



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Evaluación de cepas bacterianas aisladas de espeleotemas con capacidad en la biorremediación mejorada por contaminación de hidrocarburos.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta:

I.A. Loyer Wanner Muñoz Silva

Dirigido por:

Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez

Querétaro, Qro. a octubre de 2021



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

**Evaluación de cepas bacterianas aisladas de espeleotemas con capacidad
en la biorremediación mejorada por contaminación de hidrocarburos**
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta:

I.A. Loyer Wanner Muñoz Silva

Dirigido por:

Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez.

Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez
Presidente

Dr. José Alberto Rodríguez Morales
Secretario

Dr. Aldo Amaro Reyes
Vocal

Dra. Carmen del Rosario Tamariz Angeles
Suplente

Dr. Víctor Eric López y López
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Octubre, 2021
México.

RESUMEN

La extracción y uso intensivo de hidrocarburos se ha incrementado a través de los años y con ello, la contaminación del agua y suelo. Entre las alternativas de remediación ambiental se tiene la aplicación de metabolitos biológicos capaces de solubilizar contaminantes haciéndolos biodisponibles como fuente de carbono para ciertos microorganismos. En este sentido, el objetivo de la presente investigación fue aislar cepas bacterianas de la gruta Los Herrera (Querétaro, México) con capacidad de sintetizar biotensoactivos que puedan emulsificar hidrocarburos. Se aislaron once cepas bacterianas con capacidad emulsificante sobre cloroformo, queroseno o xileno (meta (*m*) para (*p*) y orto (*o*) o-xilenos y etilbenceno) La cepa LM 08 fue seleccionada por presentar la mayor capacidad emulsificadora sobre el xileno. La producción de biotensoactivos fue optimizada ajustando las condiciones de cultivo mediante la metodología de superficie de respuesta. Los resultados mostraron que el cultivo de LM 08 a 29 °C, pH 7.02 y sin NaCl indujo la síntesis de biotensoactivos cuyo índice de emulsificación sobre xileno fue de 38 %; a partir de estas condiciones y ajustando nuevamente el cultivo a 175 rpm, 3.29 % de tamaño de inóculo e incubación por 5 días se logró mejorar la respuesta del índice de emulsificación (%) del xileno (*m*, *p*, *o*-xilenos y etilbenceno) hasta un 54 %. Asimismo, el biotensoactivo producido por LM 08 fue capaz de remover hidrocarburos presentes en suelo contaminado hasta un 43.5 % en 24 h; mientras que en el agua de mar la remoción de hidrocarburos fue del 11.9 % entre los 18 y 27 días, cuando se empleó la cepa LM 08 combinada con el biotensoactivo. Finalmente, la cepa LM 08 aislada y utilizada fue identificada como *Glutamicibacter endophyticus* y mostró ser una opción viable para sus aplicaciones en la remoción de HCs de sitios contaminados.

Palabras clave: Espeleotema, biotensoactivo, biorremediación, hidrocarburo, xileno.

SUMMARY

The extraction and intensive use of hydrocarbons has increased the contamination of water and soil over the years. Among the alternatives for environmental remediation is the application of biological metabolites capable of solubilizing pollutants, making them bioavailable as a carbon source for certain microorganisms. In this sense, the objective of the present investigation was to isolate bacterial strains from the cave "Los Herrera" (Querétaro, Mexico) with the capacity to synthesize biotensive agents that can emulsify hydrocarbons. Bacterial strains with emulsifying capacity were isolated once on chloroform, kerosene or xylene (m, p, o-xylenes, and ethylbenzene). The LM 08 strain showed the highest emulsifying capacity over xylene. The production of bio-surfactants was optimized by adjusting the culture conditions using the response surface methodology. The cultivation of LM 08 at 29 °C, pH 7.02 and without NaCl induced the synthesis of bio-surfactants whose emulsification index on xylene was 38 %; From these conditions and adjusting the culture again to 175 rpm, 3.29 % of inoculum size and incubation for 5 days, it was possible to improve the response of the xylene emulsification index (m, p, o-xylenes, and ethylbenzene) up to 54%. Likewise, the biosurfactant produced by LM 08 was able to remove hydrocarbons present in contaminated soil up to 43.5 % in 24 h; while in seawater the removal of hydrocarbons was 11.9 % between 18 and 27 days, when the LM 08 strain was used combined with the biosurfactant. Finally, the LM 08 strain isolated and used was identified as *Glutamicibacter endophyticus* and it proved to be a viable option for its applications in the elimination of HCs from contaminated sites.

Key words: Speleothem, biosurfactant, bioremediation, hydrocarbon, xylene.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE 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.

Dirección General de Bibliotecas UAO

DEDICATORIA

¡A Jehová!

*Si brillo, que sea tu brillo y no
el mío, sino brillo sabes que estoy
haciendo mi máximo esfuerzo.*

*Con la misma dedicatoria del 2014 (Huaraz, Perú),
ahora en el 2021, en otro lugar (Querétaro, México)
pero con el mismo sueño...*

AGRADECIMIENTOS

Un sincero agradecimiento al Gobierno de México y a la Agencia Mexicana de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AMEXCID) por otorgarme la Beca de Excelencia en el período 2019 – 2021.

