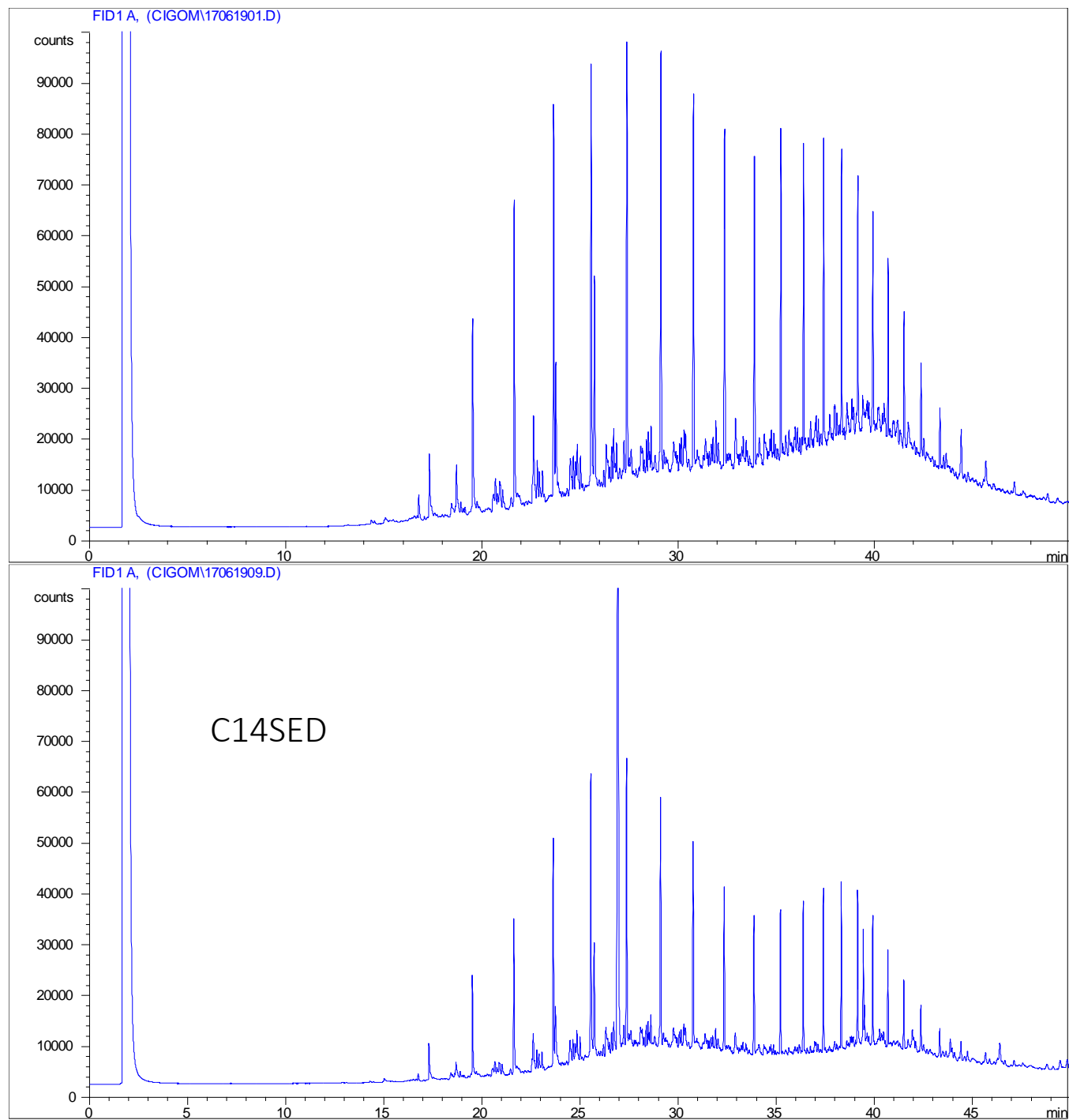


Figura 19. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de Alifáticos después de 36 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio C14Sed obtenido de la zona de Coatzacoalcos, Golfo de México. Petróleo crudo Bacaf 0.1 %, incubación a 4°C

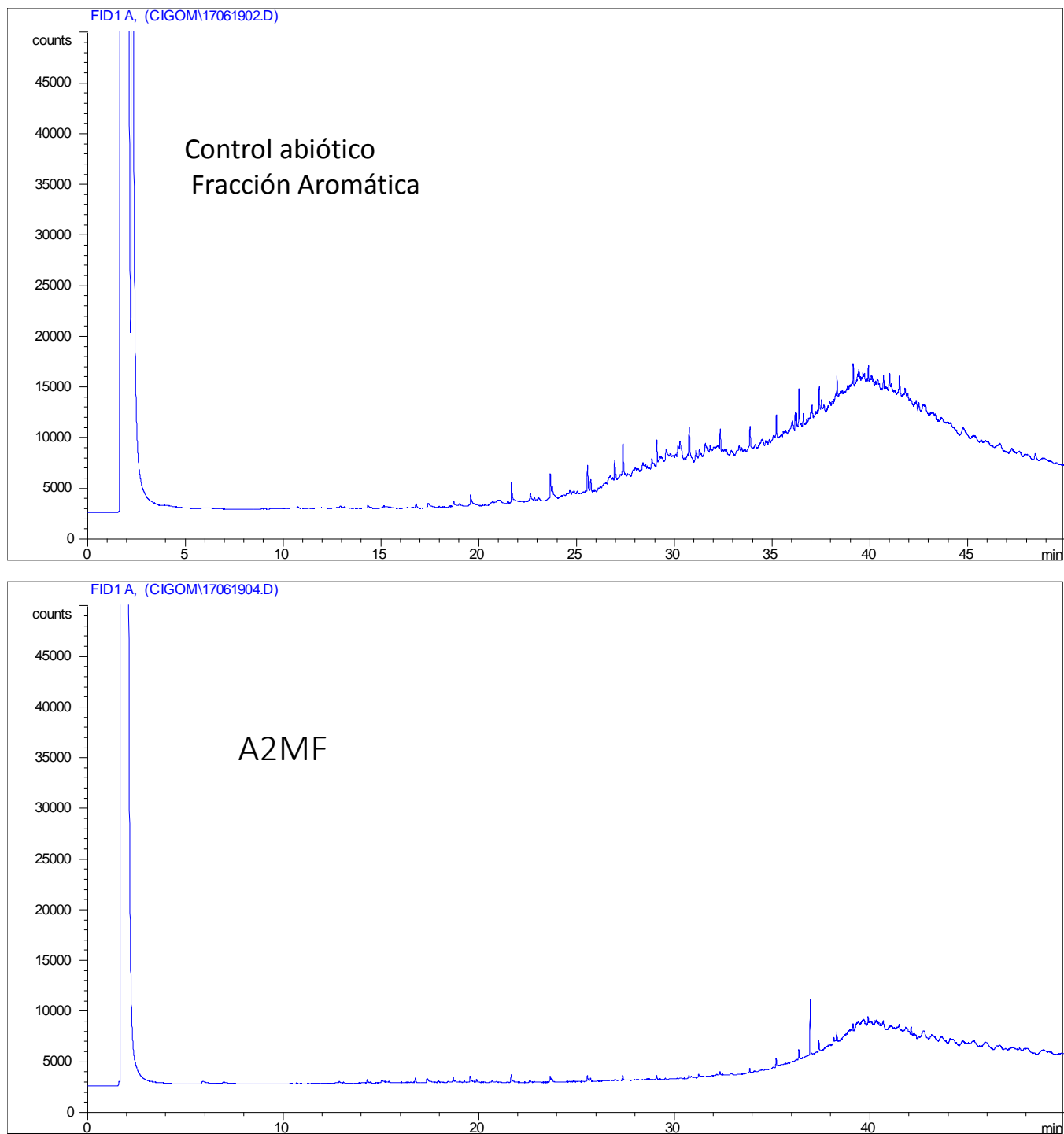


Figura 20. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de Aromáticos después de 24 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio A2MF obtenido de la zona de Perdido, Golfo de México. Petróleo crudo Bacaf 0.1 %, incubación a 4°C

