

2020
Evaluación de la relación C/N y concentración de NaCl en la biosíntesis de biotensoactivos producidos por *Bacillus cereus* para su uso en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos

QFB. Ana Lilia Corona Machuca



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química



Evaluación de la relación C/N y concentración de NaCl en la biosíntesis de biotensoactivos producidos por *Bacillus cereus* para su uso en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta:

Q.F.B. Ana Lilia Corona Machuca

Dirigido por:

Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez

Co-Director:

Dra. Evelyn Zamudio Pérez

Querétaro, Querétaro a noviembre 2020



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental



Evaluación de la relación C/N y concentración de NaCl en la biosíntesis de biotensoactivos producidos por *Bacillus cereus* para su uso en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta:

Q.F.B Ana Lilia Corona Machuca

Dirigido por:

Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez

Co-dirigido por:

Dra. Evelyn Zamudio Pérez

Dr. Aldo Amaro Reyes

Presidente

Dr. Arturo Abreu Corona

Secretario

Dr. Víctor Pérez Moreno

Vocal

“La ciencia no sabe de países, porque el conocimiento le pertenece a la humanidad y es la antorcha que ilumina el mundo. La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de todo progreso”.

Luis Pasteur

A mis pilares y ejemplos de vida

Hugo y Guille

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo incondicional, por ser un ejemplo de vida, respetar mis decisiones y nunca dejarme sola.

Al Dr. Jorge Gracida por aceptarme como su alumna, por los consejos y enseñanzas brindadas durante la maestría.

A la Dra. Evelyn Zamudio, por la atención brindada durante todo mi proyecto.

Al resto de mi comité evaluador el Dr. Aldo Amaro, Dr. Arturo Abreu y el Dr. Víctor Pérez por sus comentarios y sugerencias en el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos de la maestría, a Estefanía, Alan y Lina, por ser mi familia estos dos años y siempre sacarme una sonrisa.

A todos mis compañeros de la planta piloto de biotecnología.

A la M. en C. Aline López, por ayudarme y guiarme durante el desarrollo de mi trabajo, además de ser una gran amiga.

A la Dra. Teresita Arredondo por su apoyo en el proceso experimental de mi proyecto.

Al Ing. Ricardo Juárez.

Al resto de mis amigos que han sido un apoyo incondicional en mi vida.

A la Universidad Autónoma de Querétaro

A la Facultad de Química

A la Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	VII
RESUMEN	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Tensoactivos y biotensoactivos	2
2.1.1. Clasificación de biotensoactivos.....	6
2.2. Microorganismos productores de biotensoactivos	10
2.3. <i>Bacillus cereus</i>	13
2.4. Síntesis y producción de biotensoactivos	14
2.5. Aplicación de biotensoactivos	17
2.5.1. Aplicación de BT en la industria del petróleo.....	18
2.6. Suelo	21
2.7. Técnicas de remediación	23
2.7.1. Biorremediación.....	25
3. JUSTIFICACIÓN.....	30
4. HIPÓTESIS	31
5. OBJETIVOS	32
5.1. Objetivo general.....	32
5.2. Objetivos específicos	32
6. METODOLOGÍA.....	33
6.1. Preparación del medio de cultivo y activación de <i>Bacillus cereus</i>	33
6.2. Preparación del pre inóculo	33
6.3. Evaluación de la FC sobre la TS en el medio de cultivo	33
6.4. Evaluación de la concentración de NaCl sobre la TS en el medio de cultivo	34
6.5. Evaluación de la relación C/N sobre la TS el medio de cultivo	35
6.6. Métodos analíticos para evaluar la TS y E ₂₄ en el sobrenadante.....	35
6.6.1. Obtención del sobrenadante y recuperación de la biomasa	35

6.6.2. Determinación de la TS por el método de anillo de DuNouy en el sobrenadante	35
6.6.3. Evaluación del índice de emulsificación (E_{24})	35
6.7. Remoción de HCs por medio de la técnica de lavado de suelos	36
6.7.1. Intemperización de suelo sintético	36
6.7.2. Lavado de suelos	36
6.7.3. Determinación de HTP en suelo después de ser lavado	37
6.9.4. Cromatografía en capa fina	38
6.10. Análisis estadístico	39
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES	40
7.1. Evaluación de la FC sobre la síntesis de BT	40
7.2. Efecto de la concentración de NaCl sobre la TS en el medio de cultivo	43
7.3. Efecto de la relación C/N sobre la TS en el medio de cultivo	47
7.4. Índice de emulsificación (E_{24})	49
7.5. Lavado de suelos contaminados y determinación de HTP	57
7.5.1. Cromatografía en capa fina	59
8. CONCLUSIONES	61
9. REFERENCIAS	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales BT y sus microorganismos productores (Dell'Anno et al.,2018).	10
Cuadro 2. Clasificación de microorganismos halófilos en función a la salinidad (Ramírez et al.,2006).....	17
Cuadro 3. Aplicaciones de BT en la industria petrolera.....	20
Cuadro 4. Técnicas de remediación en suelo contaminado (Souza et al., 2014; EPA, 2006).....	23
Cuadro 5. Variación del tipo y concentración de FC	34
Cuadro 6. Efecto sobre la TS al variar las FC y sus concentraciones.....	42
Cuadro 7.Efecto sobre la TS variando la concentración de NaCl y usando diferentes FC.....	45
Cuadro 8. Efecto del BT producido sobre la TS variando la relación C/N.	48
Cuadro 9. Efecto de la concentración de NaCl sobre el E ₂₄ variando la FC y la concentración de NaCl	51
Cuadro 10. Efecto de la relación C/N sobre el E ₂₄ empleando una FC y dos concentraciones de NaCl	54
Cuadro 11. Remoción de HCs mediante la técnica de lavado de suelo empleando tres soluciones de lavado.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. a) Estructura general de los TA; b) ejemplo de un TA aniónico (SDS)	2
Figura 2 Formación de micelas al alcanzar la CMC	3
Figura 3. Estructura de TA; a) dodecil sulfato de sodio; b) cloruro de benzalconio; c) betaínas; d) octil glucosido	5
Figura 4. Estructura química de glicolípidos. a) ramnolípidos (mono-ramnolípidos); b) trehalosas (di-ramnolípidos); c) sorolípidos	7
Figura 5. Estructura química de la fosfatidiletanolamina perteneciente a la familia de los fosfolípidos.....	8
Figura 6. Estructura química de la surfactina sintetizada por <i>Bacillus subtilis</i>	8
Figura 7. Estructura química del BT emulsan (Jiménez et al., 2009)	9
Figura 8. Estructura general de a) surfactina y b) fengicina y c) iturina, lipopéptidos producidos por el género <i>Bacillus</i>	12
Figura 9. Tomas clandestinas de HCs en el territorio mexicano en 2018	20
Figura 10. Efecto de BT sobre un suelo contaminado con HCs	22
Figura 11. Efecto de los BS en la biodegradación de contaminantes en suelo.	26
Figura 12. Proceso de intemperización de un suelo sintético a diferentes concentraciones y el lavado del mismo con dos soluciones de lavado.	37
Figura 13. Influencia de diferentes FC en el medio de cultivo sobre la TS variando sus concentraciones para la producción de BT	43
Figura 14. Crecimiento de <i>Bacillus cereus</i> para la producción de BT variando la FC y la concentración de NaCl.....	46
Figura 15. Efecto que tiene el NaCl al ser modificadas sus concentraciones en la actividad y síntesis del BT sobre la TS.....	47
Figura 16. Efecto de la relación C/N en la síntesis de BT sobre la TS, usando solo una FC y dos concentraciones de NaCl	48
Figura 17. Crecimiento de la cepa <i>Bacillus cereus</i> empleando la relación C/N 12:1, usando una FC (petróleo).....	49
Figura 18. Comparación y evaluación de E ₂₄ en diferentes FC, variando los HCs para observar el proceso de emulsión. a) cloroformo, b) xileno, c) queroseno	52

Figura 19. Evaluación y comparación de E ₂₄ entre los diferentes HCs sobre el BT sintetizado.	54
Figura 20. Efecto del BT sobre el E ₂₄ modificando la relación C/N para observar su capacidad emulsionante. a) cloroformo; b) xileno; c) queroseno	55
Figura 21. Evaluación y comparación de E ₂₄ entre los diferentes HCs sobre el BT sintetizado modificando la relación C/N con a) 2.0 y b) 5.0 % de NaCl.....	57
Figura 22. Sistema de extracción por el método Soxhlet para la remoción de HTP..	58
Figura 23. Porcentaje de remoción de HCs, de dos suelos contaminados empleando tres soluciones de lavado diferentes.....	60
Figura 24. Cromatografía en capa fina a las soluciones de lavado después del lavado de suelo para comprobar si hubo remoción de HCs.....	60

ABREVIATURAS Y SIGLAS

HCs	Hidrocarburos
BT	Biotensoactivos
TA	Tensoactivos
TS	Tensión superficial
TI	Tensión interfacial
CMC	Concentración micelar crítica
mN/m	Milínewton por metro
FC	Fuente de carbon
HTP	Hidrocarburos totales de petróleo
E ₂₄	Índice de emulsificación
H	Horas
mgL ⁻¹	Miligramos por litro
rpm	Revoluciones por minuto
MEOR	Recuperación mejorada de petróleo por microorganismos
EOR	Recuperación mejorada de petróleo
CEOR	Recuperación mejorada de petróleo por procesos químicos
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
P	Fósforo
N	Nitrógeno
CO ₂	Dióxido de carbono
NaCl	Cloruro de sodio
p/v	Peso/volumen
v/v	Volumen/volumen
AM	Agar marino
CM	Caldo marino
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
mM	Milimolar

SDS	Dodecil sulfato de sodio
°C	Grados Celsius
μL	Microlitros
nm	Nanómetros
gL ⁻¹	Gramos por litro
mL	Mililitros
C/N	Carbono/nitrógeno
K _{La}	Coficiente volumétrico de transferencia de oxígeno
ppm	Partes por millón
ANOVA	Análisis de varianza

Dirección General de Bibliotecas UAQ

RESUMEN

En México las actividades derivadas con el petróleo han provocado una severa contaminación en suelo, por tal motivo se requieren de técnicas para su remediación. Se han buscado alternativas biológicas, algunas de ellas empleando biotensoactivos, sintetizados a partir de una variedad de microorganismos. Estos poseen la capacidad de disminuir la tensión superficial (TS) del medio en el que se encuentra y hacer biodisponible al contaminante para su remoción y/o degradación. El objetivo del presente trabajo fue sintetizar un BT a partir de una cepa de *Bacillus cereus* variando algunos parámetros como la concentración de NaCl, y la relación C/N para emplearlo en la remoción de hidrocarburos en suelos contaminados por medio de la técnica de lavado de suelos. *Bacillus cereus* fue aislada de un suelo salino en Zapotitlán Salinas Puebla, fue crecida en tres fuentes de carbono (petróleo, glucosa y glicerol) en un medio marino observando la disminución de la TS en el sobrenadante del cultivo. Las condiciones de la fuente de carbono seleccionadas se probaron variando la concentración de NaCl, y relación C/N. Una vez sintetizado el biotensoactivo, se usó el sobrenadante obtenido del cultivo y se empleó como solución de lavado en dos suelos contaminados con petróleo (3,200 ppm y 10,000 ppm), comparándolo con un tensoactivo sintético (Tween 20) y agua. Al usar petróleo como fuente de carbono (0.6 %) y 2.0 % de NaCl en el medio de cultivo se logró la mejor actividad del BT al obtener una TS 41.4 ± 1.3 mN/m y un índice de emulsificación 78.4 %, posteriormente se evaluó la relación C/N con los parámetros previamente seleccionados, en donde la relación 12:1 mostró una mayor disminución de la TS de 49.2 ± 1.8 mN/m y un índice de emulsificación de 57.7 %. El sobrenadante que contenía el BT logró una remoción en dos suelos contaminados (3,200 ppm y 10,000 ppm) del 59.8 ± 6.3 % y 64.5 ± 7.4 %, en donde se obtuvo un 20 % más de remoción comparado con el tensoactivo sintético (Tween 20).

Palabras clave: Contaminación de suelos, hidrocarburos, biotensoactivo, *Bacillus cereus*, biorremediación de suelos, lavado de suelos.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento

ABSTRACT

In Mexico, activities derived from oil have caused severe soil contamination and their remediation is required. Biological alternatives, such as biotensioactive (BT), synthesized from a variety of microorganisms have been sought. They can decrease the surface tension (ST) of the medium in which it is found and make the contaminant bioavailable for its removal. The objective of the present work was removal of total petroleum hydrocarbons (TPH) through soil washing, using a BT produced by *Bacillus cereus* modifying the carbon source, NaCl concentration and C/N ratio. A strain of *Bacillus cereus* was isolated in a saline soil, where the carbon source was modified in the culture media (oil, glucose and glycerol), later the effect of NaCl concentration and C/N ratio over ST was assayed using the carbon source showing the minimum ST. The washing capacity of the culture supernatant was tested in two contaminated soils with oil (3,200 and 10,000 ppm) compared with a synthetic surfactant and water. It was possible to obtain a decrease in surface tension of 41.4 ± 1.3 mN/m and an emulsification index of 78.4 % using oil at 0.6 % and 2.0 % NaCl in the culture media, showed the best efficiency in the synthesis of BT. The C/N ratio was evaluated with the previously selected parameters and the 12:1 ratio on the culture media, showed a surface tension of 49.2 ± 1.8 mN/m and an emulsification index of 57.7 %. The removal oil of approximately 60 % in the contaminated soils (3,200 and 10,000 ppm) was achieved using the supernatant that contained the biotensioactive agents, 20 % more than the synthetic surfactant (Tween 20). *Bacillus cereus* was shown to have the capacity to produce biotensioactives when its parameters were modified in the culture medium. Biotensioactive generated also demonstrated its efficiency in the removal of hydrocarbons.

Key words: Soil contamination, hydrocarbons, biotensioactive, *Bacillus cereus*, bioremediation of soils, soil washing.

1.INTRODUCCIÓN

El suelo es uno de los recursos naturales más vulnerables debido a que gran parte de las actividades antropogénicas se desarrollan en él, lo cual provoca daños de manera deliberada o inadvertida. En los últimos años ha aumentado el interés en evaluar la calidad y la salud del suelo debido a que es un componente fundamental de la biósfera, en el cual se obtienen alimentos, insumos para la industria y recursos energéticos (Dellagnezze *et al.*, 2014; Helmy *et al.*, 2015).

El petróleo y sus derivados han sido usados de manera intensiva tanto como fuente de energía, como de materia prima en diversas industrias (químicas y petroquímicas). Por otra parte, las actividades derivadas del petróleo como su transporte o recuperación, han determinado la aparición de diversas fuentes de contaminación, lo que conduce a la liberación de una gran cantidad de desechos de hidrocarburos (HCs) en el medio ambiente.

Para realizar la remediación de aquellos sitios contaminados con HCs, se han desarrollado técnicas con el objetivo de incrementar la vida útil de estos ecosistemas perjudicados. Estas técnicas en su mayoría son procesos fisicoquímicos, sin embargo, se han empleado técnicas biológicas como una alternativa ambiental (López *et al.*, 2009).

Los HCs poseen una escasa solubilidad que dificulta su biodegradación. La aplicación de técnicas biológicas como la biorremediación ayudan a la restauración de sitios contaminados de una forma amigable con el medio ambiente. Entre dichas técnicas de biorremediación, se encuentra el lavado de suelos donde se usan los biotensoactivos (BT), sintetizados por microorganismos aislados de distintos ambientes contaminados. Sus condiciones de crecimiento pueden ser modificadas con la finalidad de aumentar su capacidad para facilitar la biodegradación de HCs y ayudar a la disminución de la TS del medio líquido en el que se encuentran.

2. ANTECEDENTES

2.1. Tensoactivos y biotensoactivos

Los tensoactivos (TA) poseen diversas propiedades químicas proporcionando un gran número de aplicaciones debido a su capacidad detergente, emulsionante, humectante y solubilizante, de manera directa actúan sobre la superficie de los líquidos (Ali *et al.*, 2020).

Son moléculas anfipáticas que se caracterizan por tener en su estructura una parte polar hidrofílica (cabeza) y otra parte no polar hidrofóbica (cola) (Figura 1). Son capaces de disminuir la TS e interfacial (TI) de los líquidos aumentando la solubilidad de los compuestos orgánicos hidrofóbicos (Okoliegbe *et al.*, 2012). La zona no polar interactúa débilmente con las moléculas de agua en un ambiente acuoso, mientras que el grupo polar interactúa fuertemente con las moléculas de agua por medio de una interacción ion-dipolo, esta interacción hace que el TA sea soluble en agua (Ali *et al.*, 2020; Martín *et al.*, 2014).

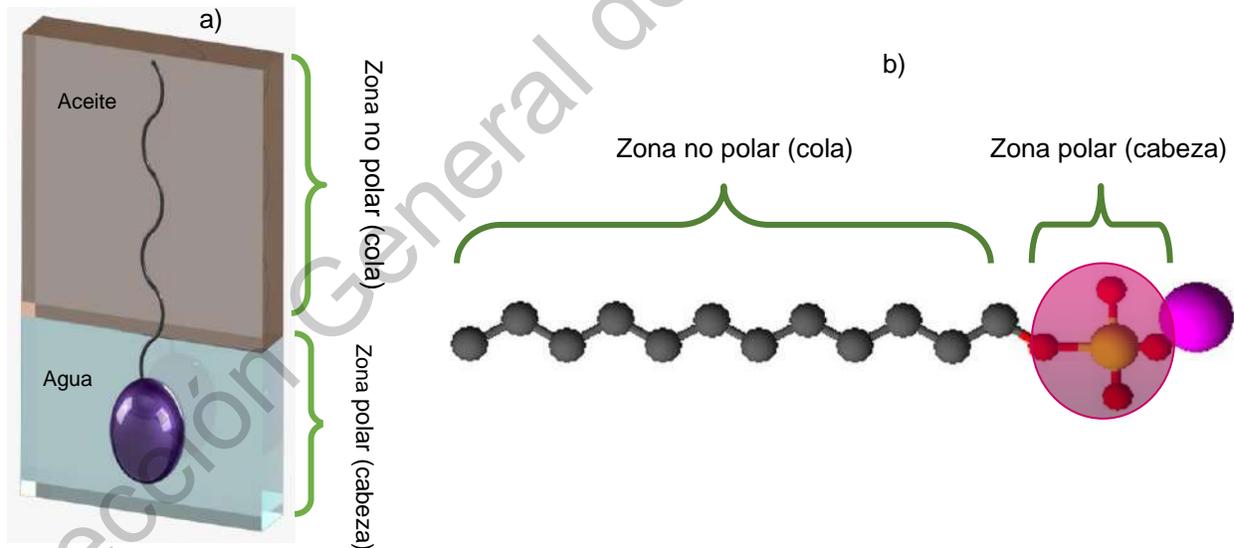


Figura 1. a) Estructura general de los TA; b) ejemplo de un TA aniónico (SDS)

Los TA poseen la capacidad de incrementar la solubilidad de compuestos orgánicos mejorando su biodisponibilidad hacia los microorganismos mediante la

reducción de la TS. Cuando la concentración del TA aumenta, los monómeros pasan a través de un proceso de agregación del solvente y el TA formando así las micelas. Estos agregados son formados debido a la reducción de contacto entre las cadenas de HCs y el medio, lo que disminuye la TS. Entre la micela, los grupos hidrofóbicos del TA se dirigen hacia el interior del agregado y los grupos polares se dirigen hacia el disolvente, unas de las acciones de las micelas es que permiten el movimiento de los solutos dentro de su núcleo creando así las emulsiones (Ali *et al.*, 2020; Dell'Anno *et al.*, 2018).