Al Programa de la Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental de la Facultad de Química, Dr. Miguel Ramos, a mis profesores y compañeros de la siempre recordada y agradecida Universidad Autónoma de Querétaro (100 % UAQ).

Al Dr. Jorge Gracida Rodríguez, por confiar en mí, por permitirme conocerlo, por su apoyo incondicional y porque siempre quede una consulta pendiente por resolver y nunca se terminen. Siempre agradecido.

A Ella, siempre a Ella, a pesar de que hoy ya no estás aquí conmigo, cada día me sonríes en mis sueños y recuerdos. A mi Hno. Willy quién nunca dudó en apoyarme en mis metas y a mi Papá por siempre alentarme a continuar.

Al Dr. José Alberto Rodríguez Morales por sus enseñanzas, consideración y gran amistad. A los Drs. del comité evaluador: Aldo Amaro Reyes, Carmen Del Rosario Tamariz Ángeles y Víctor Erick López y López por sus aportes necesarios para la mejora continua del trabajo.

A Roxilitis, con mucho cariño y de manera muy especial, darte las gracias por hacerme parte de tu familia. A los tesisistas que continúan en ese afán de aportar a la ciencia del Laboratorio del Parque Biotecnológico - Planta Piloto. A Dana, Ana, Jessi y Dama por sus sugerencias en el proceso de experimentación. A Iván Arvizu por su apoyo en la construcción del árbol filogenético.

Al México lindo y querido, por mis inicios (26.07.2019) y porque cada día de los que vendrán siempre sean los mejores y a quienes están presentes y hoy me acompañan al término de esto: Katty, Bary, Gina, Alberto, Karina, Jonathan, Hoimar, Cielo y a la empresa COSAPI S.A. por las facilidades brindadas.

ÍNDICE

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE	vi
INDICE DE FIGURAS	ix
INDICE DE CUADROS	xi
ABREVIATURAS Y SIGLAS	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Demanda energética	2
2.2. Características del petróleo	2
2.3. México y la contaminación por petróleo	3
2.4. El Golfo de México	4
2.5. Métodos de tratamiento de hidrocarburos en agua y suelo	6
2.5.1. Lavado de suelos	8
2.6. Tensoactivos	8
2.7. Biotensoactivos (BT)	9
2.8. Bioproducción de tensoactivos	10
2.9. Biorremediación por microorganismos	14
2.10. Espeleotemas	14
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. OBJETIVOS	17
4.1. General	17
4.2. Específicos	17
5. HIPÓTESIS	18

6. METODOLOGÍA.....	19
6.1. Colecta de muestras de espeleotemas	19
6.2. Aislamiento de microorganismos.....	19
6.3. Evaluación de cepas bacterianas productoras de biotensoactivos	19
6.3.1. Cultivo de cepas aisladas	19
6.3.2. Evaluación del índice de emulsificación (E ₂₄) de cepas aisladas.....	20
6.4. Evaluación de sustratos inductores de biotensoactivos	21
6.5. Efecto de pH, temperatura y porcentaje de salinidad en la biosíntesis de tensoactivos de la cepa bacteriana seleccionada	22
6.5.1. Optimización de la temperatura, pH y NaCl	22
6.5.1. Optimización del tamaño de inóculo, velocidad de agitación y tiempo de incubación	24
6.6. Métodos analíticos para evaluar la producción de biotensoactivos.....	26
6.6.1. Evaluación de la dispersión en aceite	26
6.6.2. Test del colapso de gota	26
6.7. Identificación de cepa aislada	26
6.7.1. Extracción de ADN total	26
6.7.2. Amplificación del gen rRNA 16S	27
6.7.3. Análisis filogenético.....	27
6.8. Experimentos de biorremediación	27
6.8.1. Remoción de HCs	27
6.8.2. Intemperización de suelo arenoso	28
6.8.3. Lavado de suelos	28
6.8.4. Bioensayo en agua de mar	28
6.8.5. Cálculo de la remoción de petróleo en suelo arenoso y agua de mar	30
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES	31
7.1. Colecta de la muestra	31
7.2. Caracterización macroscópica de los microorganismos.....	32
7.3. Aislamiento e identificación de cepas bacterianas productoras de biotensoactivos.....	34
7.4. Efecto del sustrato inductor sobre el índice de emulsificación de xileno ...	36