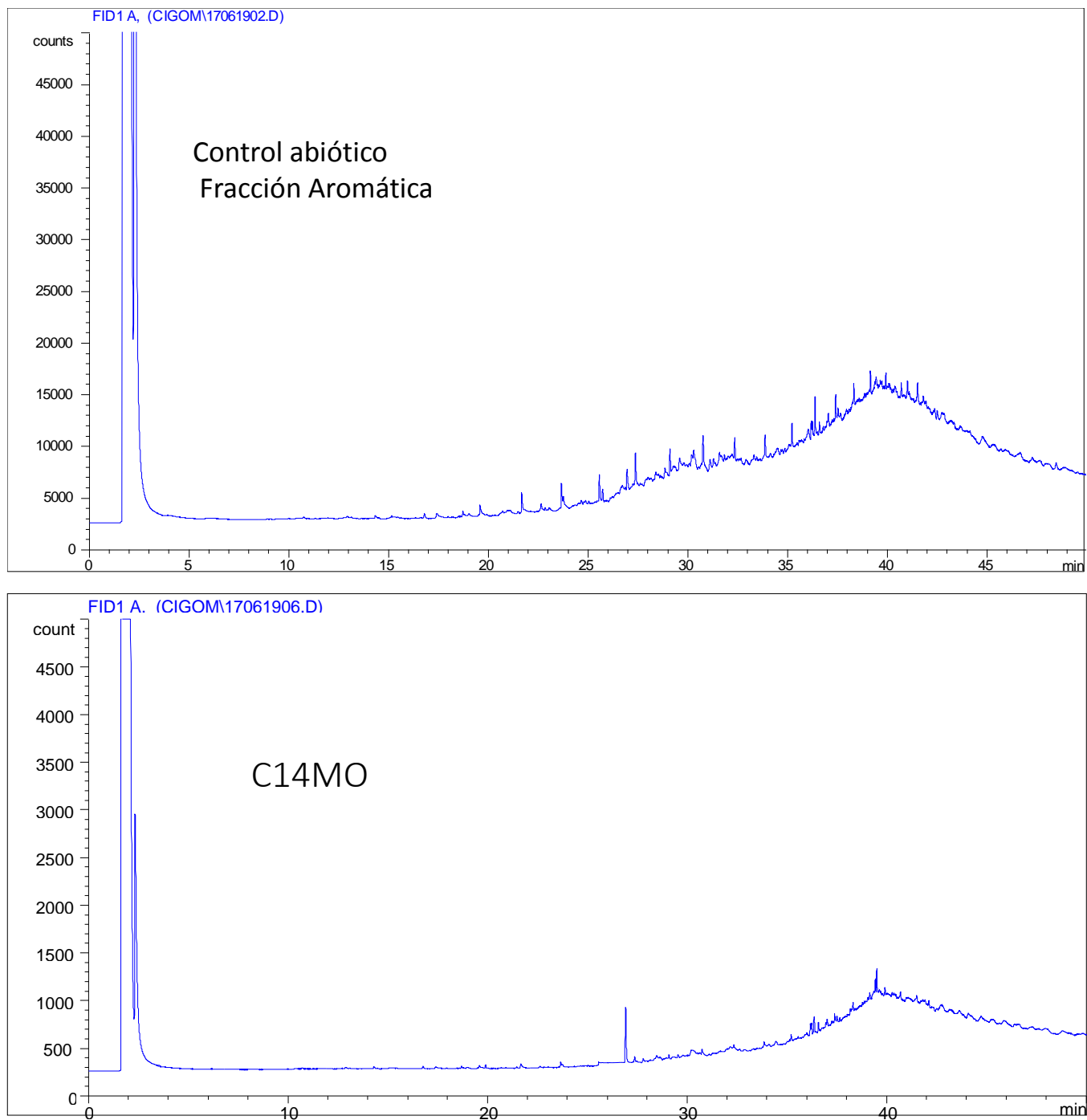


Figura 21. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de Aromáticos después de 24 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio C14MO obtenido de la zona de Coatzacoalcos, Golfo de México. Petróleo crudo Bacaf 0.1 %, incubación a 4°C.

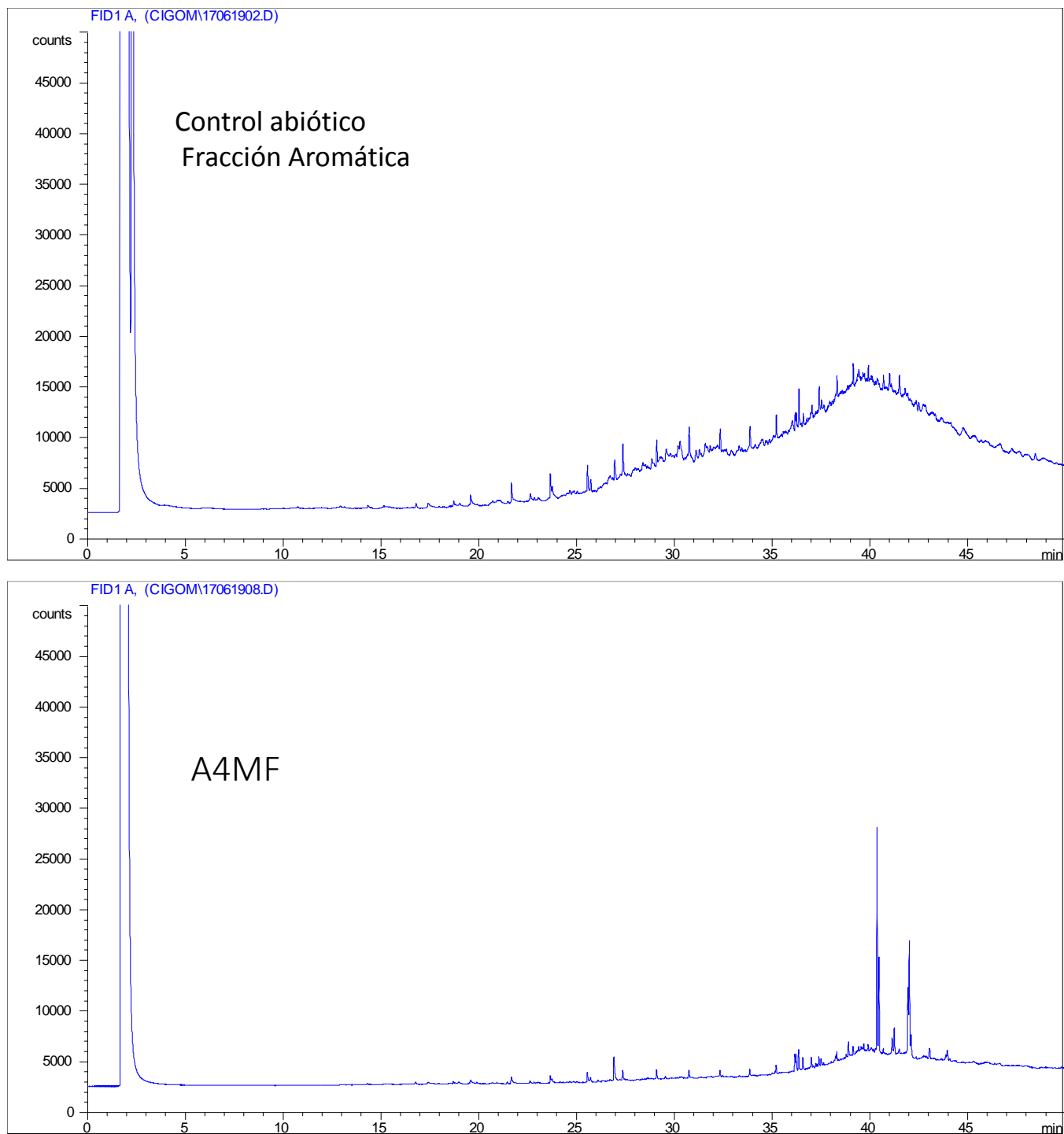


Figura 22. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de Aromáticos después de 36 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio A4MF obtenido de la zona de Perdido, Golfo de México. Petróleo crudo Bacaf 0.1 %, incubación a 4°C.