La TS tiene una relación con la concentración del TA una vez que se alcanza la concentración micelar crítica (CMC), la cual se define como la concentración mínima necesaria del TA para iniciar la formación de las primeras micelas (Figura 2). Así a menor concentración del TA empleada para la disminución de la TS éste será más eficiente (Bekfadu *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2016).

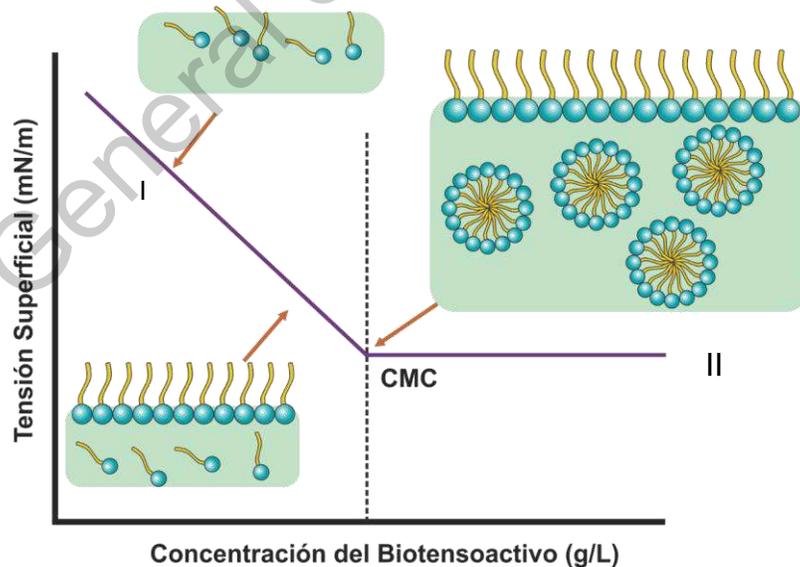
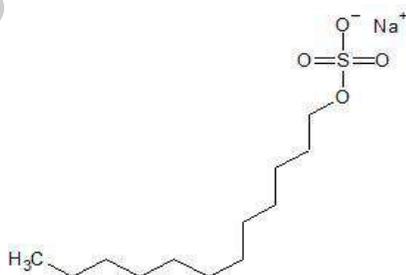


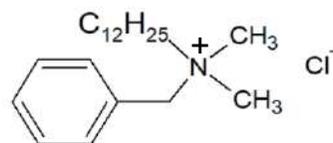
Figura 2 Formación de micelas al alcanzar la CMC; I) monómeros ingresando al medio acuoso; II) formación de las primeras micelas

La clasificación de los TA se basa en la naturaleza química de sus grupos hidrofílicos y en su poder de disociación. Pueden ser no iónicos, aniónicos, catiónicos y anfóteros (Figura 3).

- a) TA aniónicos: son los más empleados en la industria debido a su bajo costo de manufactura. Están constituidos por una cadena alquílica lineal, se ionizan en solución, en donde la parte hidrófoba queda con carga positiva. Los más comunes son carboxilatos, sulfatos y sulfonatos como el dodecil sulfato de sodio (SDS) (Figura 3a).
- b) TA catiónicos: generalmente son compuestos cuaternarios de amonio, y solubles en agua cuando hay solo un grupo alquilo de cadena larga. Son incompatibles con la mayor parte de los TA aniónicos, pero compatibles con los no iónicos (Figura 3b). Son insolubles en petróleo y dependiendo del medio en el que se encuentren son químicamente estables
- c) TA anfóteros: contienen grupos catiónicos y aniónicos en su estructura, el más común es el alquil dimetil betaína (Figura 3c). Son solubles en agua y muestran una gran compatibilidad con otros TA formando micelas. En medio básico son aniónicos y en medio ácido catiónicos.
- d) TA no iónicos: los más comunes son aquellos basados en óxido de etileno (TA etoxilados) (Figura 3d). Tienen la característica de no ionizarse en solución acuosa, puesto que poseen grupos hidrófilos (alcoholes), fenol, éter o amida (Siyal *et al.*, 2020).



a)



b)



Figura 3. Estructura de TA; a) dodecil sulfato de sodio; b) cloruro de benzalconio; c) betaínas; d) octil glucósido

Los TA comúnmente son usados en la industria agrícola, cosmética, farmacéutica, petroquímica etc., sin embargo, al ser de origen sintético pueden ser potencialmente tóxicos al medio ambiente debido a su baja biodegradabilidad y persistencia en la naturaleza (Nagwa *et al.*, 2014; Okoliegbe *et al.*, 2012).

Por lo tanto, la alternativa de usar TA biológicos ha incrementado el interés en el ámbito biotecnológico, los cuales pueden ser sintetizados por microorganismos, plantas o animales. En comparación con los sintéticos, tienen algunas ventajas como su baja o nula toxicidad, biodegradabilidad, capacidad de ser absorbidos por la interface, soportar altas temperaturas, salinidad, pH y poseer alta selectividad. A este tipo de sustancias se les conoce como BT (Dell'Anno *et al.*, 2018; Velázquez-Aradillas *et al.*, 2011; Plociniczak *et al.*, 2011).

Generalmente los BT son moléculas aniónicas o neutras, pero a algunos se les consideran como moléculas catiónicas con un grupo amina (Dell'Anno *et al.*, 2018). Algunas de las propiedades que caracterizan a los BT son su influencia en la reducción de la TS, formación de biopelículas, someterse a condiciones ambientales extremas como pH, ambientes salinos y tolerancia a compuestos iónicos (Karlapudi *et al.*, 2018).

Aquellos microorganismos capaces de sintetizar BT pueden ser localizados en ambientes con altas concentraciones de sal, variación en la temperatura y pH, zonas contaminadas etc. También es importante la

disponibilidad de nutrientes esenciales para realizar su metabolismo (Coutiño *et al.*, 2019).

Por tal motivo los BT son potencialmente usados en la remediación ambiental debido a que los organismos productores tienen la capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales extremas y tomarlos como factores de crecimiento para la síntesis de estos compuestos BT. En algunos casos los microorganismos que se encuentran de manera habitual ya sea en suelo o agua, son capaces de tomar los contaminantes como fuente de carbono (FC), tal es el caso de los suelos contaminados con hidrocarburos totales de petróleo (HTP). También se ha demostrado que los BT pueden estar en contacto con las pequeñas gotas de HCs ubicadas en poros del suelo o roca del reservorio facilitando así su remediación (Asadollahi *et al.*, 2016).

Sin embargo, se deben considerar las características del suelo, así como las características de los HCs. Aquellos de mayor peso molecular y menor solubilidad pueden adsorberse entre los microporos y ser inaccesibles como FC para los microorganismos (Riojas *et al.*, 2010).

2.1.1. Clasificación de biotensoactivos

Según Drakontis *et al.* (2020) y Henkel *et al.* (2019), la clasificación específica de los BT depende de su composición química, peso molecular, propiedades fisicoquímicas y su origen microbiano. Se clasifican en aquellos con bajo peso molecular, considerados eficientes para disminuir la TS y aquellos con alto peso molecular, los cuales son más efectivos estabilizando las emulsiones agua/aceite a continuación, se describen:

- 1) Glicolípidos: este grupo se subclasifica en soforolípidos, trehalosas y ramnosas (Figura 4) siendo los BT más comunes. Están formados por mono, di, tri y tetrasacáridos en combinación con una o más cadenas de ácidos alifáticos (Drakontis *et al.*, 2020).

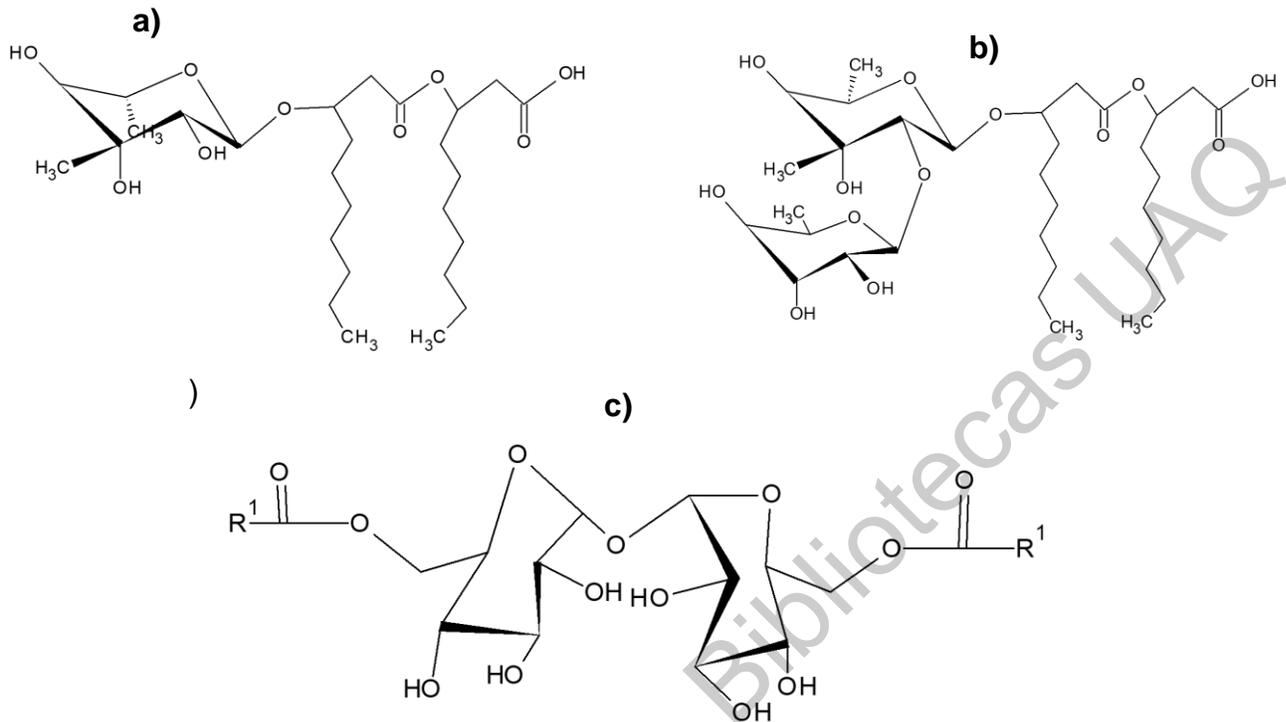


Figura 4. Estructura química de glicolípidos. a) ramnolípidos (mono-ramnolípidos); b) trehalosas (di-ramnolípidos); c) sorbitol (Jahan *et al.*, 2019)

2) Ácidos grasos: un gran número de bacterias y levaduras son capaces de producir este tipo de BT. Aquellos producidos a partir de alcanos (como resultado de oxidaciones microbianas) se han considerado como TA. Los microorganismos también producen ácidos grasos complejos que contienen grupos OH y ramas alquilo (ácidos corinomicólicos) (Henkel *et al.*, 2019).

3) Fosfolípidos: cuando ciertas bacterias o levaduras que degradan HCs se cultivan en sustratos de alcanos, el nivel de fosfolípidos aumenta enormemente. Son componentes importantes en las membranas microbianas (Figura 5), además son esenciales para aplicaciones médicas y se ha considerado su uso en procesos fermentativos (Santos *et al.*, 2016).

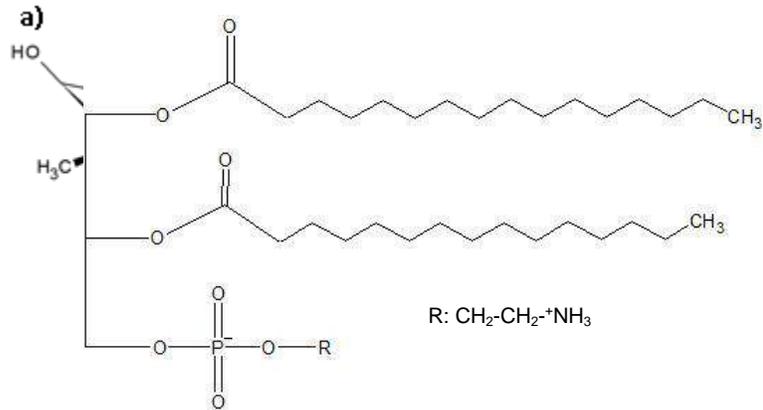


Figura 5. Estructura química de la fosfatidiletanolamina perteneciente a la familia de los fosfolípidos

- 4) Lipopéptidos: constituidos por una cadena cíclica sintetizados en su mayoría por varias especies de *Bacillus*, entre los más estudiados se encuentran las surfactinas producidas por *Bacillus subtilis* (Figura 6). Poseen notables propiedades de superficie activa y consisten en un lípido unido a una cadena polipeptídica (Banat *et al.*, 2010; Okolirgbe *et al.*, 2012).

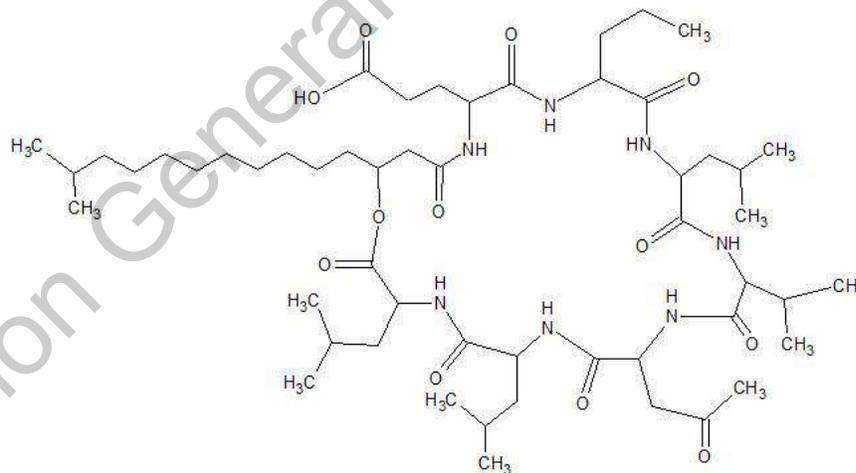


Figura 6. Estructura química de la surfactina sintetizada por *Bacillus subtilis*

- 5) BT poliméricos: tienen alto peso molecular, están compuestos por polisacáridos, proteínas, lipopolisacáridos, lipoproteínas o mezclas de estos polímeros; los BT poliméricos más estudiados son el emulsan sintetizado a partir *Acinetobacter* (Figura 7) y el liposan sintetizado por *Candida lipolytica* (Plociniczak *et al.*, 2011; Olasanmi *et al.*, 2018; Karlapudi *et al.*, 2018).

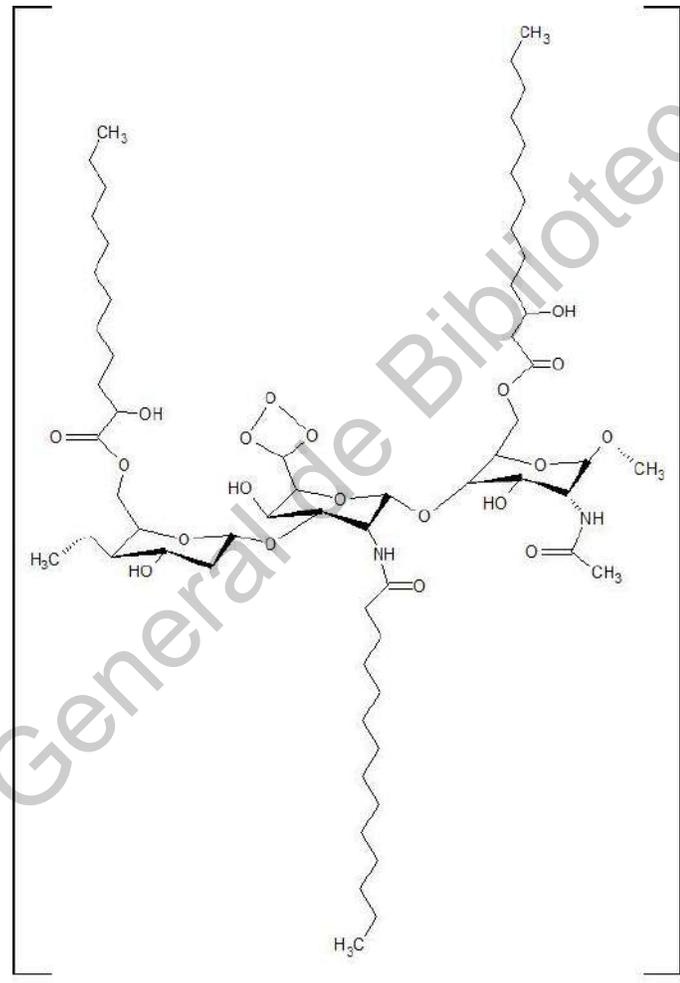


Figura 7. Estructura química del BT emulsan (Jiménez *et al.*, 2009)

2.2. Microorganismos productores de biotensoactivos

Varios microorganismos tienen la habilidad de producir dichos metabolitos bioactivos, conocidos como BT. Su actividad depende del microorganismo productor debido a que puede tener la capacidad de disminuir el área de superficie o puede actuar como emulsificador. Para llevar a cabo su síntesis requieren de una amplia variedad de nutrientes, así como diversas fuentes de energía (Jiménez *et al.*, 2009).

Los microorganismos productores de BT más conocidos y estudiados son *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Micrococcus* spp., *Rhodococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Mycobacteria* spp., *Modicocci* spp., *Acinetobacter* spp., etc., los cuales pueden degradar petróleo, disminuir la TS, y ejercer un efecto emulsificante. Este tipo de microorganismos han sido encontrados de manera ubicua en ambientes acuáticos y terrestres, soportando condiciones extremas como altas temperaturas, ambientes ácidos o hipersalinos, un ejemplo es *Pseudomonas aeruginosa* aislada de sitios en donde es capaz de soportar altas concentraciones de sal (Ghoreishi *et al.*, 2017; Satpute *et al.*, 2010, Sharma *et al.*, 2018). En el Cuadro 1 se muestra la clasificación de BT y los microorganismos que los producen de acuerdo a Dell'Anno *et al.* (2018).

Cuadro 1. Principales BT y microorganismos productores (Dell'Anno *et al.*, 2018).

BT	Tipo de biosurfactante	Microorganismo
Glicolípidos	Trealolípidos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Arthrobacter</i> sp. <i>Mycobacterium</i> sp.
	Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia rubidaea</i>
	Soporolípidos	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis. apicola</i> <i>Torulopsis petrophilum</i>
Lipopéptidos lipoproteínas	y Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus pumilus</i>

	Serrawettina	<i>Serratia marcescens</i>
	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Fengicina	<i>Bacillus</i> sp.
	Subtilosina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Gramicidinas	<i>Brevibacillus brevis</i>
	Polimixinas	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos grasos Fosfolípidos y lípidos neutros	Lípidos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i> <i>Corynebacterium</i>
	Fosfolípidos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
	Ácidos grasos	<i>Acinetobacter</i> sp <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp <i>Penicillium</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp.
Surfactantes poliméricos	Emulsan	<i>Arethrobacter cacoaceticus</i>

Algunos estudios han demostrado la efectividad de los BT producidos por microorganismos para remover HCs de suelos contaminados, en particular, se ha demostrado que los ramnolípidos son eficientes en la remoción de estos. Un ejemplo son los sintetizados a partir de *Pseudomonas aureginosa*, los cuales tienen un poder remoción hasta del 95.0 % de los HTP. En el caso de los surfactantes sintéticos como Tween 80 (50.0 mg/Kg) se ha demostrado la capacidad que tiene para hacer biodisponible el contaminante. Estos surfactantes han demostrado tener un porcentaje de remoción del 92.0 %, lo que sugiere que los BT son igual o más efectivos para su uso en la remediación (Lamichhane *et al.*, 2017).