7.5. Efecto de pH, temperatura y porcentaje de salinidad en la producción del biotensoactivo	39
7.5.1. Efecto sobre la producción de biomasa	39
7.5.2. Efecto sobre el índice de emulsificación del xileno	43
7.6. Efecto de la agitación, tamaño de inóculo y tiempo de fermentación en la biomasa y la biosíntesis de tensoactivos de la cepa bacteriana seleccionada	46
7.6.1. Efecto sobre la biomasa.....	46
7.6.2. Efecto sobre la emulsificación del xileno.....	51
7.7. Efecto de biotensoactivo sobre petróleo crudo	55
7.7.1. Desplazamiento en petróleo crudo.....	55
7.7.2. Test del colapso de la gota	55
7.7.3. Tensión superficial	56
7.8. Efectividad de la cepa bacteriana seleccionada y el biotensoactivo producido en procesos de biorremediación.....	57
7.8.1. Remoción de hidrocarburo de suelo contaminado	57
7.8.2. Degradación de hidrocarburos en agua de mar	58
7.8.3. Identificación molecular.....	59
8. CONCLUSIONES	62
9. REFERENCIAS	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.	Métodos de tratamiento de hidrocarburos en agua y suelo (Österreicher-Cunha et al., 2004).	7
Figura 2.2.	Representación esquemática en el arreglo de las moléculas de tensoactivo alrededor de la concentración micelar crítica (Jiménez et al., 2010).	9
Figura 2.3.	Estructura de BT: mono-ramnolípidos	13
Figura 2.4.	Estructura de BT: mono-diramnolípidos.....	13
Figura 6.1.	Bioensayos en agua de mar y tiempo de cultivo.....	29
Figura 7.1.	Colecta de la muestra	31
Figura 7.2.	Caracterización macroscópica de los aislados	32
Figura 7.3.	Cepa bacteriana LM 08 aislada.....	34
Figura 7.4.	Índice de emulsificación de las cepas bacterianas aisladas sobre hidrocarburos. Los valores son promedios de tres repeticiones \pm DS. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes. 35	35
Figura 7.5.	Efecto del sustrato inductor en la densidad óptica del crecimiento de LM 08. Los valores son promedios de tres repeticiones \pm DS. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha < 0.05$).	36
Figura 7.6.	Efecto del sustrato inductor en el índice de emulsificación (%) de xileno, queroseno, diésel y cloroformo por parte de LM 08. Los valores son promedios de tres repeticiones \pm DS. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha < 0.05$).	38
Figura 7.7.	Gráficas de contorno y superficies de respuesta 3D que muestran la interacción entre (A-B) la temperatura y pH, (C-D) temperatura y NaCl, y (E-F) pH y NaCl en la producción de biomasa de LM 08.	42
Figura 7.8.	Gráficas de contorno y superficies de respuesta 3D que muestran la interacción entre (A-B) la temperatura y pH, (C-D) temperatura y NaCl, y (E-F) pH y NaCl en el índice de emulsificación del xileno por la cepa LM 08.	45
Figura 7.9.	Condiciones de temperatura, pH y NaCl para la optimización del índice de emulsificación del xileno (E24).....	46

Figura 7.10. Gráficas de contorno y superficies de respuesta 3D que muestran la interacción entre (A-B) la agitación e inóculo, (C-D) agitación y tiempo y (E-F) inóculo y tiempo en la producción de biomasa de la cepa LM 08.	50
Figura 7.11. Gráficas de contorno y superficies de respuesta 3D que muestran la interacción entre (A-B) la agitación e inóculo, (C-D) agitación y tiempo y (E-F) inóculo y el índice de emulsificación (%) del xileno por la cepa LM 08.	53
Figura 7.12. Condiciones de agitación, cantidad de inóculo y tiempo de incubación para la optimización del índice de emulsificación del xileno	54
Figura 7.13. Desplazamiento de petróleo por acción del BT	55
Figura 7.14. Colapso de gota por acción del BT	56
Figura 7.15. Medición de la tensión superficial del sobrenadante	56
Figura 7.16. Remoción (%) del hidrocarburo del suelo contaminado durante 24 h usando agua, Tween 20 y BT de la cepa LM 08.....	58
Figura 7.17. Degradación del hidrocarburo del agua marina	59
Figura 7.18. Árbol filogenético construido para la cepa LM 08.	60

INDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1. Número de tomas clandestinas en las entidades federativas con mayor incidencia.....	4
Cuadro 2.2. Principales biotensoactivos y microorganismos productores respectivos.....	11
Cuadro 6.1. Sustratos inductores de biotensoactivos para cada medio de cultivo.	22
Cuadro 6.2. Variables (temperatura, pH y NaCl) y niveles (mínimo y máximo) del diseño experimental central compuesto.....	23
Cuadro 6.3. Factores (temperatura, pH y NaCl), corridas experimentales y repeticiones del diseño central compuesto usado para producción de biomasa y emulsificación del xileno (m, p, o-xilenos y etilbenceno). 23	
Cuadro 6.4. Variables (agitación, inóculo y tiempo) y niveles (mínimo y máximo) del diseño experimental central compuesto.....	24
Cuadro 6.5. Factores (agitación, inóculo y tiempo), corridas experimentales y repeticiones del diseño central compuesto usado para producción de biomasa y emulsificación del xileno (m, p, o-xilenos y etilbenceno). 25	
Cuadro 7.1. Efecto de la temperatura, pH y NaCl sobre la densidad óptica e índice de emulsificación del xileno.....	39
Cuadro 7.2. Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de respuesta de superficie cuadrática de la producción de biomasa de la cepa LM 08.	41
Cuadro 7.4. Efecto de la agitación, inóculo y tiempo sobre la biomasa y emulsificación del xileno.	47
Cuadro 7.5. Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de respuesta de superficie cuadrática de la producción de biomasa de LM 08.	48
Cuadro 7.6. Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de respuesta de superficie cuadrática del índice de emulsificación del Xileno por la cepa LM 08.	52