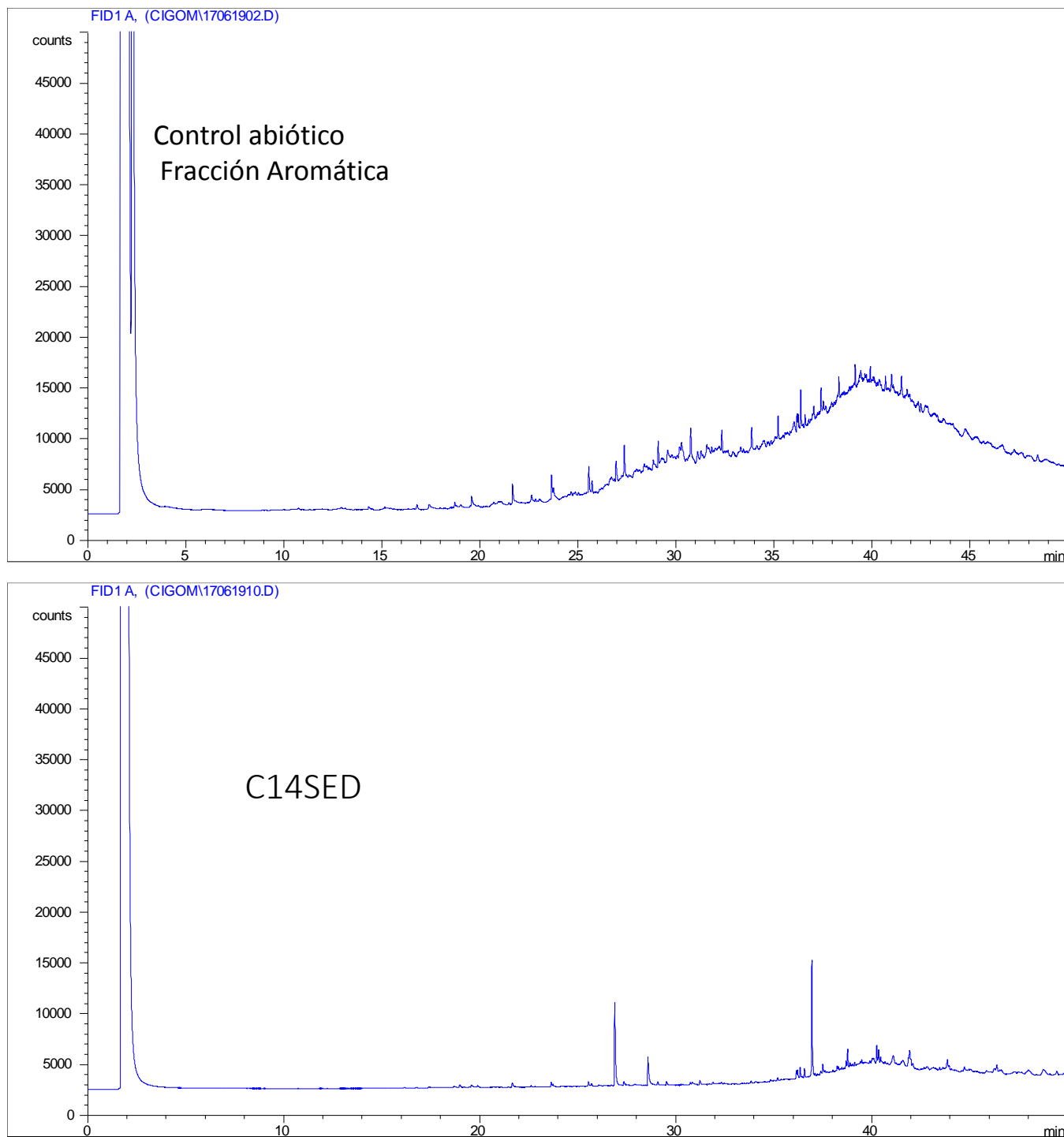


Figura 23. Perfiles cromatográficos (CG-IF) del contenido de Aromáticos después de 36 meses de tratamiento. (A) Control abiótico y (B) Consorcio C14Sed obtenido de la zona de Coatzacoalcos, Golfo de México. Petróleo crudo Bacaf 0.1 %, incubación a 4°C.

Conclusiones.

La capacidad de degradación de los hidrocarburos por las comunidades marinas se encuentra asociada a la producción de moléculas tensoactivas y biosurfactantes que favorecen su biodisponibilidad. Los consorcios degradadores con capacidad de producción de biosurfactantes podrán ser más efectivos en los procesos de biorremediación (Bioaumentación). Los biosurfactantes producidos podrán ser utilizados como dispersantes sustituyendo a sus contrapartes de origen biológico (cepas marinas) para evitar mayores daños ecológicos en caso de derrames.

Capítulo 11. Recuperación biológica mejorada de petróleo

En la recuperación primaria y secundaria de hidrocarburos sólo cerca del 50 % puede ser recuperado, dejando una gran cantidad de hidrocarburos en el subsuelo. La recuperación biológica mejorada de petróleo representa un posible método de recuperación terciaria. Aunque la idea de la recuperación biológica mejorada de petróleo ha existido por más de 75 años, incluso en estos tiempos se sabe muy poco de los mecanismos implicados (Kaster et al., 2012).

11.1 Recuperación biológica mejorada de petróleo en columna empacada

Para evaluar la recuperación mejorada de petróleo con el biosurfactante obtenido previamente se utilizará una columna empacada de arena descrita por Suthar et al. (2008). Una columna vertical de acero inoxidable de 275 mm de diámetro interior × 1650 mm de longitud. La columna se empacará con 145 g de arena (210-1000 micras de tamaño de partícula). La columna se satura con 50 mL aceite de engranajes de servicio pesado (densidad 0.918 kg L⁻¹). El potencial del agente biosurfactante para la recuperación de aceite se estimará mediante la adición de 50 mL de solución acuosa del biosurfactante en la columna. Se medirá la cantidad de petróleo recuperada. El experimento se llevará a cabo a 30, 50 y 70 ° C para evaluar la influencia de la temperatura sobre la recuperación de petróleo inducida por el biosurfactante (Seghal Kiran et al., 2010).

7.1.1 Recuperación en columna

- i) Saturación de la columna empacada con salmuera: A la columna empacada se le pasará gas nitrógeno por uno de sus extremos durante 5 minutos para eliminar el oxígeno de la columna. Posteriormente para asegurar la eliminación de todos los gases de la columna se detiene el flujo de nitrógeno y se aplica vacío durante dos minutos. La columna se satura con salmuera a una presión de 100 psi. El volumen de los poros de la columna se calculará midiendo el volumen de salmuera requerida para saturar la columna. Posteriormente se pasarán tres volúmenes de poro de salmuera a través de la columna para asegurar su saturación al 100% con salmuera.
- ii) Saturación de la columna empacada con aceite: El aceite lubricante Akron Super Gear para transmisión manual (GL-1 SAE 140) se utilizara en todos los experimentos. El aceite se pasará por la columna de la misma forma que la salmuera hasta el volumen

de saturación. Como entra aceite en la columna, la salmuera será desplazada saliendo por la parte inferior de la columna. La Saturación de Petróleo Inicial (S_{Aci}) se calcula mediante la medición del volumen de salmuera desplazado por la saturación de petróleo, también llamado Aceite Original en Posición (AcOP).

- iii) Inundación de salmuera: La columna de arena se inunda de nuevo con salmuera hasta que no exista aceite en el efluente, a esto se le llama, Saturación de Petróleo Residual (S_{Acr}). Aproximadamente de 6 a 9 volúmenes de poro de salmuera son suficientes para reducir la columna al valor de S_{or} . La cantidad de aceite retenido en el paquete de arena se determina volumétricamente. La S_{Acr} se calcula midiendo el volumen de aceite desplazado.
- iv) Inundación del biotensoactivo/bioemulsificante: Este se realiza de manera similar a las dos anteriores inundaciones. 0.6 volúmenes de poro del biotensoactivo/bioemulsificante se pasa a través de la columna a una velocidad de flujo aproximadamente de 2.5 mL/min y se mantiene en reposo durante 24 h. a continuación, la columna se inunda nuevamente con salmuera. Los vertidos precedentes de la columna se recogen en alícuotas de 25 mL para medir la cantidad de aceite recuperado utilizando el BT/BE. Se realizarán por triplicado el experimento para comprobar la eficiencia de recuperación del aceite.

El porcentaje de recuperación de aceite se calculó como sigue:

Volumen de Poro (PV) (mL) = Volumen de salmuera requerido para saturar la columna

Aceite Original en Posición (AcOP) (mL) = Volumen de salmuera desplazada por saturación de aceite

S_{AcrdAg} (mL) = Saturación de petróleo residual después de la inundación de agua

S_{AcrdBs} (mL) = Petróleo recuperado después de la inundación con el biosurfactante

$$\text{Saturación inicial de agua } (S_{Agi})(\%) = \frac{X}{PV} \times 100$$

Donde X = Volumen de poro – Volumen de salmuera recogida después de la inyección de aceite

$$(S_{Aci})(\%) = \frac{OOIP}{PV} \times 100$$

$$\text{Saturación de aceite residual } (S_{Acr})(\%) = \frac{X_i}{AcOP} \times 100$$

Donde X_i = AcOP – Volumen de aceite recogido después de las inundaciones de agua

Porcentaje de recuperación de petróleo en la extracción mejorada

$$(EOR)(\%) = \frac{\text{Aceite recuperado usando el biosurfactante}}{\text{Aceite en la columna después de la inundación con agua}} \times 100$$

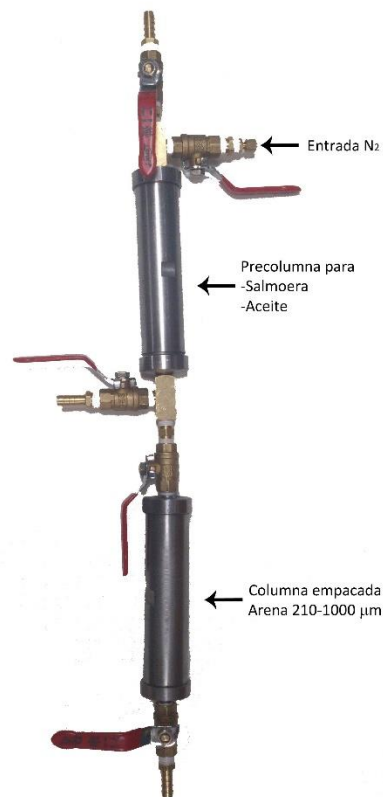


Figura 13. Columna empacada para la extracción mejorada de petróleo.