Otro de los grupos de BT considerados de los más eficientes son los lipopéptidos, siendo *Aspergillus*, *Bacillus* y *Pseudomonas* los microorganismos que más los sintetizan. Dentro del género *Bacillus* existen especies que han demostrado ser buenas productoras de estos BT al demostrar gran capacidad para disminuir la TS como emulsificadores y ser empleados en procesos de biorremediación. Los BT sintetizados a partir de *Bacillus* se han clasificado en tres

categorías de acuerdo a sus propiedades, surfactinas, iturinas y fengicinas (Figura 8). Cabe mencionar que también han ocasionado gran interés debido a su potencial como agentes antimicrobianos (Geys *et al.*,2014; Dell'Anno *et al.*, 2018).

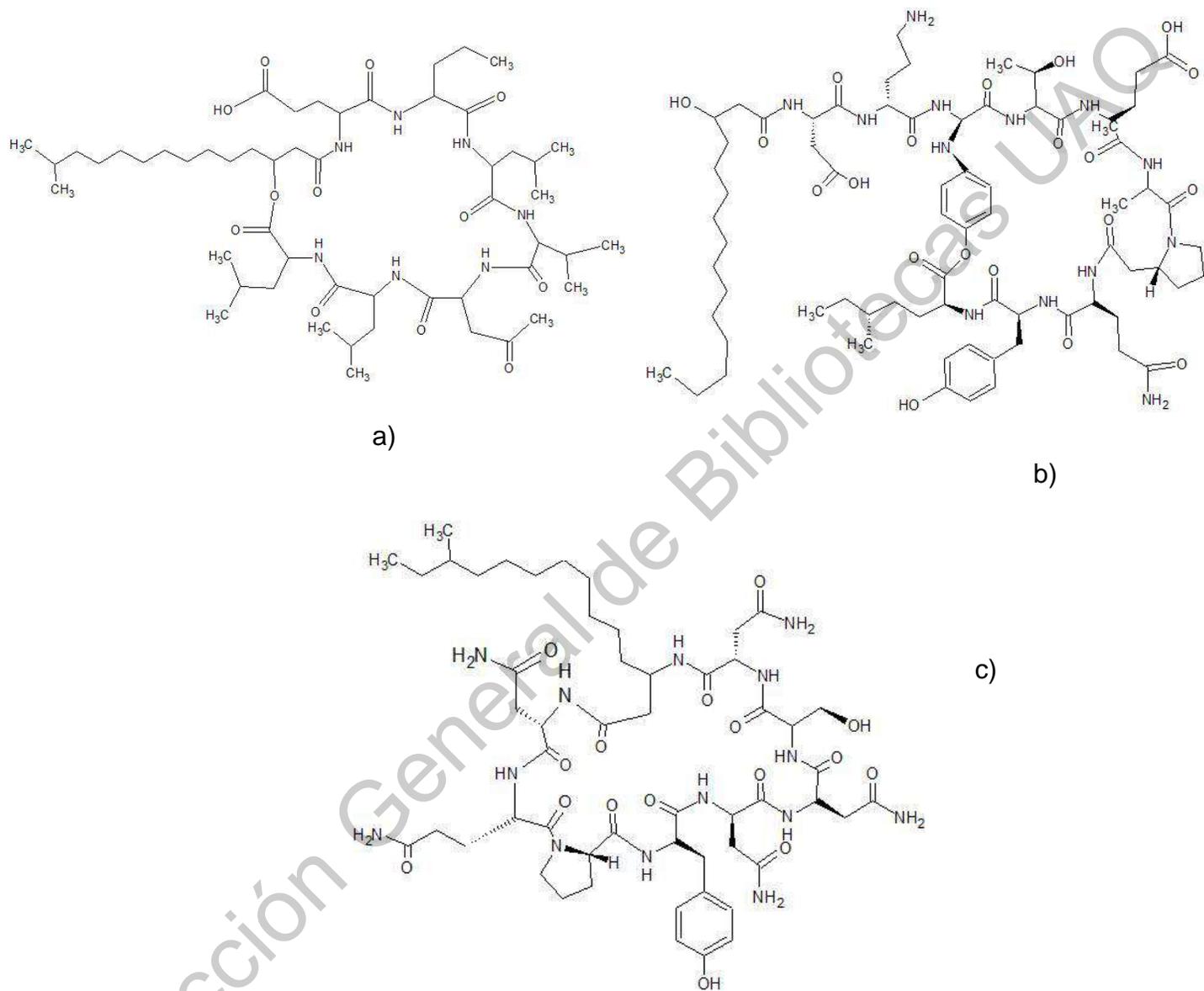


Figura 8. Estructura general de a) surfactina y b) fengicina y c) iturina, lipopéptidos producidos por el género *Bacillus* (Geys *et al.*,2014)

2.3. *Bacillus cereus*

El género *Bacillus* está conformado por una amplia variedad de especies aisladas de diversos sitios, tal es el caso de *Bacillus subtilis* que ha demostrado ser ubicua en diversos ecosistemas soportando diferentes condiciones a las que está sometida. Otra bacteria con características similares a *Bacillus subtilis* y que se ha podido aislar de sitios salinos, con altas temperaturas o contaminados con HCs es *Bacillus cereus* (Marollo 2016).

Bacillus cereus es una bacteria Gram-positiva, aeróbica o facultativa, esporulante que puede estar en el medio ambiente. Fenotípicamente, así como genéticamente, es muy similar a *Bacillus anthracis*, pero *Bacillus cereus* no se encuentra en forma de esporas en la naturaleza.

Bacillus cereus puede encontrarse en diferentes tipos de suelo y sedimentos, su reservorio natural consiste en materia orgánica en descomposición junto con ríos, agua de mar, fómites, vegetales y el intestino de algunos invertebrados. La cepa suele encontrarse en suelo por el proceso de germinación de sus esporas, los cuales entran en contacto con la materia orgánica, siendo capaces también de tomar algunos carbohidratos que se encuentren en su entorno para llevar a cabo su metabolización (Marollo 2016).

Por tal motivo, al ser una bacteria que puede encontrarse de forma ubicua en el suelo, así como sus géneros similares, se le ha considerado como una bacteria prometedora para su uso en el área ambiental.

En 2011 Velázquez-Aradillas *et al.* realizaron uno de los primeros estudios aislando *Bacillus cereus* de granos de café en un medio el cual tenía como suplemento cadmio donde se obtuvo una disminución de la TS de 72.0 a 52.0 mN/m.

Asadollahi *et al.* (2016) aislaron la cepa de *Bacillus cereus* de un suelo contaminado con petróleo, se cultivó en medio salino usando glucosa, melaza, sacarosa y queroseno como FC. Realizaron pruebas para medir la actividad biotensoactiva como el índice de emulsificación (E_{24}) y la medición de TS por medio del método anillo de DuNouy. Obtuvieron una disminución de la TS de 69.3 a 36.4 mN/m después de 48 h bajo condiciones óptimas (FC, agitación y

temperatura). El BT obtenido por *Bacillus cereus* redujo la TS de 72.0 a 30.2 mN/m y un CMC de 23.4 mgL⁻¹, concluyendo así la efectividad del BT.

2.4. Síntesis y producción de biotensoactivos

La comercialización de BT ha progresado gracias a la facilidad de conseguir los sustratos para su síntesis y el proceso de producción es más asequible. Son un punto de comparación con los TA químicos por lo que se han propuesto estrategias para hacer el proceso más rentable:

- 1) Desarrollar bioprocesos más eficientes, donde se busca la optimización en las condiciones de fermentación y el proceso separación y/o purificación.
- 2) Capacidad de emplear FC de bajo costo o de desecho.

Estas dos estrategias demuestran la importancia de las condiciones de producción como el uso diferentes sustratos para su síntesis (Banat *et al.*, 2010).

La producción de metabolitos secundarios a partir de microorganismos, recae en las condiciones y nutrientes disponibles en el medio. En el caso particular de los BT existe una amplia variedad de microorganismos productores (Cuadro 1), los cuales son capaces de sintetizar estos metabolitos secundarios una vez se encuentren en un medio de crecimiento adecuado (Saharan *et al.*, 2011).

Dependiendo de la naturaleza del microorganismo, las condiciones para su producción y crecimiento parten desde el tipo de fermentación adecuado para su proceso. Por lo que es importante que se realice la modificación de los diferentes parámetros para favorecer el crecimiento de microorganismo y poder realizar la síntesis del BT.

Uno de los parámetros más importantes es la FC, a partir de aquí el microorganismo tendrá el aporte energético necesario. Generalmente en la producción de BT, el carbono y nitrógeno son considerados como componentes mayoritarios en el medio de crecimiento (Geetha *et al.*, 2018).

FC: es un parámetro que influye en la síntesis del BT por inducción o represión. Se han empleado diversas FC como diésel, petróleo, glucosa, sacarosa, melaza, y aceite de cocina, entre otros, como sustratos adecuados en la producción de BT. Mouafo *et al.* (2018) probaron dos FC (melaza y glicerol) en cepas de *Lactobacillus* spp. en donde con melaza se obtuvieron mayores rendimientos en la disminución de la TS (47.5 mN/m) y E₂₄ (49.9 %). Sin embargo, eso no indica que todos los microorganismos tendrán el mismo comportamiento, cada cepa responde a diferentes concentraciones y FC (Okoliegbe *et al.*, 2012; Saharan *et al.*, 2011).

Fuente de nitrógeno: el nitrógeno es un nutriente importante en la producción de BT ya que es esencial en el crecimiento microbiano debido a que las proteínas y enzimas involucradas en el proceso, dependen de él. Diferentes compuestos químicos de nitrógeno son usados en la producción, como urea, peptona, nitrato de amonio, entre otros., pero el más usado y el que ha obtenido mejores rendimientos es el extracto de levadura (Okoliegbe *et al.*, 2012).

Abouseoud *et al.* (2008) probaron diferentes fuentes de nitrógeno (NH₄Cl, NaNO₃, NH₄NO₃) obteniendo una mayor producción de BT con NH₄NO₃ (2.2 gL⁻¹), así como una disminución de la TS de 30.0 mN/m y un E₂₄ mayor a 50.0 % (Okoliegbe *et al.*, 2012; Saharan *et al.*, 2011).

Para el rendimiento y obtención de un BT, deben considerarse los factores ambientales. Al existir un equilibrio adecuado entre el medio ambiente y el microorganismo éste será capaz de sobrevivir a ciertas condiciones ambientales y la probabilidad de que el bioproceso sea efectivo aumentará. Estas condiciones pueden ser pH, temperatura, concentración de sal y velocidad de agitación (Fakruddin *et al.*, 2012). Drakontis *et al.* (2020) determinaron que estos factores son determinantes, debido a que a pueden afectar el crecimiento y actividad celular de la bacteria para realizar una mayor producción del BT.

La temperatura juega un factor importante, se ha observado que la mayoría de BT han sido sintetizados en rangos de temperatura de 20-30 °C. Bhattacharya *et al.* (2018) demostraron el efecto bioemulsificante en dos cepas,

Ochrobactrum pseudintermedium y *Bacillus cereus* con el objetivo de remover HTP en suelo. Sometieron la cepa a temperaturas de incubación de 20 hasta 45 °C, obteniendo una mayor producción del metabolito a una temperatura de 30°C con un porcentaje de remoción del 70.3 % y un E₂₄ del 80.2 %. En el caso del pH es común que en estos bioprocesos sea modificado y depende mucho de las condiciones de donde fue aislado el microorganismo. Sin embargo, se ha reportado que los valores óptimos para la producción varían entre pH de 7 a 8 (Okoliegbe *et al.*, 2012).

Otro factor importante es la aireación y agitación, este proceso facilita la transferencia de oxígeno desde la fase gaseosa a la líquida conocida también como K_La. También puede estar relacionado con la función fisiológica del emulsionante microbiano, se ha sugerido que la producción de bioemulsionantes puede mejorar la solubilización de sustratos insolubles en agua y, en consecuencia, facilitar el transporte de nutrientes a los microorganismos. Su influencia en la síntesis de BT fue analizada en 2010 por Fontes *et al.*, ellos buscaron la mayor producción de un BT a partir de *Yarrowia lipolytica* modificando varios factores, entre ellos la velocidad de agitación. Modificaron los valores de 160 a 250 rpm, teniendo como resultado que entre mayor sea la agitación del medio, habrá mayor rendimiento del BT, esto lo demostraron midiendo la TS y el E₂₄, donde a 250 rpm obtuvieron una disminución de la TS de 14.3 mN/m y un E₂₄ de 38.9 %.

Se ha asimilado la producción de BT en ambientes moderados, sin embargo, existe la posibilidad de mantener al microorganismo en condiciones extremas para ver su capacidad de tolerancia, un caso en particular es la capacidad del microorganismo de sobrevivir en sitios con altas concentraciones de sal (Santos *et al.*, 2016).

La concentración de NaCl afecta la solubilidad relativa del BT, lo que provoca un cambio su coeficiente de partición. Existen microorganismos que pueden crecer en condiciones salinas debido a que son capaces de adaptarse al estrés osmótico, acumulando en su citoplasma compuestos de bajo peso molecular que mantienen el equilibrio osmótico y no interfieren en el metabolismo

celular. A estos compuestos se les denomina como solutos compatibles (comúnmente son aminoácidos, azúcares, y ectoína), estos microorganismos son clasificados dependiendo de la concentración de sal que son capaces de soportar (Cuadro 2) (Ramírez *et al.*, 2006). Se ha observado que para algunos BT el aumento en la concentración sal reduce la CMC (Díaz *et al.*,2002).

Cuadro 2. Clasificación de microorganismos halófilos en función a la salinidad (Ramírez *et al.*,2006).

Clasificación	Concentraciones de NaCl (p/v)
Halófilos extremos	Arriba de 20 %
Halófilos moderados	10 % – 20 %
Halófilos débiles	0.5 % - 10 %
Halotolerantes	A partir de 0.5 %

Con base en las investigaciones sobre la síntesis de BT y su capacidad de soportar la variación de diversos factores ambientales, se han considerado como compuestos viables para su uso en diversas áreas como médicas, ambientales o industriales (farmacéutica, cosmética, alimenticia, agrícola, petroquímica, etc.). En el caso del área ambiental es de gran interés por su capacidad biodegradable y no tóxica, por lo que se ha considerado como una herramienta importante en la biorremediación de sitios contaminados (Drakontis *et al.*, 2020).

2.5. Aplicación de biotensoactivos

Debido a las ventajas que poseen los BT sobre los TA sintéticos como su baja toxicidad, biodegradabilidad, efecto emulsificante, dispersante, humectante, entre otras, en las últimas dos décadas su demanda ha aumentado en diferentes ramas industriales como farmacéutica/médica, agrícola, cosmética, ambiental y petrolera (Feng Liu *et al.*, 2015).

Se espera que la aplicación de BT alcancen más de dos mil millones de dólares a lo largo del año 2020, para que sean usados en los procesos de recuperación mejorada de petróleo por microorganismos (MEOR), eliminación de

contaminantes (metales pesados, HCs), biorremediación, y la transición del uso de TA de origen sintético al biológico en el área industrial (Jahan *et al.*, 2019).

Una de las tantas aplicaciones prometedoras de los BT, es su aplicación en el tratamiento de suelo o agua debido a la contaminación ocasionada por HCs (petróleo, aceites, diésel etc.) ayudando a su la degradación por medio de diferentes técnicas de remediación.

2.5.1. Aplicación de biotensoactivos en la industria del petróleo

El petróleo, se considera como la principal fuente de energía usada para actividades humanas y es empleado como materia prima para la obtención de muchos compuestos (Gracida *et al.*, 2017). Al ser una mezcla compleja de varios HCs simples o complejos puede provocar riesgos ecológicos prevalentes debido a accidentes, causando efectos nocivos sobre todos en los organismos vivos (Karlapudi *et al.*, 2018).

De acuerdo a Ghoreishi *et al.* (2017), Varjani (2017) y Logeshwaran *et al.* (2018) el petróleo está clasificado en 4 fracciones:

- a) *Saturados*: son HCs con enlaces sencillos y representan el porcentaje más alto del petróleo crudo. Son clasificados de acuerdo a su estructura como parafinas y cicloparafinas.
- b) *Aromáticos*: poseen varios anillos aromáticos usualmente sustituidos por diferentes grupos alquilo.
- c) *Resinas y asfaltenos*: tienen estructuras carbonadas complejas y en su mayoría desconocidas con la adición de átomos de nitrógeno, azufre y oxígeno.
- d) *Insaturados*: son clasificados como alquenos, olefinas y alquilos, los cuales debido a la presencia de dobles enlaces es más difícil su degradación.

A los HTP se les conoce por ser de los contaminantes más perjudiciales; debido a que una vez estén en contacto con el suelo penetran a través de su capa superior. Con el paso del tiempo estos HCs llegan al subsuelo por medio de una infiltración en pozos o sumideros hasta llegar a aguas subterráneas, causando un alto riesgo de contaminación (Karlapudi *et al.*, 2018).

La contaminación en suelo y agua es una problemática mundial debido a que el 80 % de la población depende de ellos ya que son portadores para la obtención de productos humanos (agua y alimento). Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son cancerígenos, citotóxicos, genotóxicos y tóxicos por lo que su dispersión en el ambiente afecta la vida humana, vegetal y animal (Al-Hawash *et al.*, 2018; Logeshwaran *et al.*, 2018).

Estos contaminantes al ser en mayoría compuestos orgánicos hidrófobos, persisten en la matriz del suelo por su incapacidad de solubilizarse en agua ocasionando su dispersión y penetración dentro de la matriz. Lo que genera que estos HCs tengan un gran impacto de destrucción, afectando las propiedades físicas, fisiológicas y bioquímicas del suelo (Souza *et al.*, 2014; Ghoreishi *et al.*, 2017; ATSDR, 2016; Plociniczak *et al.*, 2011).

México es uno de los países productores de petróleo más importante, así como sus derivados. En el año 2018 se reportaron 12,581 tomas clandestinas en todo el país derivadas de la toma ilegal de combustible, provocando en su mayoría derrames de HCs en el suelo (Figura 9) (PEMEX, 2018).

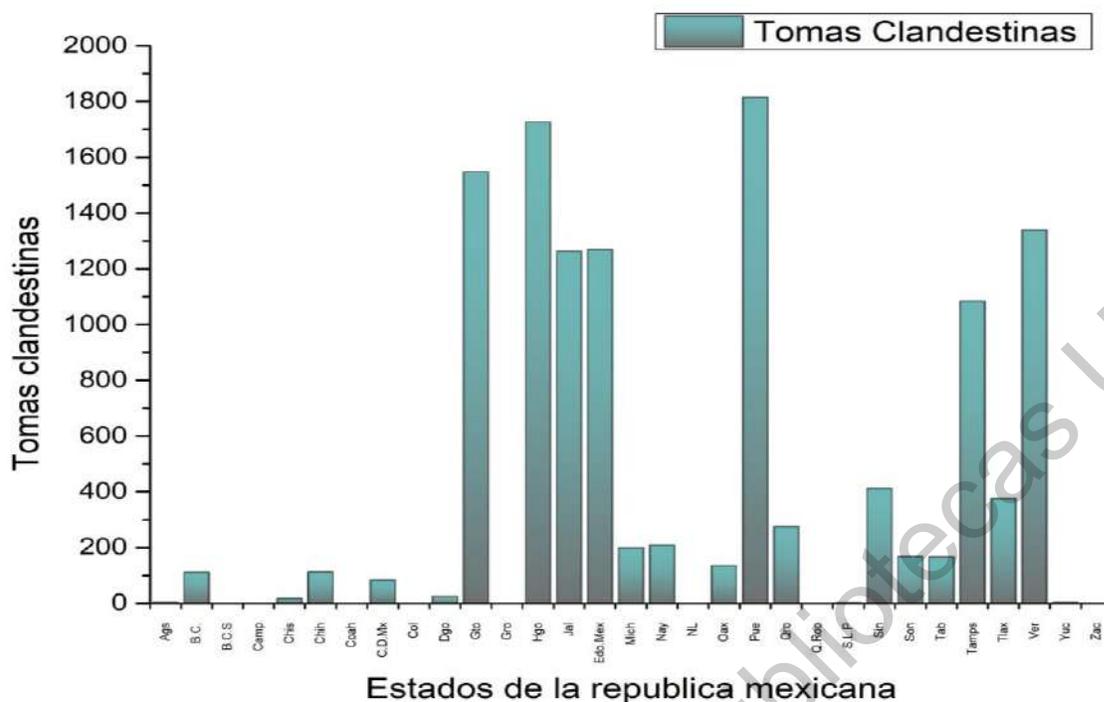


Figura 9. Tomas clandestinas de HCs en el territorio mexicano en 2018 (PEMEX, 2018).