ABREVIATURAS Y SIGLAS

HCs	Hidrocarburos
BT	Biotensoactivos
TS	Tensión superficial
TI	Tensión interfacial
CMC	Concentración micelar crítica
mN/m	Mili Newton por metro
FC	Fuente de carbon
HTP	Hidrocarburos totales de petróleo
E ₂₄	Índice de emulsificación
mgL ⁻¹	Miligramos por litro
rpm	Revoluciones por minuto
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
P	Fósforo
N	Nitrógeno
NaCl	Cloruro de sodio
p/v	Peso/volumen
v/v	Volumen/volumen
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
UFC	Unidades formadoras de colonias
mM	Milimolar
mm	Milímetros
°C	Grados Celsius
μL	Microlitros
gL ⁻¹	Gramos por litro
mL	Mililitros
ppm	Partes por millón
ANOVA	Análisis de varianza
DS	Desviación estándar

1. INTRODUCCIÓN

La demanda mundial de energía fósil se ha ido incrementando de la década del 2000 – 2020, enfocando la explotación de hidrocarburos en aumentar la vida útil de producción de los yacimientos (Organización de países exportadores de petróleo, 2018), al mismo tiempo su liberación accidental o intencionada en el ambiente, ha provocado efectos adversos. Referente al uso energético intensivo del petróleo, en los yacimientos se están utilizando tensoactivos sintéticos para su recuperación, debido a las propiedades anfífilas (Joy et al., 2017). Éstos interactúan con la superficie interfacial del petróleo y el suelo, reduciendo su viscosidad e incrementado su movilidad, facilitando su extracción, pero los tensoactivos químicos son peligrosos, no biodegradables y afectan los ecosistemas cercanos (Bezerra et al., 2018). Los biotensoactivos están teniendo trascendencia sobre los químicos, su compatibilidad con el ambiente, menor toxicidad, biodegradabilidad, aceptabilidad ecológica los convierten en una alternativa de aplicación (Mukherjee et al. 2006; Thavasi et al., 2011).

Los hidrocarburos poseen una escasa o nula solubilidad en agua, lo que dificulta su biodegradación. En estas condiciones algunos microorganismos pueden producir algún agente emulsionante para solubilizarlos y por ende aumentar su biodisponibilidad (Saikia et al., 2012). El uso de tensoactivos (biológicos y sintéticos) disminuyen la viscosidad del petróleo, uno de los mecanismos utilizados para la recuperación mejorada de petróleo. Hábitats únicos en el mundo con presencia de espeleotemas albergan microbiota poco estudiada y de interés científico debido a su endemismo e importantes adaptaciones adquiridas durante su evolución (Galán et al., 2020).

En el presente trabajo se evaluó la capacidad del biotensoactivo de cepas bacterianas aisladas de espeleotemas utilizando residuos de aceite de cocina como fuente de carbono, valores de emulsificación y su aplicación en la biorremediación en suelos y agua de mar contaminados con hidrocarburos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Demanda energética

A nivel mundial se ha usado de manera intensiva el petróleo como componente clave para las diferentes actividades y acciones humanas. Esto como fuente de energía y en la utilización como materia prima para la producción de diversos compuestos, lo que justifica su alta demanda creciente y sus inversiones en su exploración (Grid-Arendal, 2014).

La evolución de la economía en el mundo entero en procesos de energía tiene su base en el petróleo y sus derivados, ocasionando así un rol importante en los capitales económicos de los países y una dependencia coligada con el suministro energético, especialmente por los estados y países del hemisferio norte (Enerdata, 2013).

2.2. Características del petróleo

En su etimología la palabra petróleo deriva de las raíces latinas petro, roca y óleum, aceite, lo que gramáticamente significa aceite de roca. Es una mezcla de hidrocarburos, compuesta por carbono (C) e hidrógeno (H). Su clasificación comprende: alifáticos, asfaltenos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (Redman et al. 2012). Contiene en algunas de sus estructuras nitrógeno, oxígeno, azufre y metales (níquel y vanadio, principalmente). El petróleo varía su composición dependiendo del tipo de yacimiento de donde provenga, lo que le otorga características de viscosidad y densidad (ligero o pesado) (Yañez y Wong, 2013). Mientras mayor sea el contenido de carbono en relación con el hidrógeno, mayor es la cantidad de productos pesados como: combustibles, lubricantes, ceras o disolventes (Huirache-Acuña et al., 2014). Canadá, Venezuela, Medio Oriente y Rusia, albergan las mayores reservas de crudo y basan su economía principal en su explotación (Schlumberger, 2016). En México se cuenta con un total de 7.2 miles de millones de barriles de petróleo,

que representa el 0.2 % de las reservas globales (British Petroleum, 2018), teniendo en mayor cantidad petróleos pesados con un 58.8 % (SENER, 2017).