11.2 Purificación de biosurfactantes

El biosurfactante se recuperará por precipitación ácida (Ilori et al., 2005), para purificar el componente activo, el extracto concentrado se hace pasar por una columna cromatográfica conteniendo sílica gel de fase reversa (60-120 mesh) utilizando metanol 100 % como fase móvil a 1 mL/min en un cuarto frío. Se colectarán fracciones de 10 mL y se medirá densidad óptica a

280 nm usando un espectro UV-VIS. La presencia del biosurfactante se confirmará con el índice de emulsión, y la pureza se determinará por TLC.

11.3 Caracterización físico-química de biosurfactantes producidos por las cepas aisladas

11.3.1 Concentración micelar crítica

El extracto purificado se disolverá en agua destilada a diferentes concentraciones (0–1000 mg L⁻¹), la tensión superficial de las diferentes soluciones se medirá usando el tensiómetro para determinar la concentración micelar crítica. La CMC se determinará graficando la tensión superficial en función de la concentración del biosurfactante. Posteriormente, se evaluarán la tensión superficial y estabilidad de la emulsión (E_{24}), en un rango de temperaturas de 20 a 100 °C por calentamiento durante una hora; rango de pH 2-12 con la adición de NaOH o HCl (1 mol L⁻¹); y sal (NaCl) a concentraciones de (5-25 % p/v) (Khopade et al., 2012; White et al., 2013).

11.3.2 Tensión superficial e índice de emulsión

Las propiedades emulsionantes de los compuestos biosurfactantes se determinarán mediante la dispersión de 100 µL de diesel en 7.5 mL de buffer Tris-MgSO₄ pH 7.0 en presencia de 500 µL de cada sobrenadante. Estas mezclas de diesel:buffer:sobrenadante se agitarán vigorosamente durante 30 s a temperatura ambiente y se dejarán reposar durante 2 min. Posteriormente, el grado de dispersión del diésel se estimará a partir de los valores de absorbancia a 620 nm. Mezclas similares de diesel:solución amortiguadora y medio de cultivo se prepararán como blancos. Para otros análisis, 15 mL de cada sobrenadante de las cepas se mezclarán con 15 g de 16° o 25° API de petróleo crudo en tubos de plástico tapados durante 60 s. La calidad de la emulsión de petróleo en agua se determinará visualmente. Además, las emulsiones se dejarán en reposo durante 24 h, con el fin de determinar la estabilidad de estas emulsiones. Estas emulsiones estables se utilizarán para los análisis de la viscosidad. Cada emulsión se agitará manualmente durante 60 s y su viscosidad se determinará durante 30 s con un viscosímetro de Ostwald comparándose con la del agua destilada. Todos los ensayos se realizarán por triplicado a temperatura ambiente (Bozo-Hurtado et al., 2012).

11.3.3 Análisis por HPLC del extracto purificado

La fracción generada por columna se secará bajo corriente de nitrógeno y posteriormente se resuspenderá en metanol y se analizará en el equipo de HPLC. Muestras de 5 μL serán inyectadas en una columna de fase reversa C_{18} , usando como fase móvil 4 mmol L^{-1} de acetato de sodio:acetonitrilo, se utilizará un gradiente de 5 % a 100 % acetonitrilo durante un periodo de 55 min con un flujo de 1 mL min^{-1} (White et al., 2013).

11.3.4 Composición y análisis del biosurfactante producido

El contenido total de carbohidratos se determinará por el método de fenol-ácido sulfúrico usando glucosa como estándar (DuBois et al., 1956), el contenido de proteína se determinará por el método de Lowry (Lowry et al., 1951), y el contenido total de lípidos se determinará por estimación gravimétrica (Lotfabad et al., 2009).

11.3.5 Análisis de la composición de ácidos grasos en los biosurfactantes

La composición de los ácidos grasos se determinará mediante la conversión de metil ésteres de ácidos grasos (FAMES) y analizadas por cromatografía de gases. Se adicionará ácido nonadecanoico como estándar interno al extracto para la digestión ácida, los ácidos grasos serán convertidos directamente a metil ésteres con la adición de 1 mL de una mezcla de esterificación (95:5 v/v 3 N HCl metanólico:2,2-dimetoxipropano) seguido de una incubación a 90 ° C por una hora. Después del enfriamiento, los FAMES serán recuperados con la adición de 1 % p/v de NaCl (1 mL) y n-hexano (1 mL) y se agitará en un vortex. La capa superior de hexano con los FAMES se inyectará directamente en un GC-FID equipado con una columna tipo WAX (White et al., 2013).

11.3.6 Actividad antimicrobiana

Al biosurfactante crudo se le determinará la actividad antimicrobiana por el método de difusión (Joshi et al., 2008) , y se calculara el área de la zona de inhibición. Los biosurfactantes serán probados contra cepas patógenas origen clínico: *Escherichia coli*, *B. subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (Seghal Kiran et al., 2010).

12. Conclusiones Generales

Se obtuvieron 28 aislados de sedimentos marinos del estuario de Coatzacoalcos, de los cuales se encontraron dos hongos y 26 bacterias.

De los aislados obtenidos se encontraron 8 con actividad hemolítica, de los cuales el aislado 6a fue el que presentó mayor actividad.

El protocolo planteado para la selección de bacterias productoras de biosurfactantes arrojó como bacteria potencial productora a la 6a, sin embargo, los cultivos con menores resultados pueden aun ser analizados por otras técnicas como difusión en placa de aceite y prueba de swarming.

La relación concentración de biosurfactante – hemólisis/tensión superficial debe ser analizada en la selección de un mejor medio de cultivo para aumentar la concentración del biosurfactante y poder realizar una caracterización del mismo.

El medio de cultivo seleccionado para enriquecer las poblaciones microbianas deberá contener fuentes de carbono hidrofóbicas para dirigir la selección a microorganismos productores de biosurfactantes.

El aislado 6a crecido en medio MS bajo la tensión superficial a 37.2 mN m^{-1} en 4 días de incubación, este mismo aislado presentó un índice de emulsión de 36 % y dio positivo a la prueba de colapso por gota.

Este aislado será utilizado para identificación y producción de biosurfactantes en fermentador.

Se han identificado por 16s a 13 géneros de bacterias.

Los géneros identificados corresponden a productores de biosurfactantes y biodegradadores de hidrocarburos.

La actividad biosurfactante que se encuentra con la presencia de consorcios es diferente cuando se encuentran cepas aislada, lo que indica que existe una sinergia en la producción, o bien, se producen familias de biosurfactantes que mejoran esta actividad.

La capacidad de degradación de los hidrocarburos por las comunidades marinas se encuentra asociada a la producción de moléculas tensoactivas y biosurfactantes que favorecen su biodisponibilidad. Los consorcios degradadores con capacidad de producción de biosurfactantes podrán ser más efectivos en los procesos de biorremediación (Bioaumentación). Los biosurfactantes producidos podrán ser utilizados como dispersantes sustituyendo a sus contrapartes de origen biológico (cepas marinas) para evitar mayores daños ecológicos en caso de derrames.