En la industria del petróleo los BT tienen resultados efectivos contra sus contrapartes químicas durante el proceso en cadena de extracción, transportación y almacenamiento (Cuadro 3), así como una aplicación alternativa en la remediación de sitios contaminados con HTP, siendo el suelo uno de los más afectados (Silva *et al.*, 2014).

Cuadro 3. Aplicaciones de BT en la industria petrolera

Pasos en cadena en la producción de petróleo	Aplicación BT
Extracción	Humectabilidad del yacimiento Disminución en la viscosidad del petróleo Lodos de perforación Desplazamiento del petróleo
Transportación	Disminución en la viscosidad del

	petróleo
	Estabilización de la emulsión del petróleo
	Deposición de parafinas/asfaltenos
Tanque de aceite/ Limpieza del contenedor	Disminución en la viscosidad del petróleo
	Dispersión de HCs
	Emulsión de lodos con petróleo

2.6. Suelo

El suelo es un recurso natural que desempeña diversas funciones en la superficie de la tierra proporcionando un soporte mecánico, así como nutrientes para el crecimiento de plantas y microorganismos. La matriz está formada principalmente por minerales, aire, agua, materia orgánica y organismos. Está caracterizado por una serie de capas u horizontes las cuales, varían a causa de diversos factores (que también son parte de la formación del suelo) como clima, tiempo, geoforma, topografía, materia parental (donde el suelo se formó) y organismos (Rabot *et al.*, 2018).

Las partículas del suelo comúnmente pueden estar unidas formando agregados gracias a la materia orgánica. A los espacios entre estos agregados se les conoce como poros, los cuales son parte de la estructura del suelo y tienen la capacidad de llevar a cabo la regulación e infiltración de agua, intercambios gaseosos, materia orgánica, disponibilidad de nutrientes, penetración de raíces y ser susceptible a la erosión (Befkadu *et al.*, 2018).

Debido a las actividades realizadas por el hombre, el suelo es uno de los ecosistemas más susceptibles a la contaminación, y ocurre cuando sustancias peligrosas (líquidas, sólidas y gases) se mezclan sobre él. En la mayoría de los casos, los contaminantes se adhieren química o físicamente y pueden encontrarse atrapados entre los poros. Una de las sustancias que se encuentra comúnmente

esparcida (por actividades como extracción, robo, transporte y fugas) en el suelo son los HTP (Helmy *et al.*, 2015).

Cuando el petróleo está en contacto con el suelo se forman películas de HCs, lo que provoca un cambio sobre su superficie, afectando la filtración y retención de agua debido a la hidrofobicidad que se presenta. Esto puede tener un efecto sobre la erosión, fertilidad y disponibilidad de nutrientes, así como una posible disminución en la humedad del suelo (Figura 10). Cuando el suelo está húmedo, los grupos polares de la materia orgánica interactúan con las moléculas de agua, por lo que, al no estar el suelo húmedo la interacción no se llevara a cabo (Elbl *et al.*, 2014; Gordon *et al.*, 2018; Wijewardana *et al.*, 2016).



Figura 10. Efecto de BT sobre un suelo contaminado con HCs

Durante el periodo en el que el suelo se encuentra contaminado se producen diferentes procesos de intemperización (alteración de los materiales rocosos expuestos al aire, humedad, materia orgánica, y factores químicos o ambientales) que dependen en gran parte de las características del contaminante y las propiedades fisicoquímicas del suelo. Algunos parámetros que afectan al contaminante durante su proceso de intemperización son la solubilidad, la presión

de vapor, las características de desorción, biodegradabilidad y la estabilidad química del contaminante. De igual forma el suelo también posee algunos parámetros que afectan su proceso de intemperización, como la actividad microbiana, los nutrientes, pH, materia orgánica, contenido de arcilla y el potencial redox, haciendo al suelo más susceptible para el proceso (Befkadu *et al.*, 2018).

Distintos métodos físicos, químicos y térmicos son comúnmente empleados para limpiar suelos contaminados con HCs. Sin embargo, en los últimos años ha existido un gran interés en los procesos de biorremediación debido a su compatibilidad con el medio ambiente. Hay que tener en consideración que dependiendo de las características del suelo y del contenido de materia orgánica, los HCs de mayor peso molecular y menor solubilidad pueden adsorberse en los microporos de las partículas del suelo. Resultando con esto, ser inaccesibles como FC y energía para los microorganismos (Haghollahi *et al.*, 2016).

2.7. Técnicas de remediación

El impacto social y por lo tanto mundial en la búsqueda del desarrollo de técnicas que sean empleadas en la limpieza de sitios contaminados (ya sean compuestos orgánicos o inorgánicos), es debido a diversos problemas de salud y los impactos ecológicos negativos (Olasanmi *et al.*, 2018). En el caso de los HTP, existen procesos relacionados a la recuperación o remediación de sitios contaminados ya sea de manera *in situ* o *ex situ*, donde se usan diversas técnicas: térmicas, químicas, físicas etc. (Cuadro 4) (Souza *et al.*, 2014). También es importante considerar una serie de factores como las propiedades fisicoquímicas del contaminante, los requerimientos regulatorios del sitio a remediar, costos, y el tiempo que se requiere, para poder elegir la mejor técnica de remediación (Logeshwaran *et al.*, 2018; Lee *et al.* 2018).

Cuadro 4. Técnicas de remediación en suelo contaminado (Souza *et al.*, 2014; EPA, 2006).

Técnica	Descripción
Extracción de vapores (SVE)	Elimina físicamente los compuestos orgánicos de la zona insaturada mediante la aplicación de un sistema de vacío.
Bioventeo	Acelera el proceso de eliminación de compuestos orgánicos volátiles mediante la ventilación de la zona no saturada. Estimula la biorremediación <i>in situ</i> .
Bio sparging	Acelera la biodegradación de los compuestos orgánicos al estimular la microbiota nativa, a través de procesos físicos de ventilación del suelo de la zona saturada.
Proceso térmico	Son procesos térmicos realizados <i>in situ</i> que destruyen contaminantes o aceleran la transferencia de fase del contaminante subterráneo.
Biorremediación acelerada	Altera artificialmente las condiciones bioquímicas naturales del suelo y del agua subterráneos para acelerar la degradación causada por microorganismos.
Fitorremediación	Se usan plantas para promover la extracción /degradación de compuestos orgánicos y metales pesados del suelo.
Lavado de suelos/reinyección/ procesos químicos	Es un tratamiento que puede ser <i>in situ</i> o <i>ex situ</i> el cual consiste en anegar suelos contaminados con una solución que transporte los contaminantes a una zona determinada y localizada donde puedan ser eliminados. Los contaminantes son extraídos del suelo haciéndole pasar agua u otras soluciones (TA) mediante un sistema de inyección o infiltración.

Sin embargo, algunas de estas técnicas (fisicoquímicas y térmicas) pueden ser agresivas con el medio ambiente ocasionando alteraciones en los ecosistemas naturales, además de resultar costosas. Los tratamientos biológicos son métodos alternativos de eliminación de contaminantes, no provocan efectos

nocivos sobre el medio ambiente y se consideran menos costosos que otras técnicas debido al uso de sustratos de bajo costo o de desecho (Souza *et al.*, 2014; Lee *et al.* 2018).

2.7.1. Biorremediación

Un proceso que emplea el uso de microorganismos es la biorremediación, técnica ecológicamente sólida que abarca el uso de procesos biológicos para la eliminación o limpieza de contaminantes a través de la solubilización o mineralización bioquímica (Jomoh *et al.*, 2019). Este proceso implica la capacidad de degradación natural por medio de plantas y microorganismos, con el fin de convertir a los contaminantes en sustancias menos tóxicas (Santos *et al.*, 2016).

Los BT pueden jugar dos papeles importantes en los procesos de biorremediación. Pueden incrementar la biodisponibilidad del sustrato para el microorganismo, lo que provoca una disminución en la TS del medio, así como la reducción de la TI entre la pared celular y el HC. También influyen en la interacción entre el BT y la superficie celular, facilitando la adherencia de los HCs y reduciendo el índice de lipopolisacáridos de la pared celular. (Karlapudi *et al.*, 2018; Plociniczak *et al.*, 2011; Jahan *et al.*, 2019).

Por lo tanto, el BT bloquea la formación de puentes de hidrógeno permitiendo interacciones hidrofílicas-hidrofóbicas causando un reordenamiento molecular. Esto provoca una disminución de la TS e incrementa el área de superficie de compuestos insolubles como los HTP aumentando su movilidad, biodisponibilidad para los microorganismos y posterior biodegradación de HCs. Lo que conlleva al proceso de mineralización de HCs, a través de la desorción y solubilización, donde existe la transferencia de masa y biodegradación (Figura 11) (Jahan *et al.*, 2019).

También los BT inducen la separación de los contaminantes hidrofóbicos del sedimento y, al mismo tiempo, los hacen más solubles permitiendo su movilidad

dentro de las micelas del BS. Los contaminantes de alto peso molecular e hidrófobos como los HCs, se intemperizan en la matriz del suelo siendo inaccesibles para los microorganismos. Los BS hacen biodisponibles a los contaminantes en donde se establece un equilibrio de desorción-solubilización, se desplazan hacia la fase acuosa y se realizan los procesos de transporte para su posterior biodegradación de los contaminantes (Santos *et al.*, 2016; Geys *et al.*, 2014).

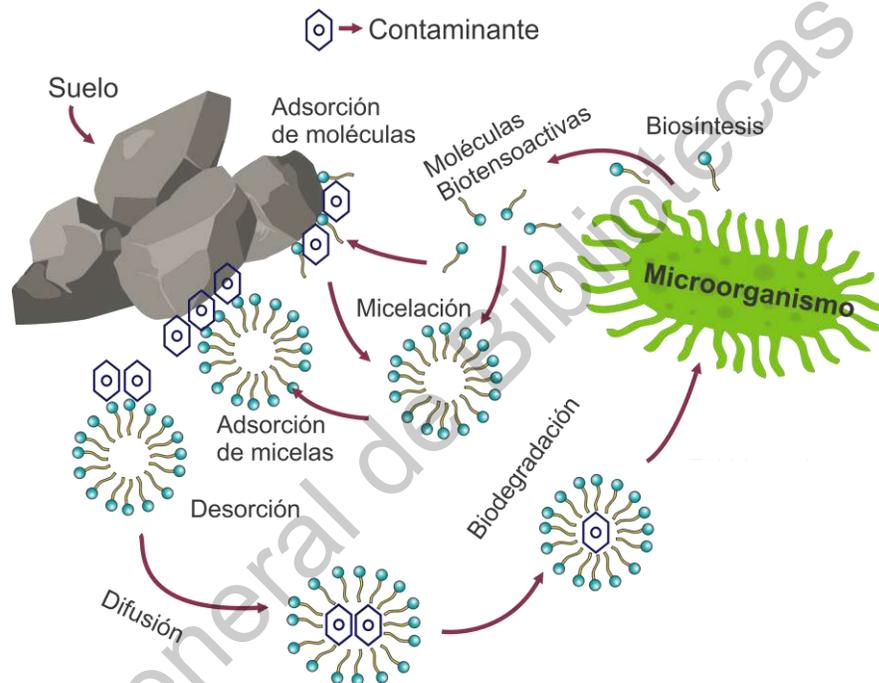


Figura 11. Efecto de los BS en la biodegradación de contaminantes en suelo.

Cabe mencionar la importancia que tiene la biorremediación para la limpieza de suelos contaminados con HTP y las técnicas más importantes para su proceso las cuales pueden combinarse con los BS o uso de microorganismos para un proceso efectivo:

a) Bioaumentación y bioestimulación

Existe la posibilidad de que los microorganismos asociados a la biodegradación de HCs no están presentes en el suelo o existe una reducción de la población microbiana debido a la toxicidad de los contaminantes. En este tipo de circunstancias, se realiza la inoculación de microorganismos para mejorar las poblaciones existentes, a este proceso se le conoce como bioaumentación. Esta técnica es comúnmente utilizada debido a que los microorganismos nativos en el suelo por sí solos no tienen la habilidad de degradar HCs. Por otro lado, están aquellos suelos que contienen la población microbiana adecuada, pero están faltantes de nutrientes como el fósforo (P) o nitrógeno (N). En estas circunstancias se requiere de la adición controlada en el medio de estos nutrientes para estimular el crecimiento bacteriano, agilizando el proceso de biodegradación de HCs, mecanismo que se conoce como bioestimulación.

En los procesos de biorremediación, es común emplear las dos técnicas de manera simultánea, y aumenta la eficacia si se combina con los BT (Brown *et al.*, 2017; Speight *et al.*, 2017). Wu *et al.* (2016) emplearon las dos técnicas para la biodegradación de HCs en suelo, para la bioaumentación, usaron una cepa de *Acinetobacter* SZ-1 y para la bioestimulación adicionaron como nutrientes N y P. Inocularon la bacteria degradadora de HCs en el suelo manteniéndolo a condiciones que permitieran el crecimiento de la cepa, añadiendo como nutrientes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y KH_2PO_4 . Después de 10 días de incubación, observaron una degradación de HTP del 34.0 al 60 % %.

b) MEOR

Es un método de extracción empleado para la recuperación de petróleo, usado como alternativa de sus contrapartes fisicoquímicas recuperación mejorada de petróleo (EOR) y recuperación mejorada de petróleo por procesos químicos (CEOR). MEOR es una técnica en donde busca manipular la función microbiana, ya sea estimulando o inoculando

bacterias nativas en los yacimientos de petróleo, lo que conlleva a la síntesis de metabolitos (BT, biopolímeros, biomasa, enzimas, etc.). El objetivo es aumentar la recuperación de petróleo que pueda quedar atrapado entre los poros del suelo. Esta técnica promueve la producción de BT, afectando la viscosidad del petróleo y modificando su estructura molecular, haciéndolo más fluido. Otro resultado es la producción de CO₂ como bioproducto del metabolismo microbiano, el cual presuriza la zona del yacimiento desplazando el petróleo hacia arriba del pozo, haciendo que exista menos petróleo en la zona contaminada (Jahan *et al.*, 2018).

c) Lavado de suelo

Esta técnica es usada como un método de pre-tratamiento para la limpieza de suelos contaminados. El objetivo es la separación del contaminante del suelo, separando las partículas pequeñas contaminadas y la grava. Existen dos formas de lavado:

- 1) Cuando se excava el suelo y se lava fuera del sitio donde se contaminó se le conoce como forma *ex situ*. Se emplean soluciones de lavado para la disolución del contaminante (agua, ácidos, alcoholes, TA). Es comúnmente usado en suelos con altas porciones de arena y grava, pero es relativamente ineficaz para suelos de textura fina. Esto es debido a que hay una TI más alta entre el TA y las partículas de arcilla, lo que disminuye la concentración de TA en la solución del suelo.
- 2) Otra forma es usando el método *in situ* el cual se realiza por debajo de la superficie, consiste en inyectar soluciones de lavado (TA, BT, ciclodextrinas, co-solventes orgánicos y ácidos húmicos) al subsuelo con el fin de remover los contaminantes adsorbidos en la matriz del suelo para su posterior eliminación. Los factores más importantes a considerar son las características del suelo y la cantidad de solución de lavado. El lavado puede aplicarse para todo tipo de contaminantes con la finalidad de que este sea biodisponible para su remoción (Ndimele *et al.*, 2018; Befkadu *et al.*, 2018, Zamudio-Pérez *et al.*, 2013).

Cuando esta técnica comenzó a usarse, las soluciones de lavado empleadas eran TA de origen químico. Sin embargo, los residuos que generan en el subsuelo son un riesgo ambiental, por tal motivo las últimas décadas han empleado el uso de BT gracias a su compatibilidad ambiental, biodegradabilidad etc., (Zhou *et al.*, 2013).

Pourfadakari *et al.* (2019) investigaron el efecto que tenían los ramnolípidos sobre la adsorción de los HAP, así como capacidad de ser removidos del suelo, usaron *Pseudomonas aeruginosa* para la síntesis del BT, cepa aislada de un sitio contaminado con HCs. Reportaron como el BT afecto la desorción de los HAP, haciéndolo más biodisponible para su remoción, también determinaron que entre más concentración del BT se emplee hay una mayor remoción de los HCs.

3. JUSTIFICACIÓN

La presente investigación se enfocó en sintetizar un agente de origen biológico (BT) que ayude a la remediación de suelos contaminados con HCs como el petróleo.

El empleo de HCs como componente energético en los procesos de producción conlleva a una serie de riesgos y problemas en el medio ambiente, debido a todas las actividades antropogénicas asociadas a su obtención, extracción, transporte y fugas. Los HCs han provocado severos daños en ecosistemas como el suelo o el agua. Este hecho ha afectado de manera predominante a la flora, fauna y también al ser humano, por lo que son cuestiones que deben atenderse a la brevedad posible.

Por tal motivo, se han desarrollado técnicas que ayuden a la remediación de estos sitios contaminados, siendo las más comunes las físicas y químicas, un claro ejemplo es el lavado de suelos empleando TA para remover el contaminante. Sin embargo, al ser estos de origen químico, pueden quedar rastros del compuesto que con el tiempo afectarán al ecosistema.

El uso de BT ha aumentado gracias a su compatibilidad con el medio ambiente, sus bajos niveles de toxicidad y biodegradabilidad.

Varios tipos de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos), poseen un metabolismo capaz de producir tensoactivos usando diferentes nutrientes y manteniéndolos en un estado de estrés de pH o salinidad que permita la síntesis de estos compuestos.

Los biotensoactivos poseen diversas propiedades, como la disminución de la tensión superficial en líquidos, como agente emulsificante, y entre las más destacables, la capacidad de hacer biodisponibles a los contaminantes para realizar la remediación del sitio contaminado.

4. HIPÓTESIS

Bacillus cereus aislada de un suelo salino es capaz sintetizar moléculas tensoactivas al modificar en el medio de cultivo parámetros como fuente de carbono, concentración de NaCl y relación C/N las cuales pueden ser utilizadas en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos mediante la técnica de lavado de suelos.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la concentración de NaCl, fuente de carbono y relación C/N sobre la biosíntesis de biotensoactivos producidos por *Bacillus cereus* y verificar su influencia en la remoción de hidrocarburos en suelos contaminados.

5.2. Objetivos específicos

- Evaluar las condiciones de cultivo adecuadas (agitación, concentración de NaCl en el medio de cultivo) que permitan obtener la mayor disminución de la tensión superficial del medio de cultivo producido por los agentes tensoactivos generados.
- Evaluar el efecto de la relación C/N sobre la disminución de la tensión superficial del medio de cultivo empleando *Bacillus cereus*.
- Determinar la capacidad de los tensoactivos producidos por *Bacillus cereus* para la remoción HCs del petróleo en suelo contaminado.