2.3. México y la contaminación por petróleo

La polución ambiental con petróleo y productos petroquímicos es reconocida como uno de los problemas actuales de mayor relevancia (Jain et al. 2011). En México existen espacios contaminados con hidrocarburos procesados del petróleo, debido a derrames, así como a las actividades y acciones propias de la explotación petrolera. Esto ha ocasionado pérdidas por más de 50 mil millones de dólares en los últimos 20 años, con mayor incidencia en dos aspectos: ambiental y agrícola (Cavazos et al., 2014). Éstos se acumulan en ecosistemas marinos y terrestres, siendo responsables del deterioro de suelos contaminados como resultado de eventos no deseados en las tareas de exploración, refinación, falta de mantenimiento y robo de combustible (Cavazos et al., 2014).

De acuerdo con datos de Petróleos Mexicanos (PEMEX), al 2018, Puebla e Hidalgo presentaron más de 2000 fugas por cada Estado como tomas clandestinas. Un ejemplo de contaminación son los derrames petroleros en suelo y agua. En el caso del suelo, se impide la realización del intercambio gaseoso del suelo con la atmósfera, e iniciando, procesos fisicoquímicos simultáneos como evaporación y penetración. Además, en el suelo se presentan fenómenos de adsorción hacia la matriz que lo conforma y a su vez, con su desplazamiento pueden alcanzar aguas subterráneas, no permitiendo su uso para la agricultura y todas las actividades humanas (Asalde y Enríquez, 2015). Es así como actividades ilícitas como el “huachicoleo” (robo) es un factor que contribuye a la contaminación de zonas agrícolas y mantos hídricos, por donde pasa el ducto de recolección del crudo, generando conflictos sociales y ambientales (Pérez-Juárez, 2019).

En concordancia con el reporte de la Comisión Nacional de Hidrocarburos, de

2006 hasta 2012, Puebla es el cuarto estado con mayor cifra de derrames de petróleo a nivel nacional, con un total de 6.91 de billones de barriles derramados como registro histórico (Comisión Nacional de Hidrocarburos, 2013). Según Peschard et al., (2020) se puede observar en el Cuadro 2.1, el robo de combustible se ha convertido en un negocio redondo debido al aumento del número total de tomas clandestinas desde 2000 hasta el 2018, siendo Puebla, Guanajuato, y Tamaulipas; los estados con mayores índices. Los ocho estados donde las cifras del robo pasaron en 18 años de uno o dos dígitos a cuatro, concentran 79.25 % del total de tomas del país.

Cuadro 2.1. Número de tomas clandestinas en las entidades federativas con mayor incidencia

Entidad	Número de tomas clandestinas: 2000	Número de tomas clandestinas: 2018	Número total de tomas clandestinas (Período 2000-2018)
Estado de México	10	1507	4272
Guanajuato	13	1915	6748
Hidalgo	30	2111	4180
Jalisco	7	1549	3570
Puebla	15	2072	6653
Sinaloa	3	425	2174
Tamaulipas	9	1301	5828
Veracruz	27	1538	5275

Fuente: elaboración propia con base a lo publicado por Peschard et al., (2020)

2.4. El Golfo de México

El petróleo puede integrarse al ambiente de modo natural a través de afloramientos o emanaciones naturales mejor conocidos como chapopoterías o por derrames y accidentes ocasionados por el hombre, lo cual es tal vez, una de las procedencias más importantes (Scholz-Böttcher et al., 2008). El Golfo de México es una cuenca marina, limitada al norte por los Estados Unidos (EE.

UU.) y en el oeste por los mexicanos: costa de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán y al norte de Quintana Roo. Importantes sistemas fluviales y cuencas hidrográficas drenan en el área desde 25° 57'15"N y 97° 08'00"O a 21° 36'17"N y 87°06'15"W (INEGI, 2015). En 2010, en aguas profundas del norte del Golfo de México en la plataforma petrolera "Deepwater Horizon" ocurrió una gran explosión y el posterior hundimiento de la plataforma de perforación DWH, ubicada a 60 km de la costa de sureste de Louisiana. El hecho ocasionó la liberación de un estimado 3.19 millones de barriles (134 millones de galones) de petróleo crudo y 1,84 millones de galones de dispersantes en el norte del Golfo de México durante un período de tres meses, datos emitidos por DWH-NRDA (*Deepwater Horizon - Natural Resource Damage Assessment*, 2016; Lane et al., 2015). Un suceso anterior al 2010, también en el Golfo de México, en la sonda de Campeche (área marítima) se vertieron 560 millones de litros de crudo en el año de 1979, contaminando la costa de Campeche, Veracruz y otros estados. Ya han transcurrido más de 30 años del accidente, y aún se pueden encontrar en las costas de Campeche restos del petróleo derramado, lo que causan mortandad en peces y en otros organismos (Schrope, 2010).