Capítulo 13. Referencias

- Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S., & Nabi, A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 223(1-3), 143-151. doi:10.1016/j.desal.2007.01.198
- Aguayo-Camargo, J. E. (2004). Neotectónica y facies sedimentarias cuaternarias en el sureste del Golfo de México, dentro del marco tectono-estratigráfico regional evolutivo del Sur de México. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, VI(1), 19-45.
- Aguilar, V., Hernández, D., & Kolb, M. (2007). Análisis de vacíos y omisiones en conservación de la biodiversidad marina en México: océanos, costas e islas. *CONABIO-CONANP-TNC-PRONATURA*, 18.
- Almeida, P. F., Moreira, R. S., Almeida, R. C. C., Guimarães, A. K., Carvalho, A. S., Quintella, C., . . . Taft, C. A. (2004). Selection and Application of Microorganisms to Improve Oil Recovery. *Engineering in Life Sciences*, 4(4), 319-325. doi:10.1002/elsc.200420033
- Anderson, B. E., & Henrysson, T. (1996). Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46, 647-652.
- Antoniou, E., Fodelianakis, S., Korkakaki, E., & Kalogerakis, N. (2015). Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strains using crude oil as carbon source. *Front Microbiol*, 6, 1-14. doi:10.3389/fmicb.2015.00274
- Arredondo Godínez, L. A. (2016). *Batimetría de alta resolución en el Escarpe de Campeche, al sur del Golfo de México*. (Licenciatura), UNAM,
- Atkinson, C. A., Jolley, D. F., & Simpson, S. L. (2007). Effect of overlying water pH, dissolved oxygen, salinity and sediment disturbances on metal release and sequestration from metal contaminated marine sediments. *Chemosphere*, 69(9), 1428-1437. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.04.068
- Baharum, S. N., Beng, E. K., & Mokhtar, M. A. A. (2010). Marine microorganisms: Potential application and challenges. *Journal of Biological Sciences*, 10(6), 555-564.
- Banat, I. M. (1993). The Isolation of a Thermophilic Biosurfactant Producing *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 15(6), 591-594. doi:Doi 10.1007/Bf00138546

- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., . . . Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *87*(2), 427-444. doi:10.1007/s00253-010-2589-0
- Bayoumi, R. A., Haroun, B. M., Ghazal, E. A., & Maher, Y. A. (2010). Structural Analysis and Characteristics of Biosurfactants Produced by Some Crude Oil Utilizing Bacterial Strains. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, *48*(8), 3484-3498.
- Bhardwaj, G., Cameotra, S. S., & Chopra, H. K. (2013). Biosurfactants from Fungi: A Review. *Petroleum & Environmental Biotechnology*, *4*(6), 1-6. doi:10.4172/2157-7463.1000160
- Board, T. R., & Council, N. R. (2003). *Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects*. Washington, DC: The National Academies Press.
- Bodour, A. A., & Miller-Maier, R. M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, *32*(3), 273-280. doi:10.1016/S0167-7012(98)00031-1
- Bordoloi, N. K., & Konwar, B. K. (2008). Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. *Colloids Surf B Biointerfaces*, *63*(1), 73-82. doi:10.1016/j.colsurfb.2007.11.006
- Bozo-Hurtado, L., Rocha, C. A., Malave, R., & Suarez, P. (2012). Biosurfactant Production by Marine Bacterial Isolates from the Venezuelan Atlantic Front. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *89*(5), 1068-1072. doi:10.1007/s00128-012-0820-7
- Brown, L. R. (2010). Microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Curr Opin Microbiol*, *13*(3), 316-320. doi:10.1016/j.mib.2010.01.011
- Carrillo, P. G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S. I., & Giulietti, A. M. (1996). Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *12*(1), 82-84. doi:10.1007/BF00327807
- Christofi, N., & Ivshina, I. B. (2002). Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, *93*(6), 915-929. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01774.x

- CMIC. (2012). Infraestructura para hidrocarburos: Agenda e incidencia de la industria de la construcción en México. *Camara Mexicana de la Industria de la Construcción*, 18-27.
- Cooper, D. G., & Paddock, D. A. (1984). Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(1), 173-176.
- da Silva, M. A., Cavalett, A., Spinner, A., Rosa, D. C., Jasper, R. B., Quecine, M. C., . . . Lima, A. O. (2013). Phylogenetic identification of marine bacteria isolated from deep-sea sediments of the eastern South Atlantic Ocean. *Springerplus*, 2(1), 127. doi:10.1186/2193-1801-2-127
- Das, P., Mukherjee, S., & Sen, R. (2009). Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. *Bioresource Technology*, 100(2), 1015-1019. doi:10.1016/j.biortech.2008.07.015
- Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 47-64.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. doi:10.1021/ac60111a017
- El-Sersy, N. A. (2012). Plackett-Burman Design to Optimize Biosurfactant Production by Marine *Bacillus subtilis* N10. *Romanian Biotechnological Letters*, 17(2), 7049-7064.
- Espinosa-Reyes, G., Ilizaliturri, C. A., Gonzalez-Mille, D. J., Costilla, R., Diaz-Barriga, F., Carmen Cuevas, M. D., . . . Mejia-Saavedra, J. (2010). DNA damage in earthworms (*Eisenia* spp.) as an indicator of environmental stress in the industrial zone of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 45(1), 49-55. doi:10.1080/10934520903388731
- Farrán, A., Grimalt, J., Albaigés, J., Botello, A. V., & Macko, S. A. (1987). Assessment of petroleum pollution in a Mexican river by molecular markers and carbon isotope ratios. *Marine Pollution Bulletin*, 18(6), 284-289. doi:10.1016/0025.326X(87)90506-6
- Ferraz, C., De Araujo, A. A., & Pastore, G. M. (2002). The influence of vegetable oils on biosurfactant production by *Serratia marcescens*. *Appl Biochem Biotechnol*, 98-100, 841-847.

- Franzetti, A., Caredda, P., Ruggeri, C., La Colla, P., Tamburini, E., Papacchini, M., & Bestetti, G. (2009). Potential applications of surface active compounds by *Gordonia sp.* strain BS29 in soil remediation technologies. *Chemosphere*, 75(6), 801-807. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.12.052
- Gómez-Treviño, N. J., & Piña-Monarez, M. R. (2007). Estrategia de PEMEX para la extracción de hidrocarburos. *CULCyT//Ciencias de la tierra*, 1-12.
- Griffin, W. C. (1954). Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. *Journal of the Society of Cosmetic Chemist*, 5, 249-256.
- Gunther, N. W. t., Nunez, A., Fett, W., & Solaiman, D. K. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2288-2293. doi:10.1128/AEM.71.5.2288-2293.2005
- Haba, E., Espuny, M. J., Busquets, M., & Manresa, A. (2000). Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J Appl Microbiol*, 88(3), 379-387.
- Haddadin, M. S. Y., Abou Arqoub, A. A., Abu Reesh, I., & Haddadin, J. (2009). Kinetics of hydrocarbon extraction from oil shale using biosurfactant producing bacteria. *Energy Conversion and Management*, 50(4), 983-990. doi:10.1016/j.enconman.2008.12.015
- Hajibagheri, F., Hashemi, A., Lashkarbolooki, M., & Ayatollahi, S. (2018). Investigating the synergic effects of chemical surfactant (SDBS) and biosurfactant produced by bacterium (*Enterobacter cloacae*) on IFT reduction and wettability alteration during MEOR process. *Journal of Molecular Liquids*, 256, 277-285. doi:10.1016/j.molliq.2018.02.020
- Hazen, T. C., Dubinsky, E. A., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Piceno, Y. M., Singh, N., . . . Mason, O. U. (2010). Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. *Science*, 330(6001), 204-208. doi:10.1126/science.1195979
- Hazen, T. C., Prince, R. C., & Mahmoudi, N. (2016). Marine Oil Biodegradation. *Environ Sci Technol*, 50(5), 2121-2129. doi:10.1021/acs.est.5b03333
- Henson, M. W., Pitre, D. M., Weckhorst, J. L., Lanclos, V. C., Webber, A. T., & Thrash, J. C. (2016). Artificial Seawater Media Facilitate Cultivating Members of the Microbial Majority from the Gulf of Mexico. *mSphere*, 1(2). doi:10.1128/mSphere.00028-16

- Heryani, H., & Putra, M. D. (2017a). Dataset on potential large scale production of biosurfactant using *Bacillus* sp. *Data Brief*, *13*, 196-201. doi:10.1016/j.dib.2017.05.037
- S2352-3409(17)30228-7 [pii]
- Heryani, H., & Putra, M. D. (2017b). Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, *27*, 49-54. doi:10.1016/j.ejbt.2017.03.005
- Ibacache-Quiroga, C., Ojeda, J., Espinoza-Vergara, G., Olivero, P., Cuellar, M., & Dinamarca, M. A. (2013). The hydrocarbon-degrading marine bacterium *Cobetia* sp. strain MM1IDA2H-1 produces a biosurfactant that interferes with quorum sensing of fish pathogens by signal hijacking. *Microb Biotechnol*, *6*(4), 394-405. doi:10.1111/1751-7915.12016
- Ilori, M. O., Amobi, C. J., & Odocha, A. C. (2005). Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. *Chemosphere*, *61*(7), 985-992. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.03.066
- Jimenez Islas, D., Medina Moreno, S. A., & Gracida Rodriguez, J. N. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, *26*(1), 65-84.
- Jing, H., Xia, X., Suzuki, K., & Liu, H. (2013). Vertical profiles of bacteria in the tropical and subarctic oceans revealed by pyrosequencing. *PLoS One*, *8*(11), e79423. doi:10.1371/journal.pone.0079423
- Joshi, S., Bharucha, C., & Desai, A. J. (2008). Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresource Technology*, *99*(11), 4603-4608. doi:10.1016/j.biortech.2007.07.030
- Kai, W., & Yan, P. S. (2016). Optimization of Lipase production from a novel strain *Thalassospira permensis* M35-15 using Response Surface Methodology. *Bioengineered*, *7*(5), 298-303. doi:10.1080/21655979.2016.1197713
- Kaster, K., Hiorth, A., Kjeilen-Eilertsen, G., Boccadoro, K., Lohne, A., Berland, H., . . . Brakstad, O. (2012). Mechanisms Involved in Microbially Enhanced Oil Recovery. *Transport in Porous Media*, *91*(1), 59-79. doi:10.1007/s11242-011-9833-7