6. METODOLOGÍA

6.1. Preparación del medio de cultivo y activación de *Bacillus cereus*

La cepa de *Bacillus cereus* aislada previamente de un suelo salino, se conservó en tubos Eppendorf con glicerol y 70 % (v/v) de caldo marino (CM) a 20 °C. Se activó la cepa por sembrado extendido en placa AM con la composición siguiente (gL⁻¹): agar bacteriológico (15.0), NaCl (19.4), MgCl₂ (8.8), peptona de caseína (5), Na₂SO₄ (3.24), CaCl₂ (1.8), extracto de levadura (1.0), NaHCO₃ (0.16), C₆H₁₁FeNO₇ (0.1), KBr (0.08), SrCl₂ (0.034), H₃BO₃ (0.022), Na₂SiO₃ (0.004), NH₄NO₃ (0.0016), KCl (0.55), NaF (0.0024), NaH₂PO₄ (0.008), se ajustó el pH de 7.0 ± 0.2 con NaOH (0.1 M) y HCl (1.0 M). Las condiciones de incubación fueron a 30 °C durante 24 h en una incubadora marca Prendo INO 650V-9, México (Elazzazy *et al.*,2015; Senthil *et al.*,2017; Ugalde-Sánchez, 2018).

6.2. Preparación del pre inóculo

Se tomó una asada de *Bacillus cereus* activada y se inocularon en 150 mL de CM empleando como FC petróleo crudo (5.0 gL⁻¹) proporcionado por la refinería Ing. Antonio M. Amor en Salamanca Gto., se incubaron a 30 °C durante 72 h con agitación orbital constante de 190 rpm (Andreou, 2013; Prendo INO 650V-9, México).

6.3. Evaluación de la FC sobre la TS en el medio de cultivo

Para verificar variación de la TS en el medio de cultivo ocasionado por el BT, se inoculó el 5 % (v/v) del pre-inóculo en 50 mL de CM con variación de FC, así como sus concentraciones (Cuadro 5). Se incubaron en matraces bafleados de 125 mL durante 96 h a 30 °C y con una agitación constante de 190 rpm. En cada repetición se usaron controles con CM sin inóculo.

(Prendo INO 650V-9, México).

Cuadro 5. Variación del tipo y concentración de FC

Medio	FC
	(% p/v)
Caldo marino	Glicerol 0.6
	Glicerol 1.0
	Glicerol 2.0
	Glicerol 5.0
	Petróleo crudo 0.6
	Petróleo crudo 1.0
	Petróleo crudo 2.0
	Petróleo crudo 5.0
	Glucosa 0.6
	Glucosa 1.0
	Glucosa 2.0
	Glucosa 5.0

6.4. Evaluación de la concentración de NaCl sobre la TS en el medio de cultivo

Para determinar el efecto que tiene el NaCl en la síntesis de BT, se evaluó el crecimiento de *Bacillus cereus* en CM utilizando las tres diferentes FC con las concentraciones donde se observó una mejor disminución de la TS. Se inocularon en matraces bafleados de 125 mL que contenían 50 mL de CM 5.0 % (v/v) del pre-inóculo y se variaron las concentraciones de NaCl: 2.0, 5.0 ,10.0 ,15.0 (% p/v) en el CM, se incubaron durante 96 h a 30 °C, con una agitación constante de 190 rpm. En cada repetición se usaron controles con CM sin inóculo (Prendo INO 650V-9, México).

6.5. Evaluación de la relación C/N sobre la TS en el medio de cultivo

Se seleccionaron los mejores parámetros (FC y salinidad) para la variación de la TS en el medio de cultivo ocasionado por el BT, posteriormente se modificó la relación C/N, usando como fuente de nitrógeno NH_4NO_3 .

Las relaciones de C/N empleadas fueron 10:1, 12:1, 14:1, 16:1, 18:1 y 20:1. Posteriormente en matraces bafleados de 125 mL se adicionaron 50 mL de CM empleando NH_4NO_3 como única fuente de nitrógeno, 5.0 % (v/v) de pre-inóculo y se incubaron durante 96 h a 30 ° con una agitación constante de 190 rpm. En cada repetición se usaron controles con CM sin inóculo (Patowary *et al.*, 2018).

6.6. Métodos analíticos para evaluar la TS e E_{24} en el sobrenadante

6.6.1. Obtención del sobrenadante y recuperación de la biomasa

Se centrifugaron 50 mL del CM de los diferentes matraces durante 20 minutos a 4,400 rpm (Eppendorf AG 22331, Alemania). Al sobrenadante libre de células se le midió TS y se realizaron las pruebas de E_{24} .

6.6.2. Determinación de la TS por el método de DuNouy en el sobrenadante.

Los análisis de tensión superficial se realizaron mediante el método del anillo en un tensiómetro de DuNouy (Force tensiometer-K6 KRÜSS, Alemania). El equipo se calibró con agua destilada (72.0 mN/m) para asegurar la medición en posteriores análisis. Se tomaron 20 mL del sobrenadante y se empleó como control CM sin inóculo, entre cada medición el anillo de platino se lavó con agua destilada y etanol, posteriormente se esterilizó con fuego directo.

6.6.3. Evaluación del índice de emulsificación (E_{24}).

El E_{24} del BT se determinó mediante la técnica descrita por Nagwa *et al.* (2014) en donde se añadieron 2 mL de queroseno y 2 mL del sobrenadante libre

de células en un tubo de ensaye (13x100 mm), posteriormente se agitaron en el vórtex por 2 minutos.

Se midió la estabilidad de la emulsión y se reportó en términos de porcentaje con la siguiente ecuación:

$$\% E_{24}: (E_f/H_t) (100)$$

Donde:

$\% E_{24}$: Índice de emulsificación

E_f : altura de la emulsión formada

H_t : altura total

Para determinar la estabilidad de la emulsión el tubo se giró de manera vertical después de 24 h

6.7. Remoción de HCs por medio de la técnica de lavado de suelos.

6.7.1. Intemperización de suelo sintético

Se recolectó suelo en la reserva de la biosfera de Zapotitlán Salinas, Puebla, se secó completamente en un horno a 105 °C durante 24 h (horno de convección forzada AP120) y se homogeneizó a través de un tamiz de 2 mm de diámetro. Posteriormente el suelo pasó por un proceso de intemperización siendo el primer paso una contaminación artificial con petróleo crudo a concentraciones de 3,200 ppm de acuerdo a la NOM-138-SEMARNAT-2012 y 10,000 ppm. Como segundo paso, los suelos se homogeneizaron durante 3 semanas y se colocaron en dos ciclos de 12 h a una temperatura de 4.0 °C refrigerador vertical imbera Vr08) y 12 h a 40.0 °C (horno de convección forzada AP120) (Figura 12).

6.7.2. Lavado de suelos

Se lavaron porciones de los suelos contaminados (10.0 g) con 20.0 mL de solución de lavado. Fueron colocados en frascos de 30.0 mL y se mantuvieron en una incubadora (Prendo INO 650V-9, México) a temperatura ambiente, se agitaron a 150 rpm durante 24 h. Posteriormente los suelos se sedimentaron por gravedad

(1 h) y la solución fue decantada (Figura 12). Se dejaron secar a temperatura ambiente.

Se emplearon tres soluciones de lavado, para comparar su eficacia: control positivo usando un TA sintético (Tween 20), agua como control negativo y el sobrenadante de los medios, que contenían el BT generado (Zamudio-Pérez *et al.*, 2013).

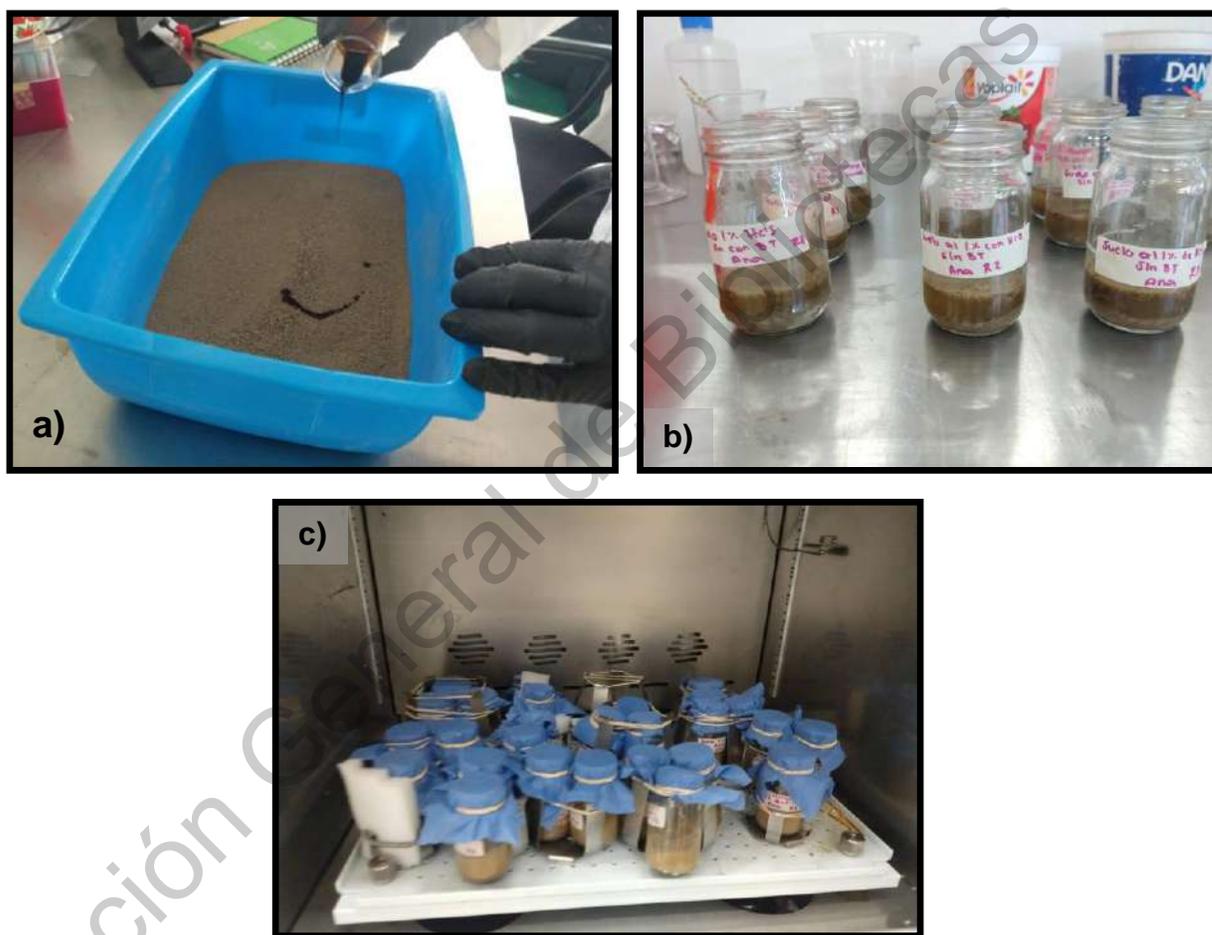


Figura 12. Proceso de intemperización de un suelo sintético a diferentes concentraciones y el lavado del mismo con dos soluciones de lavado. a) Contaminación artificial con petróleo; b) lavado de suelos con tres soluciones de lavado (Tween 20, agua y BT) y c) agitación durante 24 h de los suelos lavados

6.7.3. Determinación de HTP en suelo después de ser lavado

Los HTP se cuantificaron en los dos suelos después del proceso de lavado por el método gravimétrico EPA 9071B. Este consiste en la extracción de los HTP del suelo con el método Soxhlet, usando hexano como solvente.

Se colocaron a peso constante seis matraces bola de 250 mL en un horno (Prendo INO 650V-9, México) a 90 °C durante 12 h para remover la humedad. Posteriormente se pesaron y se les adicionaron 125 mL de hexano; se montaron en el equipo Soxhlet sobre un calentador en secuencia (Barnstead Lab multi-unit extraction heater Line) en donde se realizaron 25 flujos para la obtención de los HTP. Una vez realizada la extracción se pesaron los matraces los cuales contenían el aceite. Finalizado el proceso de extracción, se realizó el cálculo para obtener el porcentaje de remoción con la siguiente formula (Zamudio-Pérez *et al.*,2013; Al-wahaibi *et al.*,2016).

$$\% \text{ Remoción de TPH} = (C_i - C_f) * 100$$

C_i = concentración inicial de TPH

C_f = concentración final de TPH

6.7.4. Cromatografía en capa fina

Una vez realizado el lavado de los suelos, se recolectaron las soluciones de lavado con la finalidad de realizar una cromatografía en capa fina para verificar la presencia de HTP.

Se usaron placas de sílice gel como fase estacionaria de tal medida, y como fase móvil una solución hexano-etanol 1:1, como muestra control se empleó petróleo crudo.

La placa se dividió en cuatro secciones colocando petróleo, la solución después de 24 h de lavado con BT, Tween 20 y agua.

6.8. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se reporta el promedio de los valores \pm desviación estándar. Los análisis estadísticos de los datos experimentales se realizaron con el software Origin Pro (Version 9 OriginLab corporation, Northampton, MA, USA). El análisis de varianza (ANOVA) se realizó para estimar la significancia estadística.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se llevó a cabo el aislamiento de cepas del género *Bacillus* en un suelo salino ubicado en la reserva de la biosfera de Zapotitlán Salinas, Puebla. Se seleccionaron las mejores cepas de acuerdo al efecto que tenían sobre la disminución de la TS en el medio donde crecieron. Posteriormente se llevó a cabo un análisis filogenético para tener el porcentaje de similitud con los diferentes géneros existentes de *Bacillus*. Entre ellas se encontró una cepa con similitud de identidad del 99 % con *Bacillus cereus*. Se ha reportado que esta bacteria posee capacidad biosurfactante cuando se modifican los factores de crecimiento en el medio de cultivo y se somete a condiciones de estrés (temperatura, pH, salinidad etc.).

7.1. Evaluación de la FC sobre la síntesis de BT

Se logró comprobar la síntesis de BT con la disminución de la TS en el medio CM con una cepa de *Bacillus cereus* variando los sustratos y sus concentraciones. En el Cuadro 6 se muestran los valores de TS al variar la concentración en las tres FC usadas.

La FC que mostró mejores resultados fue petróleo al 0.6 %, logrando una disminución de la TS comparado con el control (64.0 a 41.4 mN/m). También se observó una relación directamente proporcional de la concentración de petróleo, conforme se agregaba más al medio se percibía menos producción de biomasa y por lo tanto menos actividad del BT. Esto último se reflejó sobre la TS pasando de 41.4 con 0.6 % de petróleo a 53.3 mN/m con 5.0 %.

Las concentraciones de glucosa (1-5 %) no mostraron efecto significativo en la disminución de la TS en el medio de cultivo. Por lo que se determinó que a pesar de variar las concentraciones de esta FC la bacteria captará la misma cantidad para su consumo y llevará a cabo su crecimiento en el medio (Figura 13).

Finalmente, con glicerol se observó un comportamiento similar al del petróleo, en donde conforme la concentración de FC aumentó, ya no se observó mayor disminución de la TS.

Trejo-Castillo *et al.* (2014) usaron la misma concentración de petróleo (0.6 % v/v) obteniendo resultados prometedores con esta concentración para la síntesis de BT. Sin embargo, observaron una menor disminución de la TS cuando la concentración de la FC va en aumento, esto puede ser debido a que la bacteria consumió el nutriente necesario para su crecimiento.

El aumento de la concentración de las FC (0.6-5.0 %) afecta sobre el crecimiento bacteriano y por lo tanto sobre la actividad del BT. La baja reducción de TS en medios con mayor concentración de FC, podría explicarse por el hecho de que las células producidas a altas concentraciones de la FC no son fisiológicamente adecuadas para sintetizar BT. Al estar sobresaturada de nutrientes la bacteria no consumió en su totalidad la FC que había en el medio ocasionando un bloqueo en la síntesis de los metabolitos secundarios debido a un estrés por exceso de nutrientes.

Burgos *et al.* (2013) variaron las FC en un medio de cultivo con una cepa de *Bacillus* sp para determinar su eficiencia en la síntesis de BT. La presencia de glucosa provocó una disminución en la producción de BT, pero cuando se usó diésel como FC, la producción tendió a aumentar, demostrando la eficiencia del diésel sobre glucosa.

En el caso del BT sintetizado con *Bacillus cereus* pudimos comprobar una mejor actividad usando petróleo como FC en el medio de cultivo mientras que con glucosa la actividad del BT permaneció sin efectos significativos, esto se determinó a partir del sobrenadante obtenido midiendo la TS.

Otro efecto sobre la actividad del BT fue al usar concentraciones de 0.6 % y 1.0 % con glucosa y glicerol respectivamente. Los valores sobre la TS fueron similares con el control (Figura 13).

Ehinmitola *et al.* (2018) realizaron la síntesis de BT a partir de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* variando las FC (glicerol, glucosa y aceite de coco).

Los autores lograron determinar que existe un retraso en la transformación de metabolitos secundarios al usar glicerol y glucosa considerando que poseen el mismo comportamiento. Con el aceite de coco la transformación se llevó a cabo de manera rápida, obteniendo más producción de biomasa y BT.

El comportamiento que ellos obtuvieron con esas tres FC se compararon con las FC empleadas en este proyecto. El petróleo frente a la glucosa y glicerol, reveló una mejor actividad de BT, por lo tanto, una transformación de los metabolitos secundarios más rápida.

Por lo que, de acuerdo a los resultados obtenidos, se consideraron como mejores concentraciones, petróleo al 0.6 %, glucosa y glicerol al 2.0 %.

Cuadro 6. Efecto sobre la TS al variar las FC y sus concentraciones

FC	Concentración FC			
	0.6 %	1.0 %	2.0 %	5.0 %
	Tensión superficial (mN/m)			
Blanco (H₂O)	72.0 ± 0.0	73.0 ± 0.0	73.0 ± 0	73.0 ± 0.0
Control	64.0 ± 0.5	64.0 ± 0.0	64.0 ± 0	65.0 ± 1.0
Petróleo	*41.4 ± 2.4	50.1 ± 2.14	47.0 ± 4.12	53.3 ± 1.22
Glucosa	64.4 ± 4.77	56.3 ± 1.2	*54.3 ± 3.46	55.5 ± 1.7
Glicerol	63.2 ± 4.89	55.8 ± 5.3	*47.4 ± 0.88	57.1 ± 1.4

*Valor mínimo de la TS en cada FC

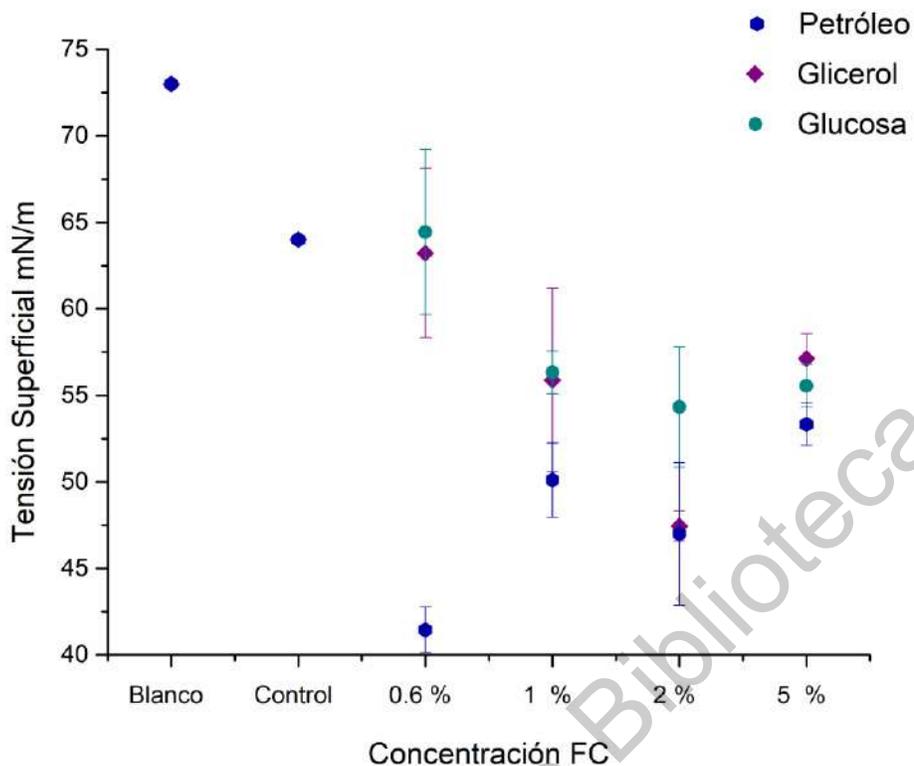


Figura 13. Influencia de diferentes FC en el medio de cultivo sobre la TS variando sus concentraciones para la producción de BT

7.2. Efecto de la concentración de NaCl sobre la TS en el medio de cultivo

Un agente que puede considerarse estresante para la mayoría de los organismos es la sal a altas concentraciones dentro del medio donde se están reproduciendo. La cepa de *Bacillus cereus* mostró buen crecimiento en el medio de cultivo el cual contenía cierto porcentaje de NaCl (2.0-12.0 %) lo que la hace una bacteria halotolerante.