Según Michel et al. (2013) mencionan que el derrame condujo a la contaminación directa de 1,600 km al norte de humedales, costas e islas de barrera, desde el oeste de Louisiana hasta el Panhandle de Florida e impactos desconocidos de aguas profundas y ecosistemas bentónicos. Varios años después de estos hechos, existen restos del derrame y sus efectos aún eran evidentes (Smith et al., 2017).

En el 2011 se realizaron evaluaciones de salud de delfines nariz de botella, en dos lugares dentro del norte del Golfo de México - Barataria Bahía, LA (BB), un área que recibió derrame de crudo en sus aguas, y una zona sin impacto - sitio de referencia Sarasota Bahía, FL (SB) donde no se observó la presencia de petróleo (Schwacke et al., 2014). Exámenes veterinarios de delfines en BB,

reportaron una grave enfermedad pulmonar, bajos niveles de hormonas suprarrenales, cuerpos con mala apariencia física, presentando diferentes inflamaciones que eran inexistentes o menos prevalentes en delfines de SB y otras ubicaciones del Atlántico occidental no afectadas por el petróleo (Schwacke et al., 2014). Evaluaciones de salud posteriores de delfines nariz de botella en la BB en 2013 y 2014 descubrieron que la enfermedad pulmonar y la respuesta al estrés deteriorada persistió durante al menos 4 años después del derrame (Smith et al., 2017). Por razones como la contaminación derivada de actividades con hidrocarburos, se han buscado técnicas enfocadas al favorecimiento de extracción y degradación del petróleo.

Por consiguiente, es importante aumentar la movilidad y solubilidad de éste en medio acuoso, lo permitirá su uso en procesos asociados a biorremediación.

2.5. Métodos de tratamiento de hidrocarburos en agua y suelo

Las tecnologías actuales para tratamiento de aguas y suelos contaminados con hidrocarburos han sido fundamentales en estos procesos. La selección de éstas evalúa la efectividad, el tiempo de proceso y la posterior rehabilitación del lugar contaminado (Gavrilescu et al., 2009). La Figura 2.1 esquematiza de manera simple algunos de las tecnologías de tratamiento de hidrocarburos en agua y suelo.

Para el agua contaminada con hidrocarburos existen tratamientos químicos, físicos y biológicos. Este último, permite la utilización de microorganismos específicos para la biodegradación *in situ* (Befkadu y Chen, 2018).

Estos métodos biológicos actúan positivamente para tratar y degradar compuestos de hidrocarburos (Dzionic et al., 2016). Por eso es de gran interés el uso de microorganismos en numerosos lugares con sitios que aún requieren tratamiento (Mosa et al., 2016).

Para la recuperación de suelos contaminados, existen algunas técnicas *in situ*, que actúan sobre los contaminantes: bioventilación, inyección de aire en zona no saturada, mientras que bioestimulación se trabaja en la zona saturada al igual que la fitorremediación, lo anterior para evitar el costo de excavación y transporte (Balba et al., 1998; Malina et al., 1999; Österreicher-Cunha et al., 2004). Por otro lado, los tratamientos *ex situ*, biopilas y biorreactor (Plaza et al., 2005), o mixto como el lavado de suelos (Hejazi, 2002; Thorn y Kennedy, 2002) y lodos biológicos (Zhang et al., 2001) requieren de costos adicionales por el transporte del material contaminado. A diferencia de otras técnicas ya establecidas convencionales *in situ* como la aplicación y adición de productos químicos de manera directa, además de conseguir una recuperación más completa de la zona afectada no requiere costo asociado al transporte. Todo ello estará en función de los objetivos que se quieren alcanzar a la hora de recuperar un suelo contaminado (Kaifer et al., 2004).

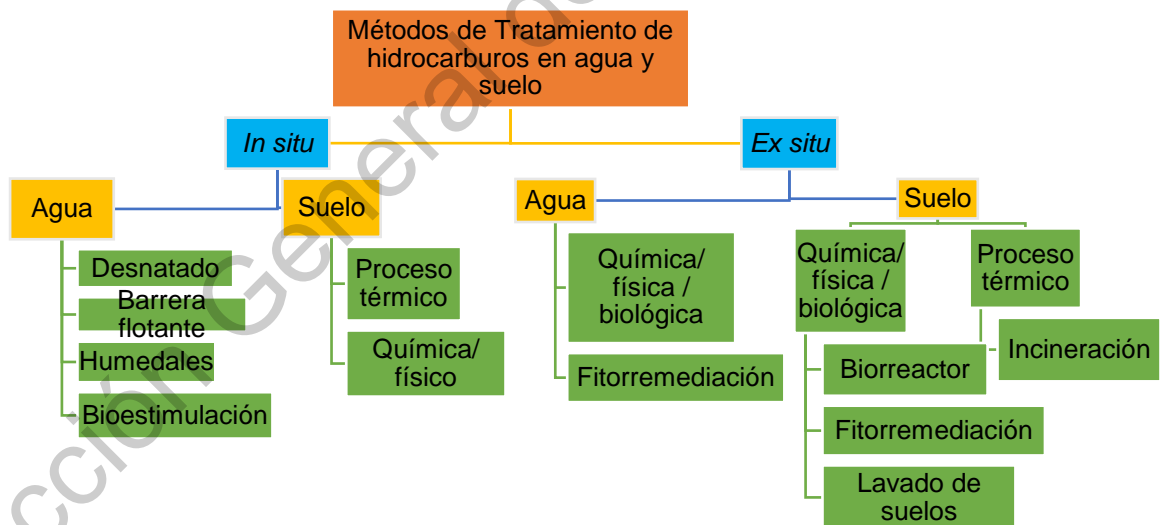


Figura 2.1. Métodos de tratamiento de hidrocarburos en agua y suelo (Österreicher-Cunha et al., 2004).