- Khire, J. M., & Khan, M. I. (1994a). Microbially Enhanced Oil-Recovery (Meor) .1. Importance and Mechanism of Meor. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(2), 170-172. doi:10.1016/0141-0229(94)90081-7
- Khire, J. M., & Khan, M. I. (1994b). Microbially Enhanced Oil-Recovery (Meor) .2. Microbes and the Subsurface Environment for Meor. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(3), 258-259. doi:10.1016/0141-0229(94)90052-3
- Khopade, A., Ren, B., Liu, X. Y., Mahadik, K., Zhang, L., & Kokare, C. (2012). Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces species* B3. *J Colloid Interface Sci*, 367(1), 311-318. doi:10.1016/j.jcis.2011.11.009
- Kim, S. Y., Oh, D. K., Lee, K. H., & Kim, J. H. (1997). Effect of soybean oil and glucose on sophorose lipid fermentation by *Torulopsis bombicola* in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(1), 23-26.
- Kimes, N. E., Callaghan, A. V., Aktas, D. F., Smith, W. L., Sunner, J., Golding, B., . . . Morris, P. J. (2013). Metagenomic analysis and metabolite profiling of deep-sea sediments from the Gulf of Mexico following the Deepwater Horizon oil spill. *Front Microbiol*, 4, 1-17. doi:10.3389/fmicb.2013.00050
- Kiran, G. S., Hema, T. A., Gandhimathi, R., Selvin, J., Thomas, T. A., Rajeetha Ravji, T., & Natarajaseenivasan, K. (2009). Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 73(2), 250-256. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.05.025
- Kiran, G. S., Thomas, T. A., & Selvin, J. (2010). Production of a new glycolipid biosurfactant from marine *Nocardiopsis lucentensis* MSA04 in solid-state cultivation. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 78(1), 8-16. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.01.028
- Kitamoto, D., Ikegami, T., Suzuki, G. T., Sasaki, A., Takeyama, Y.-i., Idemoto, Y., . . . Yanagishita, H. (2001). Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma (Candida antarctica)*. *Biotechnology Letters*, 23(20), 1709-1714. doi:10.1023/a:1012464717259

- Kronemberger Fde, A., Santa Anna, L. M., Fernandes, A. C., Menezes, R. R., Borges, C. P., & Freire, D. M. (2008). Oxygen-controlled biosurfactant production in a bench scale bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol*, *147*(1-3), 33-45. doi:10.1007/s12010-007-8057-3
- Lazar, I., Petrisor, I. G., & Yen, T. E. (2007). Microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Petroleum Science and Technology*, *25*(11-12), 1353-1366. doi:10.1080/10916460701287714
- Li, X., Qian, P., Wu, S. G., & Yu, H. Y. (2014). Characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Idiomarina* sp. W33 and its application for biodiesel production using *Jatropha* oil. *Extremophiles*, *18*(1), 171-178. doi:10.1007/s00792-013-0610-0
- Li, X., & Yu, H. Y. (2014). Characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Haloarcula* sp. G41 and its application for biodiesel production. *Folia Microbiol (Praha)*, *59*(6), 455-463. doi:10.1007/s12223-014-0320-8
- Lindh, M. V., Maillot, B. M., Shulse, C. N., Gooday, A. J., Amon, D. J., Smith, C. R., & Church, M. J. (2017). From the Surface to the Deep-Sea: Bacterial Distributions across Polymetallic Nodule Fields in the Clarion-Clipperton Zone of the Pacific Ocean. *Frontiers in Microbiology*, *8*(1696). doi:10.3389/fmicb.2017.01696
- Liu, J. F., Ma, L. J., Mu, B. Z., Liu, R. L., Ni, F. T., & Zhou, J. X. (2005). The field pilot of microbial enhanced oil recovery in a high temperature petroleum reservoir. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, *48*(3-4), 265-271. doi:10.1016/j.petrol.2005.06.008
- Lotfabad, T. B., Shourian, M., Roostaazad, R., Najafabadi, A. R., Adelzadeh, M. R., & Noghabi, K. A. (2009). An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. *Colloids Surf B Biointerfaces*, *69*(2), 183-193. doi:10.1016/j.colsurfb.2008.11.018
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265-275.
- Machín-Ramírez, C., Okoh, A. I., Morales, D., Mayolo-Deloisa, K., Quintero, R., & Trejo-Hernández, M. d. R. (2008). Slurry-phase biodegradation of weathered oily sludge waste. *Chemosphere*, *70*, 737-744.

- Machín, C. (2000). *Tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos intemperizados en un sistema semisólido*. (Maestría Maestría), Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Tesis de Maestría, Cuernavaca.
- Maneerat, S., Bamba, T., Harada, K., Kobayashi, A., Yamada, H., & Kawai, F. (2006). A novel crude oil emulsifier excreted in the culture supernatant of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(2), 254-259. doi:10.1007/s00253-005-0050-6
- Mohanram, R., Jagtap, C., & Kumar, P. (2016). Isolation, screening, and characterization of surface-active agent-producing, oil-degrading marine bacteria of Mumbai Harbor. *Mar Pollut Bull*, 105(1), 131-138. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.02.040
- Morales-Mora, M. A., Rodriguez-Perez, B., Martinez-Delgadillo, S. A., Rosa-Dominguez, E., & Nolasco-Hipolito, C. (2014). Human and ecotoxicological impacts assessment from the Mexican oil industry in the Coatzacoalcos region, as revealed by the USEtox model. *Environ Sci Pollut Res Int*, 21(16), 9819-9831. doi:10.1007/s11356-014-2942-4
- Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol*, 24(11), 509-515. doi:10.1016/j.tibtech.2006.09.005
- Mukherjee, S., Das, P., Sivapathasekaran, C., & Sen, R. (2008). Enhanced production of biosurfactant by a marine bacterium on statistical screening of nutritional parameters. *Biochemical Engineering Journal*, 42(3), 254-260. doi:10.1016/j.bej.2008.07.003
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133(2), 183-198. doi:10.1016/j.envpol.2004.06.009
- Mulligan, C. N., & Gibbs, B. F. (1989). Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(11), 3016-3019.
- Mutalik, S. R., Vaidya, B. K., Joshi, R. M., Desai, K. M., & Nene, S. N. (2008). Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rhodococcus* spp. MTCC 2574. *Bioresource Technology*, 99(16), 7875-7880. doi:10.1016/j.biortech.2008.02.027

- Nguyen, T. T., Youssef, N. H., McInerney, M. J., & Sabatini, D. A. (2008). Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. *Water Res*, *42*(6-7), 1735-1743. doi:10.1016/j.watres.2007.10.038
- Nogi, Y., Yoshizumi, M., & Miyazaki, M. (2014). *Thalassospira povalilytica* sp. nov., a polyvinyl-alcohol-degrading marine bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, *64*(Pt 4), 1149-1153. doi:10.1099/ijs.0.058321-0
- Pacwa-Plociniczak, M., Plaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int J Mol Sci*, *12*(1), 633-654. doi:10.3390/ijms12010633
- Pal, M. P., Vaidya, B. K., Desai, K. M., Joshi, R. M., Nene, S. N., & Kulkarni, B. D. (2009). Media optimization for biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* MTCC 2794: artificial intelligence versus a statistical approach. *J Ind Microbiol Biotechnol*, *36*(5), 747-756. doi:10.1007/s10295-009-0547-6
- Pasquali, R. C., Taurozzi, M. P., & Bregni, C. (2008). Some considerations about the hydrophilic-lipophilic balance system. *Int J Pharm*, *356*(1-2), 44-51. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.12.034
- Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., Lakshmanaperumalsamy, P., Marchant, R., & Banat, I. M. (2003). The potential of bacterial isolates for emulsification with a range of hydrocarbons. *Acta Biotechnologica*, *23*(4), 335-345. doi:10.1002/abio.200390043
- Raza, Z. A., Khalid, Z. M., & Banat, I. M. (2009). Characterization of rhamnolipids produced by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant strain grown on waste oils. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, *44*(13), 1367-1373. doi:10.1080/10934520903217138
- Rizi, M. S. S., Emtiazi, G., Sepahi, A. A., Maal, K. B., & Hosseini, F. (2017). Synergistic effect of nanoparticles and *Thalassospira* sp isolated from Bahregan area in biodegradation of oil sludge. *Petroleum Science and Technology*, *35*(9), 831-838. doi:10.1080/10916466.2016.1278386
- Robert, M., Mercade, M. E., Bosch, M. P., Parra, J. L., Espuny, M. J., Manresa, M. A., & Guinea, J. (1989). Effect of the Carbon Source on Biosurfactant Production by *Pseudomonas-Aeruginosa* 44t1. *Biotechnology Letters*, *11*(12), 871-874. doi:10.1007/Bf01026843