En el Cuadro 7 se muestra el comportamiento de la cepa al ser sometida a diversas concentraciones de NaCl, así como su capacidad de aceptar diversas FC como fuente nutritiva, plasmándose en la actividad del BT al disminuir la TS del medio en el que se encuentra.

Después de 24 h de incubación se logró observar una solubilización parcial en el caso de aquellos medios empleando petróleo como FC, y en el caso

de glicerol la formación de espuma (Figura 14), indicando la efectividad de estas FC como nutrientes.

Después de las 96 h de incubación se observó una mejor actividad del BT al haber una disminución considerable de la TS usando 2.0 % y 5.0 % de NaCl empleando las tres FC. El mejor resultado fue con petróleo en presencia de 2.0 % de NaCl, donde la TS se redujo a 41.4 ± 1.3 mN/m, comparándolo con el control negativo que arrojó un valor de 64.0 ± 0.5 mN/m y la TS del agua que es de 72.0 mN/m, por lo que se considera que ambos parámetros (petróleo como FC y 2.0 % de NaCl) son los indicados para la producción de BT.

Un comportamiento similar ocurrió con *Bacillus subtilis* en condiciones de estrés en un medio salino, donde se variaron concentraciones de NaCl para probar la capacidad productora del BT. Lograron una disminución de la TS de 41.4 ± 0.85 mN/m utilizando una concentración de 7 % de NaCl (Sujata *et al.*,2016).

En otra investigación experimentaron con una cepa de *Virgibacillus salarius*, en donde variaron la concentración de NaCl en el medio de cultivo de 4.0 a 15.0 %p/v. La menor disminución de la TS se mostró al tener en el medio de cultivo 4.0 % de NaCl, y observaron que, al aumentar la concentración hasta 10.0 % el BT empezó a perder 25.0 % de su actividad observando como la TS iba en aumento (Elazzazy *et al.*, 2015). Este comportamiento comparable con los resultados obtenidos en este proyecto con *Bacillus cereus*, en donde, conforme se va aumentando la concentración de sal, de igual forma se ve afectada la TS (Figura 15).

La capacidad que tiene la bacteria ante estas concentraciones de sal, es debido a su capacidad de soluto compatible, que mantiene a las células en bajas concentraciones de sal en su citoplasma, manteniendo de esta forma un balance en la presión osmótica (Widderich *et al.*,2016).

Otro efecto que tiene la salinidad en medios acuosos recae en la solubilidad relativa en donde el coeficiente de partición del BT cambia. Cuando se incrementa la concentración de sal en un medio acuoso se realiza la migración de las moléculas del BT dentro de la fase oleosa, sin embargo, cuando la

concentración de sal disminuye promueve la acumulación del BT en la fase acuosa (Fernandes *et al.*, 2016).

La concentración adecuada de NaCl para mejorar la recuperación de petróleo es la que conduce a la acumulación del BT en la interfaz aceite-agua, que generalmente es la condición que produce una TS muy baja. Las concentraciones de sal por encima de la concentración adecuada conducen a un aumento de la TS.

Cuadro 7.Efecto sobre la TS variando la concentración de NaCl y usando diferentes FC.

FC	Concentración FC (% v/v)	NaCl (% p/v)	Tensión Superficial mN/m (72 h)
Blanco	N/A	N/A	72.0 ± 0.0
Control	-	-	64.3 ± 0.5
Petróleo	0.6	2.0	*41.4 ± 1.3
	0.6	5.0	52.2 ± 1.2
	0.6	10.0	56.8 ± 1.6
	0.6	12.0	63.0 ± 4.3
Glucosa	2.0	2.0	*54.3 ± 3.4
	2.0	5.0	59.4 ± 1.3
	2.0	10.0	61.4 ± 2.0
	2.0	12.0	57.1 ± 0.6
Glicerol	2.0	2.0	*47.4 ± 0.8
	2.0	5.0	58.7 ± 3.0
	2.0	10.0	56.0 ± 0.5
	2.0	12.0	49.5 ± 4.7

*TS más baja en cada FC



Figura 14. Crecimiento de *Bacillus cereus* para la producción de BT variando la FC y la concentración de NaCl. a) medio de cultivo con petróleo antes y después del proceso de incubación; donde se observa solubilización del petróleo; b) medio de cultivo con glucosa antes y después de incubar; c) medio de cultivo con glicerol, donde se percibe la formación de espuma.

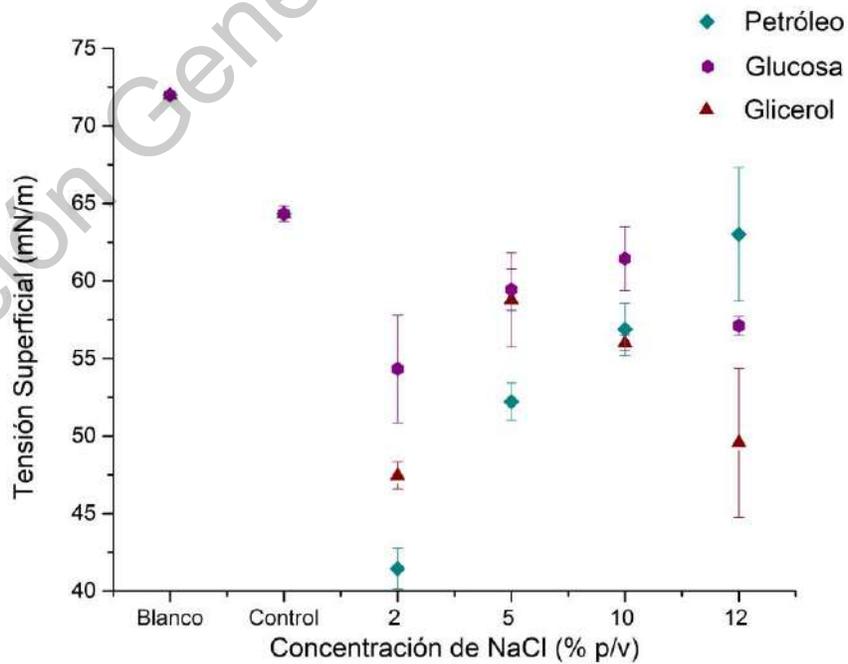


Figura 15. Efecto que tiene el NaCl al ser modificadas sus concentraciones en la actividad y síntesis del BT sobre la TS

7.3. Efecto de la relación C/N sobre la TS en el medio de cultivo

Derivado de los resultados obtenidos anteriormente, se seleccionó petróleo como única FC, así como las dos mejores concentraciones de sal en esta prueba, debido a que la bacteria es capaz de sintetizar un BT eficiente al disminuir la TS.

Se observó una disminución de la TS de 67.3 a 49.2 ± 1.8 mN/m con las condiciones en el medio de cultivo de C/N 12:1 y 2.0 % de NaCl (Cuadro 8). Otro factor a destacar fue la capacidad de degradación parcial del petróleo al estar 24 h en incubación, haciéndolo parcialmente soluble en el CM (Figura 17).

El microorganismo empieza a producir el BT cuando el N es consumido en su totalidad durante la fase exponencial de crecimiento, por tal razón, se pudo observar una disminución de la TS al modificar las condiciones. En este proceso existe una sola fuente de nitrógeno que es el NH_4NO_3 , cuando en medios anteriores había extracto levadura y peptona como fuente de nitrógeno. Gracias a esto, era posible realizar eficientemente la síntesis de BT, resultado que pudo verse reflejado sobre la TS (Figura 16).

Al aumentar la relación C/N se observó un cambio en la actividad de BT, esto se atribuye a que la concentración de N va disminuyendo conforme aumenta la relación C/N, por lo tanto la bacteria se queda sin N para su consumo. Este efecto provoca que la bacteria empieza a consumir cualquier otro nutriente que tenga disponible, que en este caso es la FC, lo que ayuda a sintetizar el BT.

Heryani *et al.* (2017) realizó un estudio en el cual modificaron la relación C/N entre otros parámetros para obtener la mayor producción de BT usando una cepa de *Bacillus* sp. Obtuvieron que la mejor relación para la síntesis fue 12:1 dando como resultado un mayor rendimiento del BT al disminuir la TS. De igual forma observaron que al ir aumentando la relación C/N tenían un cambio en la síntesis de BT, disminuyendo su actividad y por lo tanto un aumento en la TS,

comportamiento muy similar al que se obtuvo con *Bacillus cereus* y que puede observarse en la Figura 16.

Cuadro 8. Efecto del BT producido sobre la TS variando la relación C/N

NaCl (% p/v)	Tensión superficial (mN/m)						
	Blanco	Control	12:1	14:1	16:1	18:1	20:1
2.0	72.6 ± 0.5	67.3 ± 2.0	*49.2 ± 1.8	51.5 ± 2.1	55.2 ± 4.5	55.3 ± 7.7	57.6 ± 4.1
5.0	72.6 ± 0.5	67.3 ± 2.0	50.7 ± 3.8	62.0 ± 1.9	59.0 ± 1.9	55.5 ± 3	55.8 ± 2.1

*Valor mínimo de la TS variando la relación C/N

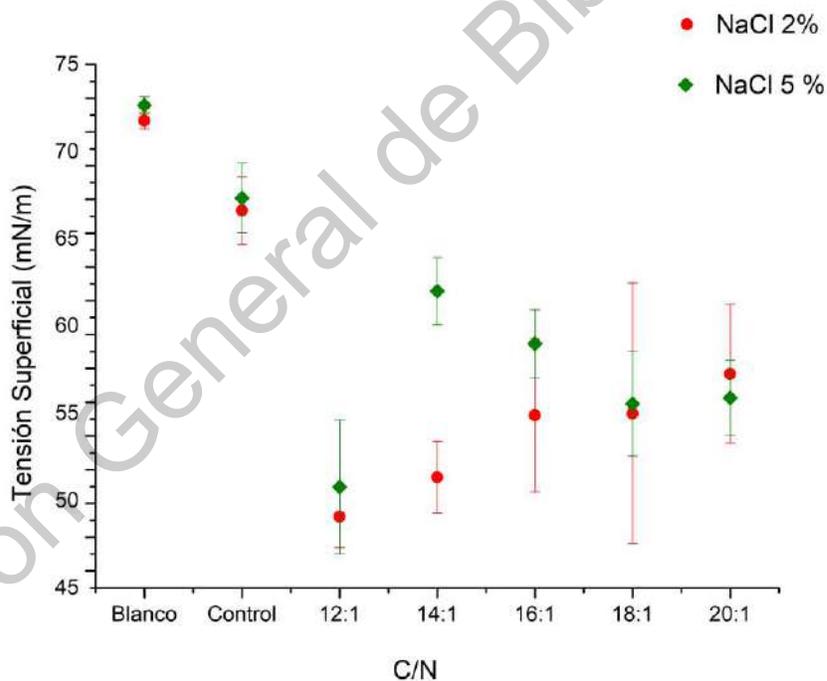


Figura 16. Efecto de la relación C/N en la síntesis de BT sobre la TS, usando solo una FC y dos concentraciones de NaCl

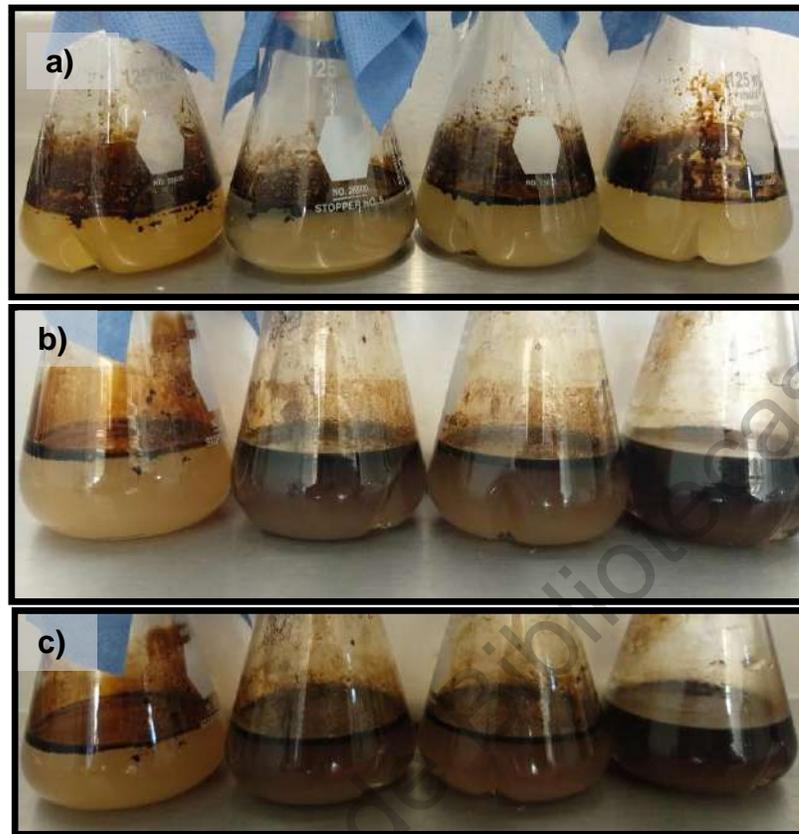


Figura 17. Crecimiento de la cepa *Bacillus cereus* empleando la relación C/N 12:1, usando una FC (petróleo). a) medio de cultivo sin inocular; b) relación C/N 12:1 empleando 2.0 % p/v de NaCl; c) relación C/N 12:1 empleando 5.0 % p/v de NaCl

7.4. Índice de Emulsificación (E_{24})

En adición a los análisis realizados al BT sobre la TS, también se realizaron análisis sobre la estabilidad de la emulsión formada entre el sobrenadante donde está sintetizado el BT y un HC. Se debe considerar que la estabilización de una emulsión de aceite y agua se usa comúnmente como un indicador de actividad superficial. Es importante mencionar que la capacidad de una molécula para formar una emulsión estable no siempre se asocia con la capacidad de reducir la TS (Silva *et al.*, 2010).

Los porcentajes obtenidos en la prueba E₂₄ con las diferentes FC presentaron valores ≥ 20.0 % de emulsificación (Cuadro 9), sobre todo a concentraciones bajas de NaCl (2.0 y 5.0 %). En el sobrenadante donde se emplearon como FC petróleo y glucosa, al ponerlos en contacto con queroseno obtuvieron porcentajes arriba del 70 %, así como una estabilidad de la emulsión 24 h después de la prueba (Figura 18)

Cuadro 9. Efecto de la concentración de NaCl sobre el E₂₄ variando la FC y la concentración de NaCl

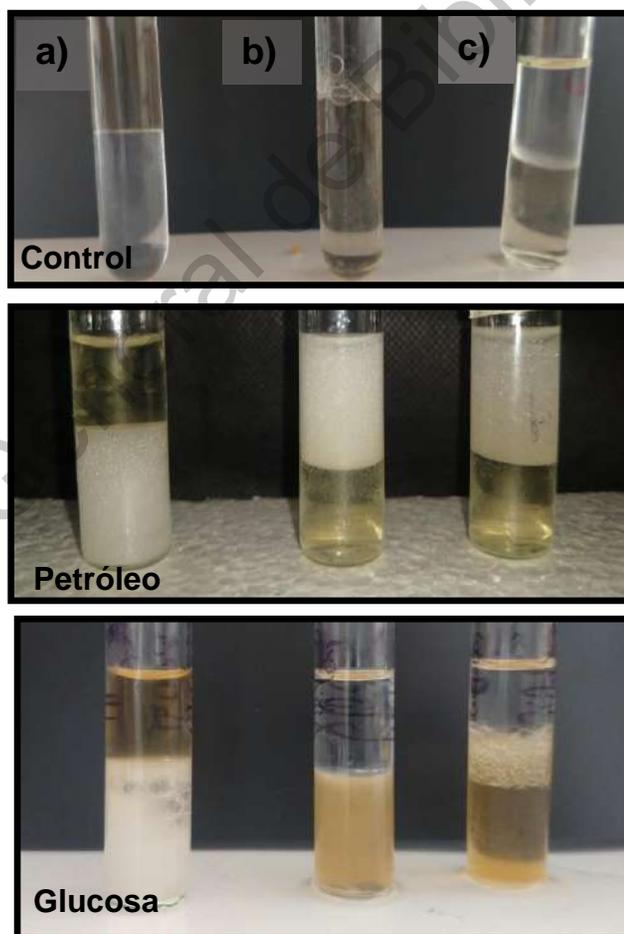
	Concentración de NaCl (p/v)				
	Control	2.0 %	5.0 %	10.0 %	12.0 %
	FC: Petróleo (0.6 % v/v)				
	E₂₄ (%)				
Cloroformo	0 ± 0.0	49.0 ± 2.8	61.3 ± 1.0	0 ± 0.0	36.6 ± 4.2
Xileno	0 ± 0.0	51.6 ± 8.1	60.9 ± 2.2	20.8 ± 1.8	6.3 ± 1.74
Queroseno	0 ± 0.0	*78.4 ± 1.9	62.2 ± 4.0	50.5 ± 2.2	17.5 ± 15.3
	FC: Glucosa (2 % p/v)				
Cloroformo	0.0 ± 0	56.3 ± 0.9	23.5 ± 3.1	18.9 ± 0.8	15.3 ± 1.6
Xileno	0 ± 0.0	54.0 ± 1.7	32.5 ± 4.4	0 ± 0.0	31.9 ± 8.4
Queroseno	0 ± 0.0	*56.6 ± 2.3	24.4 ± 21.5	0 ± 0.0	26.3 ± 1.0
	FC: Glicerol (2 % v/v)				
Cloroformo	0 ± 0.0	55.8 ± 1.9	56.5 ± 3.9	0 ± 0	49.46 ± 0.31
Xileno	0 ± 0.0	52.6 ± 2.7	27.9 ± 24.2	0.4 ± 0.4	0.7 ± 0.6
Queroseno	0 ± 0.0	*58.1 ± 12.8	0 ± 0.0	0 ± 0.0	1.36 ± 1.2

*Mayores porcentajes de E₂₄ obtenidos

En la Figura 19 se pueden observar las gráficas comparativas con cada una de las concentraciones de sal, así como de los sobrenadantes obtenidos con

las diferentes FC. Al emplear petróleo, 2.0 % de NaCl y utilizar queroseno se obtuvo el mayor porcentaje de emulsión (78.4 %1.9) \pm , así como una buena estabilidad al girarlo de manera vertical. El comportamiento que se determinó fue una disminución del porcentaje de emulsificación conforme va aumentando la concentración de NaCl.

De acuerdo a los valores reflejados en el Cuadro 9, se puede determinar que el BT sintetizado a partir de petróleo y glucosa como FC, son aplicables como buenos emulsionantes, debido a la estabilidad que se logra formar y al porcentaje obtenido.