2.5.1. Lavado de suelos

Es un tratamiento característico porque su aplicación puede ser *in situ* o *ex situ*, promoviendo la remoción del contaminante (hidrocarburos) presentes en suelos utilizando una solución que facilite su disponibilidad para su retiro (Souza et al., 2014; EPA, 2006). *In situ* consiste en la inyección de soluciones de lavado (TA y BT) siendo su finalidad la remoción del contaminante hidrófobo, es decir hacerlo disponible para su eliminación (Ndimele et al., 2018). Mientras que *Ex situ* refleja el traslado del material contaminado hacia un punto de lavado exterior a donde ocurrió el accidente ambiental, aplicando tensoactivos que permiten el arrastre por gravedad del contaminante. (Befkadu y Chen, 2018).

2.6. Tensoactivos

Son moléculas anfipáticas con una fracción hidrofílica y otra hidrofóbica; cuando se aúnan con otras sustancias, se localizan preferentemente en las interfaces. Por ejemplo, en fluidos con diferentes grados de polaridad como son la de aceite-agua o aire-agua (Jiménez et al., 2010). Estos compuestos poseen propiedades tensoactivas, emulsificantes y dispersantes. Reducen la tensión superficial y la tensión interfacial, lo que aumenta la solubilidad y movilidad de compuestos hidrófobos e insolubles (Vijayakuma y Saravanan, 2015) Siendo ésta una de sus principales propiedades para su aplicación en el área de la biotecnología ambiental para la remoción y biodegradación de contaminantes (Rocha y Silva et al., 2018b; Silva et al., 2014b). Debido a la presencia de un tensoactivo, se requiere menos energía para llevar una molécula a la superficie y la tensión superficial se reduce. Por ejemplo, un buen tensoactivo puede reducir la tensión superficial del agua de 72 a 35 mN/m, y la tensión interfacial para agua contra n-hexadecano de 40 a 1 mN/m (Muthusamy et al., 2008).

La concentración de tensoactivos en la que se consigue la mínima tensión superficial es nombrada concentración micelar crítica (CMC); y ahí se forma la

primera micela. De acuerdo con Jiménez et al. (2010), la CMC es un parámetro característico para cada tensoactivo. En la Figura 2.2 muestra una representación esquemática del tensoactivo (I), alineación de monómeros (II), ordenación de la estructura micelar (III) y la disposición cilíndrica de micelas (IV) de las moléculas de tensoactivo alrededor de la concentración micelar crítica (CMC) (Jiménez et al., 2010).