- Rosales-Hoz, L., & Carranza-Edwards, A. (1998). Heavy metals in sediments from Coatzacoalcos River, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol*, 60(4), 553-561.
- Rosas-Galván, N. S. (2011). *Estudio de la producción de biosurfactantes por cepas de Serratia marcescens*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Tesis de Maestría,
- Rosas-Galvan, N. S., Martinez-Morales, F., Marquina-Bahena, S., Tinoco-Valencia, R., Serrano-Carreón, L., Bertrand, B., . . . Trejo-Hernandez, M. R. (2018). Improved production, purification, and characterization of biosurfactants produced by *Serratia marcescens* SM3 and its isogenic SMRG-5 strain. *Biotechnol Appl Biochem*, 65(5), 690-700. doi:10.1002/bab.1652
- Rufino, R. D., Sarubbo, L. A., & Campos-Takaki, G. M. (2007). Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 23(5), 729-734. doi:10.1007/s11274-006-9278-2
- Saharan, B. S., Sahu, R. K., & Sharma, D. (2011). A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives. *Genetic Engineering & Biotechnology Journal*, 2011, 1-14.
- Sakthipriya, N., Doble, M., & Sangwai, J. S. (2015a). Action of biosurfactant producing thermophilic *Bacillus subtilis* on waxy crude oil and long chain paraffins. *International biodeterioration & biodegradation*, 105, 168-177. doi:10.1016/j.ibiod.2015.09.004
- Sakthipriya, N., Doble, M., & Sangwai, J. S. (2015b). Biosurfactant from *Pseudomonas* species with waxes as carbon source - Their production, modeling and properties. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 31, 100-111. doi:10.1016/j.jiec.2015.06.013
- Santa Anna, L. M., Sebastian, G. V., Pereira, N., Jr., Alves, T. L., Menezes, E. P., & Freire, D. M. (2001). Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *Appl Biochem Biotechnol*, 91-93, 459-467.
- Santos, A., Sampaio, A., Vasquez, G., Santa Anna, L., Pereira, N., Jr., & Freire, D. G. (2002). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98-100(1-9), 1025-1035. doi:10.1385/abab:98-100:1-9:1025

- Santos, D. K., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *Int J Mol Sci*, 17(3). doi:10.3390/ijms17030401
- Sarubbo, L. A., Marcal, M. D., Neves, M. L. C., Silva, M. D. C., Porto, A. L. F., & Campos-Takaki, G. M. (2001). Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 95(1), 59-67. doi:10.1385/Abab:95:1:59
- Satpute, S. K., Banat, I. M., Dhakephalkar, P. K., Banpurkar, A. G., & Chopade, B. A. (2010). Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnology Advances*, 28(4), 436-450. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.02.006
- Schifter, I., Sanchez-Reyna, G., Gonzalez-Macias, C., Salazar-Coria, L., & Gonzalez-Lozano, C. (2017). Fluorescence characteristics in the deep waters of South Gulf of Mexico. *Mar Pollut Bull*, 123(1-2), 165-174. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.09.001
- Seghal Kiran, G., Anto Thomas, T., Selvin, J., Sabarathnam, B., & Lipton, A. P. (2010). Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. *Bioresource Technology*, 101(7), 2389-2396. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.023
- Sen, R. (2008). Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(6), 714-724. doi:10.1016/j.peccs.2008.05.001
- SENER. (2012). Prospectiva del petróleo crudo 2012-2016. *Gobierno Federal*, 1-173.
- Silva Lopez, P. (2012). Consorcio para el desarrollo tecnológico e innovación de Pemex.
- Sivapathasekaran, C., Mukherjee, S., Ray, A., Gupta, A., & Sen, R. (2010). Artificial neural network modeling and genetic algorithm based medium optimization for the improved production of marine biosurfactant. *Bioresource Technology*, 101(8), 2884-2887. doi:10.1016/j.biortech.2009.09.093
- Sivapathasekaran, C., Mukherjee, S., Samanta, R., & Sen, R. (2009). High-performance liquid chromatography purification of biosurfactant isoforms produced by a marine bacterium. *Anal Bioanal Chem*, 395(3), 845-854. doi:10.1007/s00216-009-3023-2

- Sivapathasekaran, C., Mukherjee, S., & Sen, R. (2010). Biosurfactant production and growth kinetics of bacteria in a designer marine medium: improved physiochemical properties. *Biotechnol J*, 5(10), 1060-1068. doi:10.1002/biot.201000175
- Smyth, T. J. P., Perfumo, A., McClean, S., Marchant, R., & Banat*, I. M. (2010). Isolation and Analysis of Lipopeptides and High Molecular Weight Biosurfactants. In K. Timmis (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 3687-3704): Springer Berlin Heidelberg.
- Song, L., Ren, F., Huang, Y., Dai, X., & Zhou, Y. (2013). *Idiomarina indica* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63(Pt 7), 2497-2500. doi:10.1099/ijs.0.046789-0
- Stringer, R., Labunska, I., & Brigden, K. (2001). Organochlorine and heavy metal contaminants in the environment around the complejo petroquimicos Pajaritos, Coatzacoalcos, Mexico. *Greenpeace Research Laboratories, Department of Biological Sciences, University of Exeter, Exeter, UK.*, 60.
- Suthar, H., Hingurao, K., Desai, A., & Nerurkar, A. (2008). Evaluation of bioemulsifier mediated Microbial Enhanced Oil Recovery using sand pack column. *Journal of Microbiological Methods*, 75(2), 225-230. doi:10.1016/j.mimet.2008.06.007
- Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., & Banat, I. M. (2007). Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake. *Lett Appl Microbiol*, 45(6), 686-691. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02256.x
- Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., & Banat, I. M. (2008). Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24(7), 917-925. doi:10.1007/s11274-007-9609-y
- Weber, L., Döge, C., Haufe, G., Hommel, R., & Kleber, H.-P. (1992). Oxygenation of Hexadecane in the Biosynthesis of Cyclic Glycolipids in *Torulopsis Apicola*. *Biocatalysis*, 5(4), 267-272. doi:10.3109/10242429209014872
- White, D. A., Hird, L. C., & Ali, S. T. (2013). Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain PML026. *J Appl Microbiol*, 115(3), 744-755. doi:10.1111/jam.12287

- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr Opin Biotechnol*, *18*(3), 257-266. doi:S0958-1669(07)00055-9 [pii]
10.1016/j.copbio.2007.04.006
- Yonebayashi, H., Yoshida, S., Ono, K., & Enomoto, H. (2000). Screening of microorganisms for microbial enhanced oil recovery processes. *Sekiyu Gakkaishi-Journal of the Japan Petroleum Institute*, *43*(1), 59-69.
- Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J Microbiol Methods*, *56*(3), 339-347. doi:10.1016/j.mimet.2003.11.001
- Zheng, Y., Chen, X., & Shen, Y. (2008). Commodity chemicals derived from glycerol, an important biorefinery feedstock. *Chem Rev*, *108*(12), 5253-5277. doi:10.1021/cr068216s

Capítulo 14. Métodos analíticos

14.1 Actividad hemolítica

Los aislados se crecerán en placas de ANM como medio base, suplementadas con 5 % (v/v) de sangre incubadas a 28°C por 48 horas. La actividad hemolítica será detectada por la presencia de un halo claro alrededor de la colonia. El diámetro de las zonas claras depende de la concentración de biotensoactivo. (Carrillo et al., 1996; Youssef et al., 2004).

Observando los halos hemolíticos alrededor de las colonias se determina el tipo de hemólisis que posee:

α : lisis parcial de los glóbulos rojos. Se observa un halo de color verdoso alrededor de la colonia en estudio. Es debido a la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina (compuesto de color verdoso) por el peróxido de hidrógeno generado por los microorganismos.

β : (hemolisis completa) destruye por completo los eritrocitos. Se observa un halo claro, brillante alrededor de la colonia en estudio.

χ : ausencia de lisis de los glóbulos rojos. El medio de cultivo no presenta modificaciones de color y aspecto alrededor de la colonia en estudio.

14.2 Colapso de gota

Para este método se utilizan placa de poliestireno de 96 pozos, antes de usarse se lavan tres veces con agua destilada caliente, posteriormente etanol y finalmente con agua destilada y se deja secar. Una vez que estén listas se utilizan tanto para los ensayos cualitativos y cuantitativos.