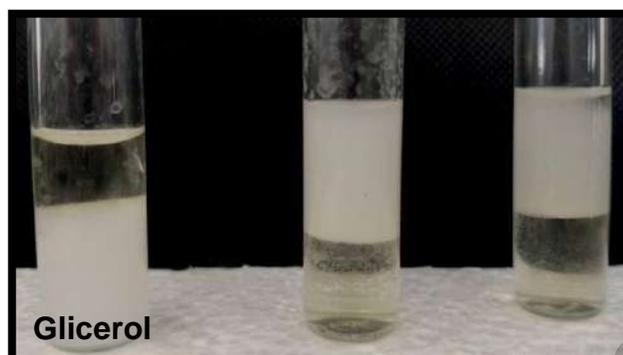
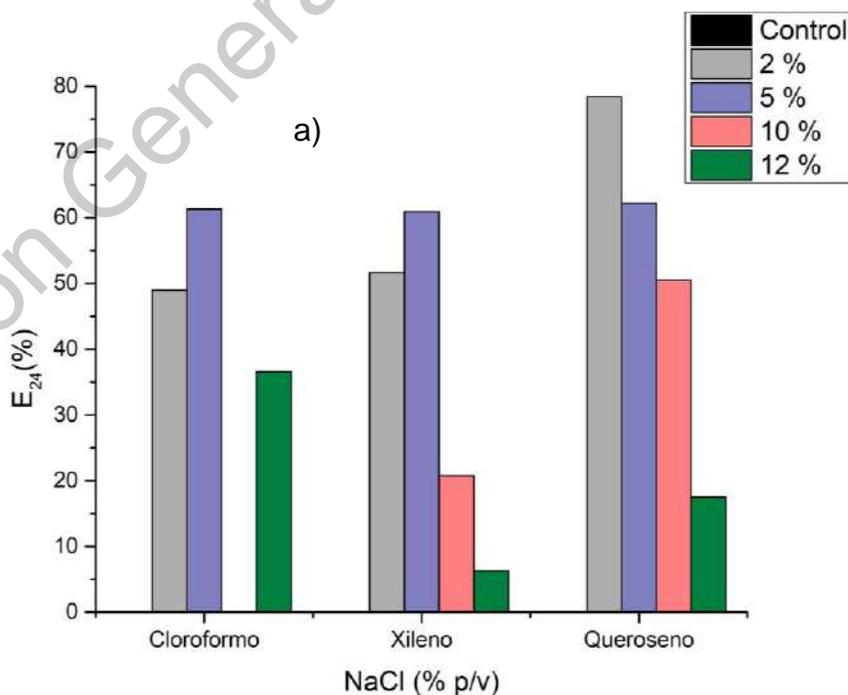


Figura 18. Comparación y evaluación de E₂₄ en diferentes FC, variando los HCs para observar el proceso de emulsión. a) cloroformo, b) xileno, c) queroseno

Diferentes microorganismos demostraron ser capaces de degradar aceites o compuestos hidrocarbonados. En el caso de petróleo se demostró que estos microorganismos son capaces de producir sustancias TA así como también de generar emulsiones estables de aceite en agua



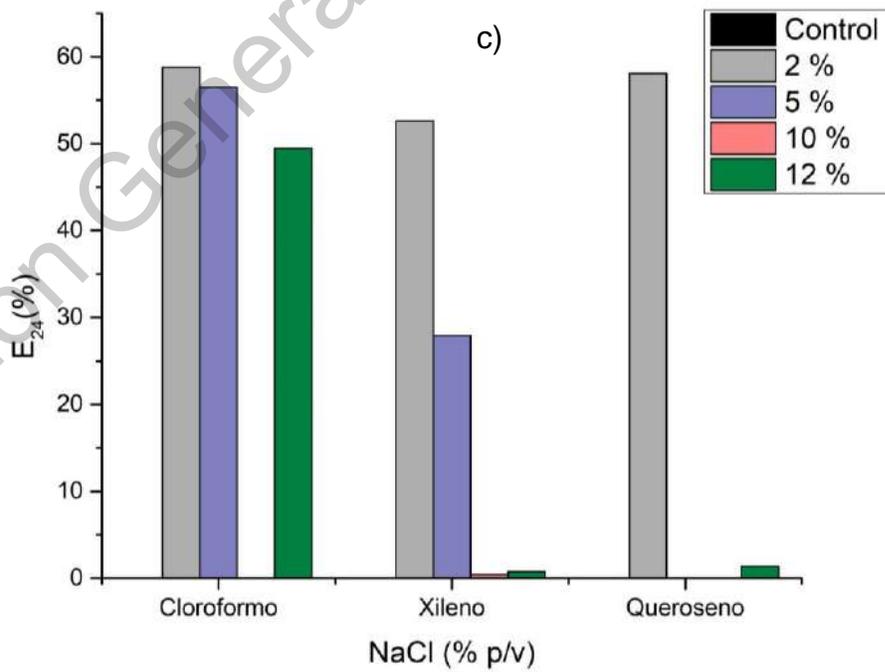
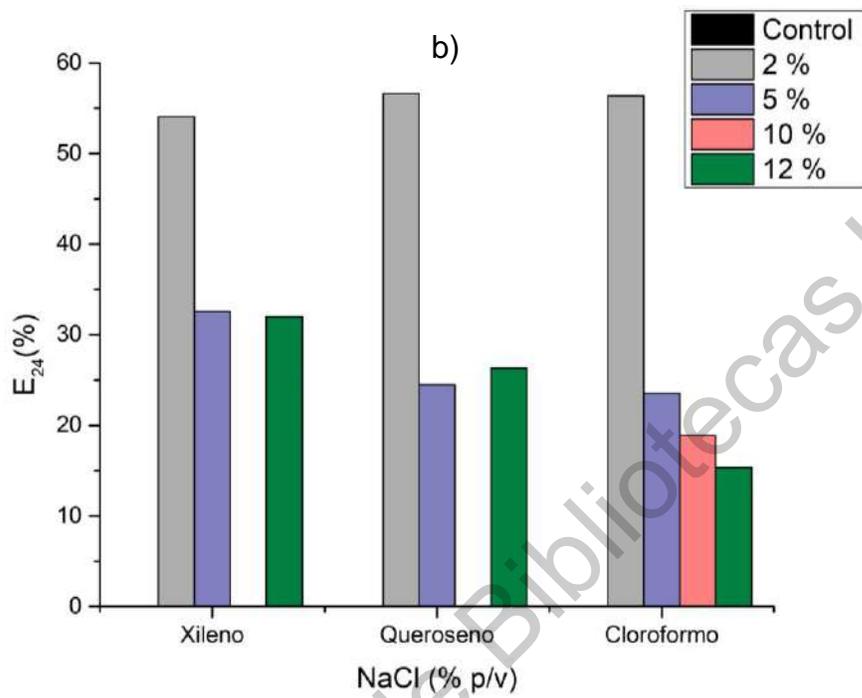


Figura 19. Evaluación y comparación de E₂₄ entre los diferentes HCs sobre el BT sintetizado. a) porcentaje de emulsión usando en el medio de cultivo FC petróleo y variando la concentración de NaCl; b) porcentaje de emulsión usando en el medio de cultivo FC glucosa y variando la concentración de NaCl; c) porcentaje de emulsión usando en el medio de cultivo FC glicerol y variando la concentración de NaCl

En el Cuadro 10 y la Figura 21 se observan los resultados obtenidos al modificar la relación C/N usando las condiciones salinas más favorables, en este caso, solo se lograron observar gotas de la emulsión y nula estabilidad (Figura 20), arrojando valores de ≥ 20.0 %. Esto puede ser debido a la poca producción de BT generado en estas pruebas debido a la fuente tan baja de N disponible para el microorganismo.

Cuadro 10. Efecto de la relación C/N sobre el E₂₄ empleando una FC y dos concentraciones de NaCl

	Relación C/N					
	Petróleo con 2.0 % NaCl					
	Control	12:1	14:1	16:1	18:1	20:1
	E ₂₄ (%)					
<i>Cloroformo</i>	0.0 ± 0.0	43.8 ± 2.1	24.6 ± 2.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0
<i>Xileno</i>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0
<i>Queroseno</i>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	57.7 ± 3.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0
	Petróleo con 5.0 % NaCl					
	Control	12:1	14:1	16:1	18:1	20:1
	E ₂₄ (%)					
<i>Cloroformo</i>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0 ± 0
<i>Xileno</i>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0
<i>Queroseno</i>	0.0 ± 0.0	21.5 ± 20.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0

En 2010 Silva *et al.* reportaron la producción de BT usando diferentes FC entre ellos petróleo y algunos de sus derivados. Los valores obtenidos fueron $\geq 70.0\%$ y la estabilidad de la emulsión se mantuvo después de 96 h de reposo.

Fisiológicamente, la producción de BT está asociada con el mecanismo de asimilación de sustratos hidrofóbicos, este mecanismo consiste en el contacto directo de las células con grandes gotas de aceite provocando baja o nula emulsión. El BT tiene la capacidad de retenerse en la superficie extracelular lo que facilita la unión y transporte de compuestos hidrófobos a la célula. También se puede tener contacto con pequeñas gotas de aceite provocando la formación de emulsiones, por lo que el BT libre en el medio de cultivo forma un complejo hidrocarburo-BT que solubiliza parcialmente los sustratos aumentando su disponibilidad para la célula (Jahan *et al.*, 2019).

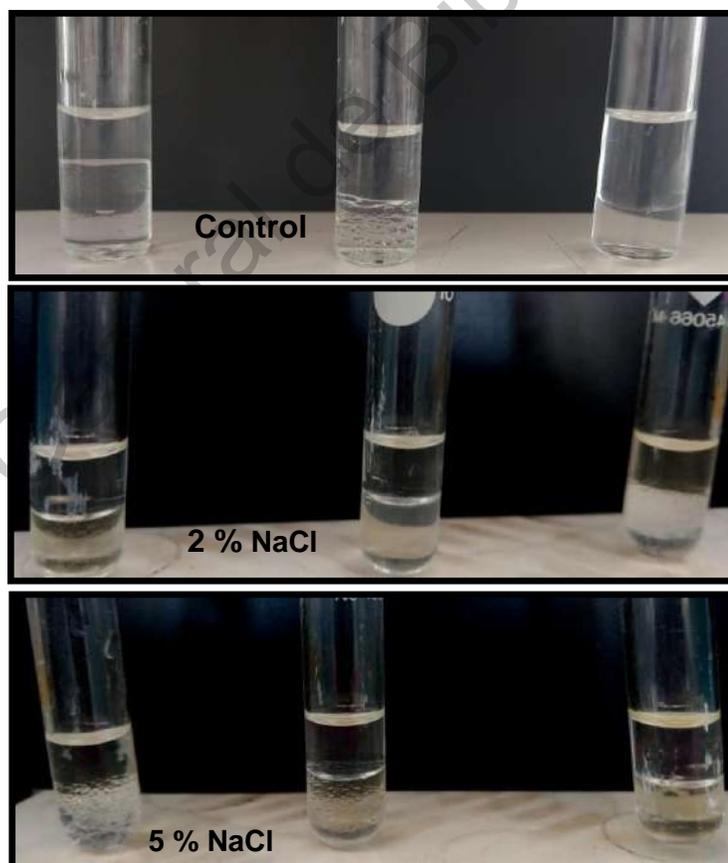


Figura 20. Efecto del BT sobre el E₂₄ modificando la relación C/N para observar su capacidad emulsionante. a) cloroformo; b) xileno; c) queroseno

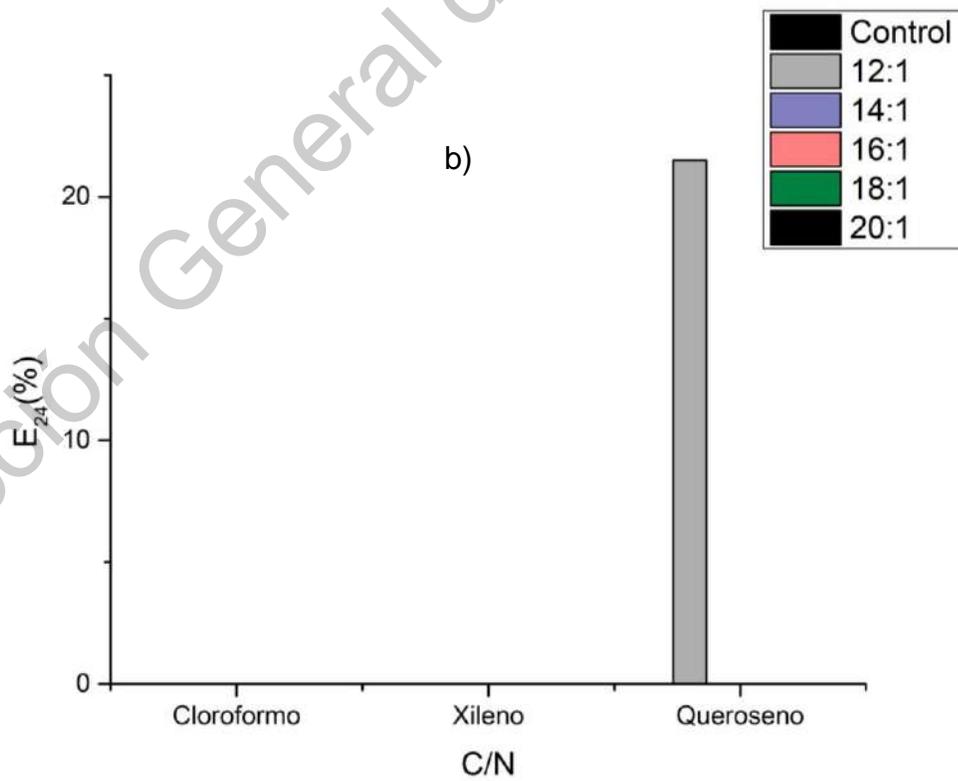
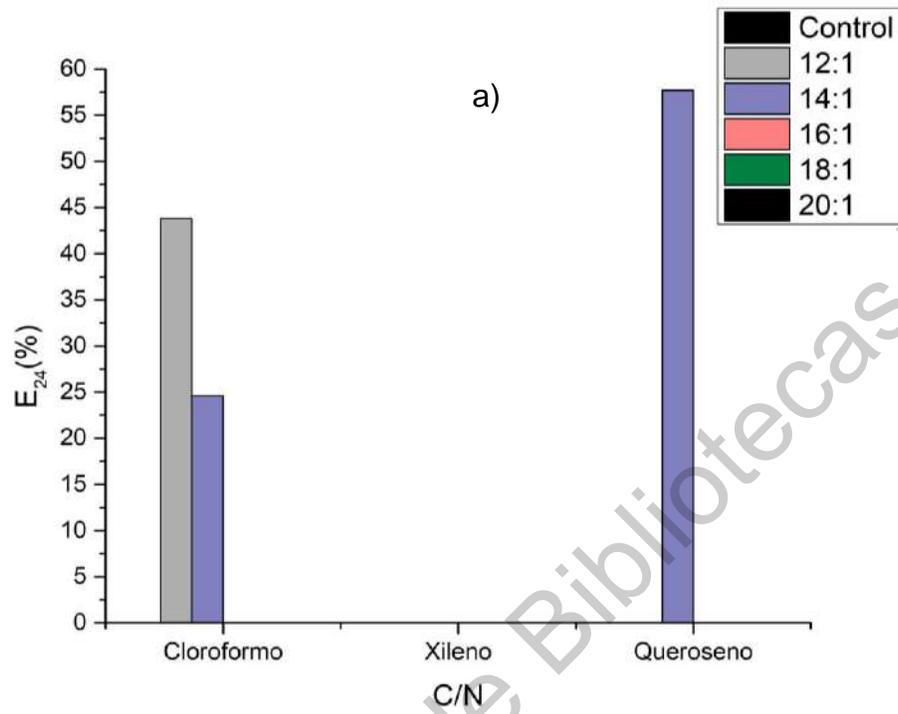


Figura 21. Evaluación y comparación de E₂₄ entre los diferentes HCs sobre el BT sintetizado modificando la relación C/N con a) 2.0 y b) 5.0 % de NaCl.

7.5. Lavado de suelos contaminados y determinación de HTP

Cuado se realizó el proceso de lavado se observó en el líquido recuperado en solución una coloración amarilla tenue, siendo la solución de lavado con BT la que más sobresalía con ese color. También hubo pérdidas del suelo de algunas repeticiones durante la recuperación del mismo, sin embargo, no afectó para llevar el método de extracción

Durante el proceso de extracción (Figura 22) se puede observar el cambio de color del hexano a amarillo, validando así de manera física, la extracción del hidrocarburo con el que se contaminó el suelo (HTP).

De las tres soluciones de lavado empleadas, el que obtuvo un mayor porcentaje de remoción en ambos suelos contaminados fue el sobrenadante con el BT sintetizado a partir de *Bacillus cereus*. Como se observa en el Cuadro 11 se obtuvo una remoción del 59.8 % ± 6.3 (3,200 ppm) y 64.5 % ± 7.4 (10,000 ppm). En el caso del TA sintético se obtuvieron remociones de 50.9 % ± 5.1 y 41.0 % ± 7.2.

Pourfadakari *et al.* (2019) realizaron la comparación de dos TA (ramnolípidos y Tween 80) para ver su efecto en la técnica de lavado de suelos. Realizaron el lavado en un suelo contaminado con HCs usando como solución de lavado el BT sintetizado a partir de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PF2. Una vez realizado el lavado de suelo, obtuvieron un porcentaje de remoción por parte del BT del 85-87 % y en el caso del TA sintético una remoción del 79-82 %. Concluyendo así la efectividad que poseen los BT sobre los TA sintéticos.

En el caso de aquellos que fueron lavados con el control (agua) y se observó cierto porcentaje de remoción (17.0 ± 2.8 y 1.6 ± 1.0), se considera que aquellos HCs conocidos como fracciones solubles en agua y componentes extras

que contiene el petróleo empleado, son los que pudieron ser removidos por medio de la extracción. Lai *et al.* (2009) obtuvieron resultados similares usando agua como solución de lavado en dos suelos contaminados en concentraciones cercanas a las empleadas por el grupo de trabajo (3,000 ppm y 9,000 ppm), dando como resultados de remoción del 20.4 % y 5.4 % respectivamente.



Figura 22. Sistema de extracción por el método Soxhlet para la remoción de HTP. a) sistema en secuencia de un equipo soxhlet; b) hexano puro; c) HTP extraído, diluido en hexano y d) HTP después de la evaporación de hexano.

En la Figura 23 puede observarse la comparación de las soluciones de lavado en los dos suelos contaminados, en donde la diferencia de porcentaje de remoción en cada uno es similar, y nos permite evaluar la eficacia del BT sobre el TA sintético.

Cuadro 11. Remoción de HCs mediante la técnica de lavado de suelo empleando tres soluciones de lavado.