Para la prueba cualitativa, se añade 1.8 μ L de aceite Castrol 10W-40 en un pocillo de una placa de Elisa. Esta se equilibra por 24 horas a temperatura ambiente para asegurar la uniformidad del aceite. Para la prueba cuantitativa, se añaden 2 μ L de aceite mineral y se deja equilibrar por dos horas.

Para ambas pruebas se coloca una alícuota de 5 μ L de sobrenadante del medio de cultivo libre de células la superficie del aceite con una jeringa Hamilton de 25 μ L. La jeringa se lava tres

veces con agua y una con acetona. Para la prueba cualitativa la forma de la gota se inspecciona después de 1 min, la forma plana o difusa indica la presencia del biotensoactivo mientras que las gotas redondeadas se evalúan como negativos indicando la falta de producción del tensioactivo (Rosas-Galván, 2011; Youssef et al., 2004). Para la prueba cuantitativa se prepara una curva de calibración con SDS a diferentes concentraciones.

La observación de esta prueba se realizó en un microscopio estereoscópico marca Leica a una magnificación de 12.5X.

Para la prueba cualitativa se prepararon diferentes concentraciones de SDS (0, 1, 2, 3, 4 y 5 mM), Bodour (1998) reporta hasta concentraciones de 8 mM en la realización de esta curva de calibración, en las pruebas que se realizaron en el laboratorio encontramos que la concentración de 6 mM en pocos segundos la gota se colapsa por lo que se descartó para la realización de esta curva. Además de hizo un ajuste en volumen depositado de 5 a 3 μ L de solución.

En la figura 14 se muestran los incrementos de volumen de esta curva de calibración donde en la primer figura se muestra como control al agua destilada.



Figura 14. Imágenes de la curva de calibración por la prueba de gota en aceite.

En la figura 15 se muestra la curva de calibración obtenida, se observa que 3 μ L forman una gota bien definida de 2.4 mm y conforme incrementa la concentración de SDS se va expandiendo hasta 3.5 mm de diámetro.

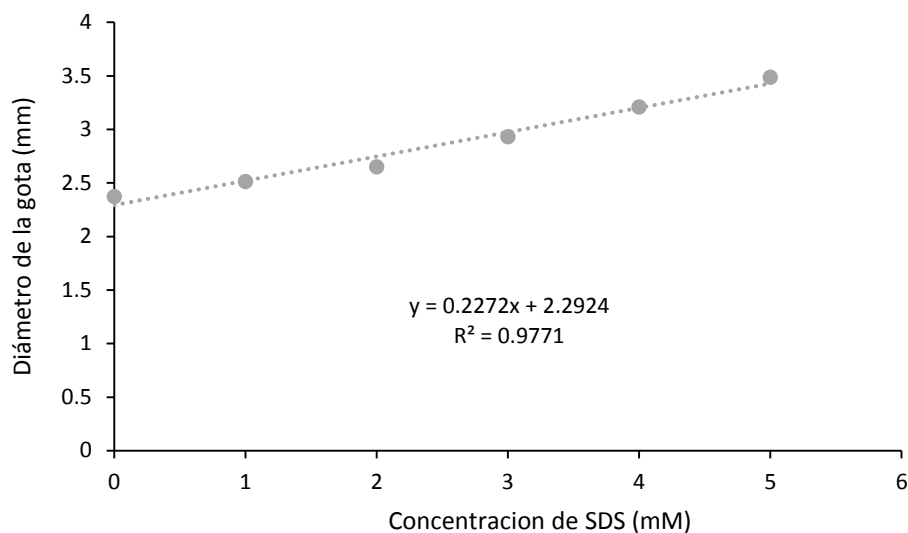


Figura 15. Curva de calibración de SDS en la prueba de gota de aceite.

14.3 Difusión de aceite

Para esta técnica se añaden 50 mL de agua destilada en una caja de Petri de 25 cm de diámetro, seguido de la adición de 20 μL de petróleo crudo a la superficie del agua. 10 μL de sobrenadante se añaden a la superficie del aceite. El diámetro de la zona clara sobre la superficie del aceite se mide y se relaciona con la concentración del biosurfactante mediante el uso de una curva estándar preparada con un biotensioactivo disponible comercialmente, a concentraciones que varían de 50 a 2000 mg L^{-1} . Se determinarán los diámetros de muestras por triplicado.

14.4 Tensión superficial

Esta se mide por el método del anillo de Du Nouy, para las cepas que muestren tanto resultados positivos como negativos con cualquiera de los tres métodos anteriores. El agua destilada e isopropanol se utilizan como estándares. Para la realización de esta técnica utilizan 2 mL del sobrenadante previamente equilibrados durante 15 min en una caja de Petri pequeña antes de realizar la medición por triplicado (Rosas-Galván, 2011; White et al., 2013; Youssef et al., 2004).

14.5 Índice de emulsión

Esta prueba consiste en formar una mezcla homogénea de dos líquidos inmiscibles, en este caso el agua que contiene al dispersante (biosurfactante), y un líquido que es dispersado

(diáfano), estos líquidos son mezclados para formar una emulsión y poder ser medida. Para formar esta mezcla se prepara una solución de en un tubo de ensaye de 16X150 mm conteniendo 6 mL de diáfano y 4 mL de sobrenadante de un cultivo libre de células. La solución se mezcla vigorosamente en un vortex durante 60 segundos. La emulsión es medida 24 h después de haber preparado la mezcla según la formula siguiente:

$$E_{24} = \frac{\text{altura de la zona emulsionada}}{\text{altura del líquido total}}$$



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 10 Marzo 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dr. Luis Caspeta Guadarrama
Dr. Fernando Martínez Morales
Dr. Leobardo Serrano Carreón
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Hugo Albeiro Saldarriaga Noreña

Tesis: "Prospección de microorganismos marinos productores de biosurfactantes provenientes de columna de agua y sedimentos del Golfo de México"

Alumno que la presenta a revisión: **DANIEL MORALES GUZMAN**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MARIA DEL REFUGIO TREJO HERNANDEZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 10 MARZO 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dr. Luis Caspeta Guadarrama
Dr. Fernando Martínez Morales
Dr. Leobardo Serrano Carreón
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Hugo Albeiro Saldarriaga Noreña

Tesis: "Prospección de microorganismos marinos productores de biosurfactantes provenientes de columna de agua y sedimentos del Golfo de México"

Alumno que la presenta a revisión: **DANIEL MORALES GUZMAN**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 10 marzo 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dr. Luis Caspeta Guadarrama
Dr. Fernando Martínez Morales
Dr. Leobardo Serrano Carreón
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Hugo Albeiro Saldarriaga Noreña

Tesis: "Prospección de microorganismos marinos productores de biosurfactantes provenientes de columna de agua y sedimentos del Golfo de México"

Alumno que la presenta a revisión: **DANIEL MORALES GUZMAN**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. LUIS CASPETA GUADARRAMA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 10 de Marzo 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dr. Luis Caspeta Guadarrama
Dr. Fernando Martínez Morales
Dr. Leobardo Serrano Carreón
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Hugo Albeiro Saldarriaga Noreña

Tesis: "Prospección de microorganismos marinos productores de biosurfactantes provenientes de columna de agua y sedimentos del Golfo de México"

Alumno que la presenta a revisión: **DANIEL MORALES GUZMAN**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. FERNANDO MARTINEZ MORALES



**Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología**



Cuernavaca, Morelos a 10/03/2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dr. Luis Caspeta Guadarrama
Dr. Fernando Martínez Morales
Dr. Leobardo Serrano Carreón
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Hugo Albeiro Saldarriaga Noreña

Tesis: "Prospección de microorganismos marinos productores de biosurfactantes provenientes de columna de agua y sedimentos del Golfo de México"

Alumno que la presenta a revisión: **DANIEL MORALES GUZMAN**

Programa: **DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. LEOBARDO SERRANO CARREON



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 10 de Marzo de 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dr. Luis Caspeta Guadarrama
Dr. Fernando Martínez Morales
Dr. Leobardo Serrano Carreón
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Hugo Albeiro Saldarriaga Noreña

Tesis: "Prospección de microorganismos marinos productores de biosurfactantes provenientes de columna de agua y sedimentos del Golfo de México"

Alumno que la presenta a revisión: **DANIEL MORALES GUZMAN**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 10 DE Marzo 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dr. Luis Caspeta Guadarrama
Dr. Fernando Martínez Morales
Dr. Leobardo Serrano Carreón
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Hugo Albeiro Saldarriaga Noreña

Tesis: "Prospección de microorganismos marinos productores de biosurfactantes provenientes de columna de agua y sedimentos del Golfo de México"

Alumno que la presenta a revisión: **DANIEL MORALES GUZMAN**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. HUGO ALBEIRO SALDARRIAGA NOREÑA