Concentración de suelo contaminado (ppm)	Remoción de HTP (%) Soluciones de lavado		
	BT	Tween 20 (1 % v/v)	Agua
3,200	59.8 ± 6.3	50.9 ± 5.1	17.0 ± 2.8
10,000	64.5 ± 7.4	41.0 ± 7.2	1.6 ± 1.0

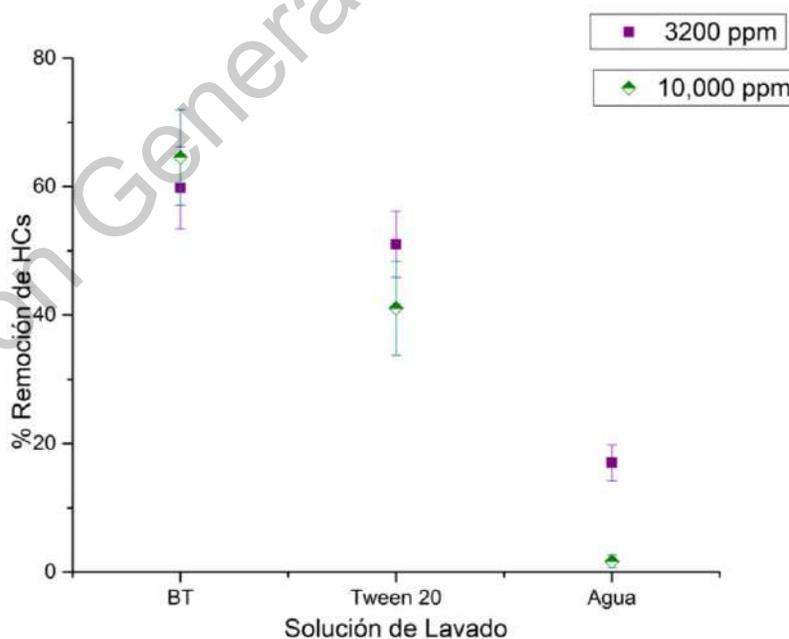


Figura 23. Porcentaje de remoción de HCs, de dos suelos contaminados empleando tres soluciones de lavado diferentes

7.5.1. Cromatografía en capa fina

Una vez realizado el lavado de suelo, al líquido recuperado se le realizó una prueba rápida de cromatografía en capa fina para determinar si hubo remoción de HCs.

Como se puede observar en la Figura 24 se revelaron compuestos en las tres soluciones de lavado (2, 3 y 4), éstas fueron comparadas con el control positivo que fue el petróleo (1). Los primeros tres compuestos en las cromatoplasmas a y b, corrieron a la misma distancia, indicando la presencia de HTP en estas soluciones de lavado. En el caso del agua se percibe un pequeño desplazamiento, pero puede deberse a aquellos compuestos contenidos en el petróleo que son solubles en agua, de acuerdo a la ficha de seguridad del petróleo con el que fue contaminado el suelo, el HC contiene sales que son los que se pudieron disolver con el agua.

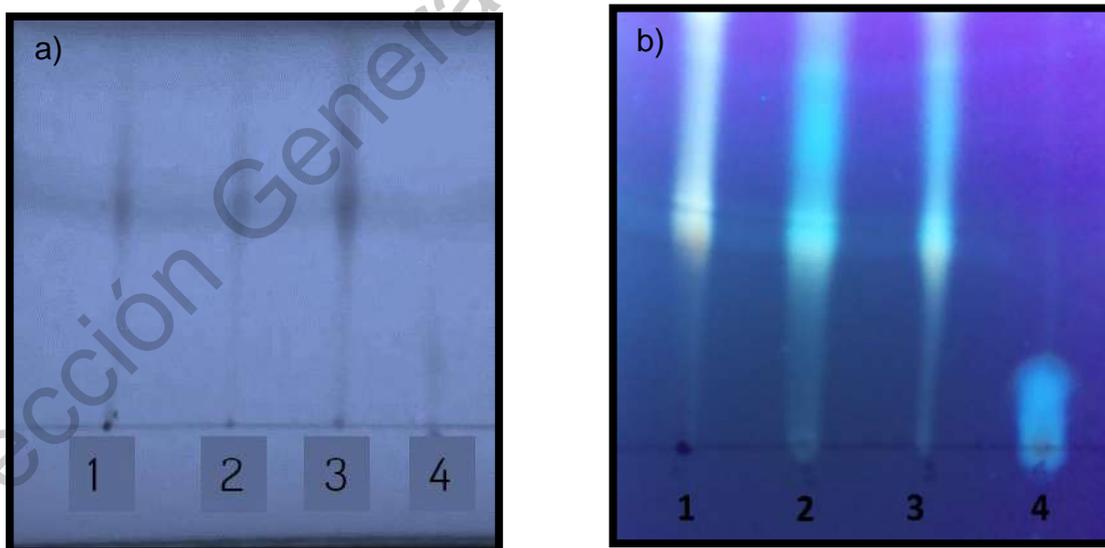


Figura 24. Cromatografía en capa fina a las soluciones de lavado después del lavado de suelo para comprobar si hubo remoción de HCs. a) cromatoplasma de suelo contaminado con 3200 ppm de HC; b) cromatoplasma de suelo contaminado a 10,000 ppm.

1) Petróleo; 2) BT; 3) Tween 20; 4) agua

Dirección General de Bibliotecas UAQ

8. CONCLUSIONES

La cepa *Bacillus cereus* aislada de un suelo salino ubicado en Zapotitlán Salinas Puebla, mostró capacidad productora de BT.

La FC y la concentración de NaCl en el medio marino tuvo un efecto sobre la disminución de la TS en el medio de cultivo en donde estaba sintetizado el BT.

El petróleo como FC promovió el crecimiento de *Bacillus cereus* en el medio de cultivo originando también la síntesis de BT disminuyendo la TS del medio de cultivo, así como la formación y estabilidad de emulsión.

La concentración de NaCl en CM tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de *Bacillus cereus*. Concentraciones inferiores a 5 % de NaCl favorecen tanto en la producción de la biomasa de *Bacillus cereus* como la disminución de la TS en el medio de cultivo.

La variación de la relación C/N tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de *Bacillus cereus* promoviendo así la síntesis de BT. La actividad del BT permitió una disminución de la TS en el medio de cultivo de 67 a 49 mN/m empleando la relación C/N 12:1. Sin embargo no resultó ser efectivo como agente emulsificante.

Se logró un porcentaje de emulsión mayor del 70 % al igual que una buena estabilidad después de 24 h empleando petróleo como FC y una concentración de NaCl de 2 % en el medio de cultivo.

Se logró una remoción ≥ 60 % del hidrocarburo con el BT sintetizado por *Bacillus cereus* en comparación de la contraparte química Tween 20 que

removió 20 % menos, por lo que el uso de la cepa *Bacillus cereus* para la síntesis de BT, es una opción viable para ser empleada en sitios contaminados con HCs para su remoción.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

9. REFERENCIAS

- Al-Hawash B., Dragh A., Li S., Alhujaily A., Abbod A., Zhang X. & Ma F. 2018. "Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment." *Egyptian journal of aquatic research*. 44(2):71–76.
- Al-wahaibi Y., Joshi S., Al-bahry S. & Elshafie A. 2014. "Biosurfactant production by *Bacillus Subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 114:324–33.
- 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: 143–151
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2016. Total, petroleum hydrocarbons. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU. https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts123.html
- Ali N., Bilal M., Khan A., Ali F. & Iqbal N. 2020. "Effective exploitation of anionic, noionic, and nonoparticles-stabilized surfactant foams for petroleum hydrocarbon contaminated soil remediation". *Science of the Total Environment*.19: 353-384
- Andreou V. 2013. "Preparation of genomic DNA from bacteria." *Methods in enzymology* 529:143–51.
- Asadollahi L., Hossein S. & Ning Y. 2016. "Investigation of biosurfactant activity and asphaltene biodegradation by *Bacillus Cereus*." *Journal of polymers and the environment* 24(2):119–28.
- Banat M., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti G., Fraccia L., Smyth J. & Marchant, R. 2010. "Microbial biosurfactants production, applications and future potential". *Appl Microbiol Biotechnology*.87: 427-44
- Befkadu A. & Quanyuan C. 2018. "Surfactant-Enhanced Soil washing for removal of petroleum hydrocarbons from contaminated soil". *Pedosphere*.28: 383-410.
- Bhattacharya M., Guchhait S., Biswas D. & Singh R. 2019. "Evaluation of a microbial consortium for crude oil spill bioremediation and its potential uses in enhanced oil recovery". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 18: 101-034
- Brown L., Colggi D. & Ulrich A. 2017". Biorremediation of Oil Spills on Land". *Oil Spill Science and Technology*. 2: 699-729.
- Burgos-Díaz C., Pons R., Teruel J.A., Aranda F.J., Ortiz A., Manresa A. & Marqués A.M. (2013). "The production and physicochemical properties of a biosurfactant mixture obtained from *Sphingobacterium detergens*", *Journal of Colloid and Interface Science*. 394: 368-379.
- Trejo-Castillo R., Martínez-Trujillo M.A. & García-Rivero M. 2014. "Effectiveness of crude biosurfactant mixture for enhanced biodegradation of hydrocarbon contaminated soil in slurry reactor". *Int. J. Environ. Res*.8 (3: 727-732
- Coutiño S.G., Villarreal W.A., González B.C, Sariñana P.B., Herrera M.M., Caceres R.R., López P.N., Lugo J., Paulín V.R., Del Aguila P. & Ocampo, Y.G. 2019. A bacterial strain of *Pseudomonas aeruginosa* B0406 pathogen opportunistic, produce a biosurfactant with toleranceto changes of pH, salinity and temperature. *Microbial Pathogenesis*.. 19:318

- Dell'Anno F., C. Sansone A. Ianora A. & Dell'Anno A. 2018. "Biosurfactant-induced remediation of contaminated marine sediments: current knowledge and future perspectives." *Marine Environmental Research*. 137:196–205.
- Dellagnezze M., De Sousa V., Martins L., Domingos F., Limache E.G., De Vasconcellos P., Da Cruz, F. & Oliveria M. 2014. "Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs." *Marine Pollution Bulletin* 89(1–2):191–200.
- Díaz M., Kenneth G., Steve G. & J. Grant B. 2002. "Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers." *Biotechnology and Bioengineering*. 79(2):145–53.
- Drakontis S. & Amin S. 2020. "Biosurfactant: Formulations, Properties and Applications". *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. COCIS 1354
- Elazzazy M., Abdelmoneim T. S. & Almaghrabi, O.A. 2015. "Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by Alkali-Halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia." *Saudi Journal of Biological Sciences*. 22(4):466–75.
- Elbl J., Plošek L., Kintl A., Hynšt J., Záhora J., Javoreková S., Charousová I., Akalhotka L. & Urbánková O. 2014. "Effects of drought on microbial activity in rhizosphere, soil hydrophobicity and leaching of mineral nitrogen from arable soil depending on method of fertilization." *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*. 8 (8):790–96.
- Ehinmitola O., Aransiola F. & Adeagbo P. 2018. "Comparative study of various carbon source on rhamnolipid production". *South African Journal of Chemical Engineering*. 26: 42-48.
- Fernandes P.L, Rodrigues E.M, Paiva F.R, Ayupe B.A, McInerney M.J & Tótola M.R.2016. "Biosurfactant, Solvents and polymer production by *Bacillus subtilis* RI4914 and their application for enhanced oil recovery". *Fuel*. 180: 551-557
- Fakruddin M. 2012. "Biosurfactant: Production and Application". *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*. 3:124
- Feng.Liu J., Mbadinga M., Yang Z.S., Gu D.J. & Mu Z.B. 2015. "Chemical Structure, Property and Potential Applications of Biosurfactants Produced by *Bacillus subtilis* in Petroleum Recovery and Spill Mitigation". *International Journal of Molecular Science*.16:4814-1837
- Geys R., Soetaert W. & Van Bogaert, I. 2014. "Biotechnological opportunities in biosurfactant production." *Current Opinion in Biotechnology*. 30:66–72.
- Geetha S.J. Banat M. & Joshi J. 2018. "Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR)". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 14: 23–32
- Ghoreishi G., Alemzadeh A., Mojarrad M. & Djavaheri M. 2017. "Bioremediation capability and characterization of bacteria isolated from petroleum contaminated soils in Iran." *Sustainable Environment Research*. 27(4):195–202.
- Gordon G., Stavi I., Shavit U., Rosenzweig R. 2018. "Oil spill effects on soil hydrophobicity and related properties in a hyper-arid region." *Geoderma*. 312:114–20.
- Gracida J., Ortega-Ortega J., Torres L.G., Romero-Avila M., & Abreu A. 2017.

- "Synthesis of anionic surfactant and their application in washing of oil-contaminated soil." *Journal of Surfactants and Detergents* 20(2):493–502.
- Haghollahi A., Hassan M. & Schaffie M. 2016. "The effect of soil type on the bioremediation of petroleum contaminated soils." *Journal of Environmental Management*. 180:197–201.
- Helmy Q., Laksmono R. & Kardena E. 2015. "Bioremediation of aged petroleum oil contaminated soil: from laboratory scale to full scale application." *Procedia Chemistry* 14:326–33.
- Henkel M., Hausmann. 2019. "Diversity and Classification of Microbial Surfactants". *Biobases Surfactants*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812705-6.00002-2>
- Jahan R., Bodratti M., Tsianou M., Alexandridis. 2019 "Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications". *Advances in Colloidal Interface Science*. 41-62
- Jiménez I., Moreno M., Gracida J. 2010. "Propiedades, aplicaciones y producción de biotensactivos". *Int Contam Ambiental* 26: 65-84
- Jimoh A.A., Lin J. (2019). "Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability". *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 184:109-607
- Karlapudi A., Venkateswarulu T.C., Tammineedi T., Kanumuri L., Ravuru K.B., Dirisala R.V. & Kodali P.V. 2018. "Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review." *Petroleum*. 4(3):241–49.
- Lamichhane S., Bal Krishna K.C., Sarukkalige R. (2017). Surfactant-enhanced remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *Journal of Environmental Management*. 199:46-61
- Lai C., Huang C., Wei HY. & Chang SJ. 2009. "Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil". *Journal of Hazardous Material*. 167:609-614
- Lee D.W., Lee H., Kwon B., Khim S., Yim H., Kim S. & Kim J. 2018. "Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from taean beach sediment." *Environmental Pollution*. 241:254–64.
- Logeshwaran P., Megharaj M., Chadalavada S., Bowman M., Naidu R. 2018. "Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: an overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches." *Environmental Technology and Innovation*. 10:175–93.
- López I., Iustman J. 2009. "Los biosurfactantes y la industria petrolera." *Química Viva* 145–209.
- Marollo R. 2016. "Microbiology of *Bacillus cereus*". The diverse faces of *Bacillus cereus*. *Biomed Reserch Internationa.l*
- Martín I., de la Haba R., Ventosa A., Congiu E., Ortega-Calvo J. & Moya L. 2014. "Colloidal and biological properties of cationic single-chain- and dimeric surfactants". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 114: 247-254
- Mehmood N., Olmos E., Marchal P., Goergen L. & Delaunay S. 2010. "Relation between pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis* power dissipation and volumetric gas-liquid mass transfer coefficient, K_{La} " *Process Biochemistry*. 45:1779-1786
- Mouafo H., Mbawala A., Ndjouenkeu R. 2018. "Effect of different Carbon Sources

- on Biosurfactants Production by Three Strains of *Lactobacillus spp*". Biomed Reserch International. <https://doi.org/10.1155/2018/5034783>
- Nagwa M., Hadry A., Eman A. 2014. "Biosurfactant production by Bacillus Cereus B7 from lubricant oil waste." *International Journal of Science and Research*. 3 :498–509.
- Ndimele E., Saba O., Ojo O., Ndimele C., Anetekhai A. & Erundu S. 2018. "Remediation of Crude Oil Spillage". *The Political Ecology of Oil and Gas Activities in the Nigerian Aquatic Ecosystem*. pp. 369-384. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809399-3.00024-0>
- Okoliegbe I.N. & Agarry O. 2012. Application of microbial surfactant (a review). *Scholar Journals of Biotechnology*. 1: 15-23
- Olasanmi O. I. & Thring W. R. 2018. The Role of Biosurfactants in the Continued Drive for Enviromental Sustainability. *Sustainability*. 10:148-157
- Plociniczak P.M., Plaza A.G., Seget P.Z. & Cameotra S.S. 2011. Enviromental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *Molecular Science*. 12: 633-654.
- Patowary R., Patowary K., Chandra M.K. & Deka S. 2018. "Application of biosurfactant for enhancement of bioremediation process of crude oil contaminated soil." *International Biodeterioration and Biodegradation*. 129:50–60.
- Pourfadakari S., Ahmadi M., Jaafarzadeh N., Takdastan A., Neisi A.A., Ghafar S. & Jorfi S. 2019. "Remediation of PAHs contaminated soil using a sequence of soil washing with biosurfactant produce by *Pseudomonas aeruginosa strain PF2* electrokinetic oxidation of desorbed solution, effect of electrode modification with Fe₃O₄ nanoparticles" *Journal of Hazardous Materials*. 379: 120
- Rabot E., Wiesmeier S., Schlüter L. & Voguel H. J. 2018. "Soil Structure as an Indicator of Soil Functions: A Review." *Geoderma*. 314:122–37.
- Ramirez D., Serrano, J.A., Sandoval, H. 2006. "Microorganismos extremófilos. actinomicetos halófilos en México." 56–71.
- Satpute S.K., Banat I.M., Dhakephalkar P.K., Banpurkar A.G. & Chopade A. 2010. "Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms." *Biotechnology Advances*. 28(4):436–50.
- Saharan B.S., Sahu R.K. & Sharma D. 2011. "A review of Biosurfactants: Fermentation, current Development and Perspectives". *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*. 1:119-136
- Santos F., Rufino D., Luna M., Santos A. & Sarubbo A. (2016)." Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century". *International Journal of Molecular Science*. 17:401
- Senthil S., Kumar G.C & Jayalakshmi S. 2017. "Aneurinifactin , a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine aneurinibacillus aneurinilyticus SBP-11 isolated from gulf of mannar : purification, characterization and its biological evaluation." *Microbiological Research*. 194:1–9.
- Silva S.N., Farias B., Rufino R.D., Luna J.M. & Sarubbo L.A. 2010. "Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa UCP0992*" *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 79: 174-183
- Siyal A., Shamsuddin R., Low A. & Rabat E. 2020. "A review on recent

- developments in the adsorption of surfactants from wastewater". *Journal of Environmental Management*. 254: 109
- Sharma R, Singh J. & Verma N. 2018. "Production, characterization and environmental applications of biosurfactants from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 16:132-139
- Souza E.C., Vessoni-Penna T.C. & De Souza Oliveira R.P. 2014. "Biosurfactant-Enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview." *International Biodeterioration and Biodegradation*. 89:88–94.
- Sujata S.J., Sanke, J. & Geetha S.J. 2016. Lipopeptides production by *Bacillus subtilis* R1 and its possible applications. *Brazilian Journal of microbiology*. 47: 955-964
- Ugalde D. 2018. "Aislamiento y caracterización de bacterias halotolerantes productoras de biotensoactivos" (tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro.
- Velázquez-Aradillas J., Toribio J., Chávez A., Bautista F., Cebrián E., García J., & Vázquez R. 2011. "Characterisation of a biosurfactant produced by a *Bacillus Cereus* strain tolerant to cadmium and isolated from green coffee grain." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27(4):907–13.
- Varjani J.S. 2017. "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons". *Bioresource Technology*. 223:277-286.
- Wijewardana S.N., Müller K., Moldrup P., Clothier B., Komatsu T., Hiradate S., de Jonge W., & Kaeamoto K. 2016. "Soil-water repellency characteristic curves for soil profiles with organic carbon gradients." *Geoderma*. 264:150–59.
- Widderick N., Rodrigues D.A, Commichau M.F., Fischer E.K., Ramirez-Guadiana H.F., Rudner Z.D. & Bremer E. 2016. "Salt-sensitive of σ^H and Spo0A prevents sporulation of *Bacillus subtilis* at high osmolarity avoiding death during cellular differentiation". *Molecular Microbiology*. 100 (1): 108-124.
- Wu M., Dick A., Li W., Wang X., Yang Q., Xu L., Zhang M. & Chen L. 2016. "Bioaugmentation and bioestimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil". *International Biodeterioration & Biodegradation*. 107:158-164
- Zamudio-Pérez E., Bandala E.R., Fernandez L.C. & Torres, L.G. 2013. "Surfactant enhanced washing of soil contaminated with petroleum hydrocarbons and treatment of produced wastewaters using a biofilter." *Journal of Environmental Treatment Techniques*. 1(2):110–16.
- Zhou W., Wang X., Chen C. & Zhu L. 2013. "Enhanced soil washing of phenanthrene by a plant-derived natural biosurfactant, *Sapindus saponin*". *Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 425:122-128