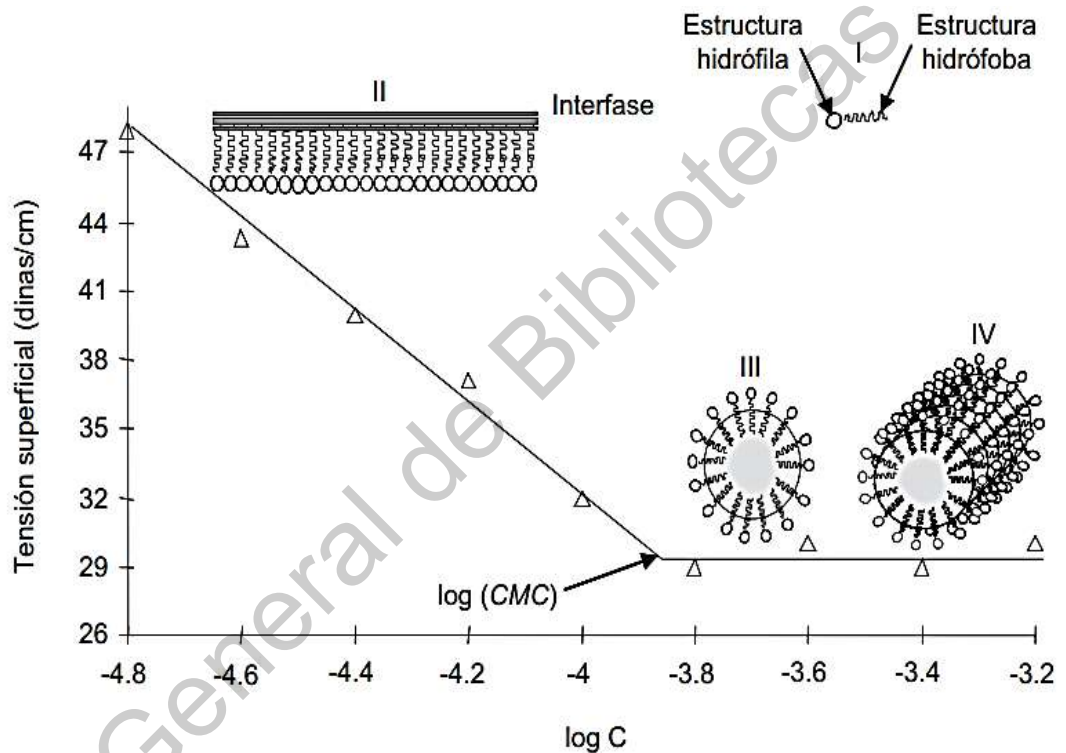


Figura 2.2. Representación esquemática en el arreglo de las moléculas de tensoactivo alrededor de la concentración micelar crítica (Jiménez et al., 2010).

2.7. Biotensoactivos (BT)

Son biomoléculas complejas producidas y secretadas o como parte de la membrana celular por bacterias, levaduras, hongos y algunas plantas, siendo las bacterias las que producen más y en mayor cantidad (Mulligan, 2005). Poseen propiedades únicas: baja toxicidad, valores bajos de concentración

micelar crítica (CMC), mayor selectividad y bajos costos de producción (Chandankere et al., 2013). Son un grupo diverso de moléculas de superficie activa, consisten principalmente de: lipopéptidos y lipoproteínas, glicolípidos, ácidos grasos, fosfolípidos, lípidos naturales, poliméricos y particulados (Kiran et al., 2010).

Para determinar la producción de BT dada por un microorganismo se lleva a cabo la cuantificación de la actividad de emulsión (índice de emulsificación o también conocida como E_{24}), reducción de la tensión superficial (método del anillo de Du Nouy), ensayo hemolítico, dispersión de aceite y el colapso de gota (Jadhav et al., 2013; Pandey y pstsnsyek, 2013; Dhasayan et al., 2015).

2.8. Bioproducción de tensoactivos

Diversos microorganismos por su ubicuidad manifiestan una capacidad de estar en diferentes ecosistemas para la producción de tensoactivos asociados a diferentes intervalos de pH, temperaturas, porcentajes de salinidad y utilizan diversas fuentes de carbono que incluyen azúcares simples, aceites vegetales y alcanos entre otros (Sobrinho et al., 2014). Se han aislado varios microorganismos productores de tensoactivos en lugares muy distintos entre sí: campos petrolíferos, yacimientos de petróleo, aguas subterráneas y superficiales, además de suelos contaminados, etc.

Cuadro 2.2. Principales biotensoactivos y microorganismos productores respectivos

Biotensoactivo	Microrganismo	Referencia
Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Amani et al., 2013
Soforolípidos	<i>Torulopsis bombicola</i>	Imura et al., 2014
	<i>Candida bombicola</i>	Solaiman et al., 2007
Trehalolípidos	<i>Rhodococcus</i> sp.	Kuyukina et al., 2015
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Urum y Pekdemir, 2004
Péptido-lipídico	<i>Bacillus licheniformis</i>	Yakimov et al., 1995
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>	Amani et al., 2013
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bach et al., 2003
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	Liu et al., 2015
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Goldman et al., 1982
Mannan-lípido-proteína	<i>Candida tropicalis</i>	Chen et al., 2011
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>	Anaukwu et al., 2015
Carbohidrato-proteína-lípidos	<i>Microbacterium</i> sp.	Camacho-Chab et al., 2013
Lípidos de celobiosa	<i>Ustilago maydis</i>	Morita et al., 2007
Liquenina	<i>Bacillus licheniformis</i>	Qiu et al., 2014
Glicolipopéptido Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Goldman et al., 1982
Glicolipopéptido - Microbactan	<i>Microbacterium</i>	Camacho-Chab et al., 2013

Estos biotensoactivos son efectivos, con algunas ventajas distintas sobre los de origen sintético, incluidos la especificidad, biodegradabilidad y biocompatibilidad (Rufino et al., 2014). Pueden mejorar la biodisponibilidad o la accesibilidad a los HAPs (hidrocarburos aromáticos policíclicos). Abalos et al. (2004) mencionan la existencia de poblaciones microbianas degradadoras de hidrocarburos pueden mejorar la biodisponibilidad de estos compuestos insolubles (HAPs) a través de la biosíntesis (Kanga et al., 1997; Ron y Rosenberg 2001; Ron y Rosenberg 2002). Un grupo de biotensoactivos que se ha estudiado ampliamente, son los ramnolípidos (Maier et al., 2000). *Pseudomonas aeruginosa* y otras bacterias pueden producirlos a partir de diferentes sustratos carbonados: alcanos, succinato, piruvato, citrato, fructosa, glicerol, aceite de oliva, glucosa y manitol por citar algunos (Santa Anna et al., 2002).

Valores de tensión superficial de hasta 29 mN/m se han registrado en los medios de cultivo con estos compuestos. Pueden ser de dos tipos, monoramnolípidos (Ver Figura 2.3) con una molécula de ramnosa unidas a ácido b-hidroxidecanoico; los diramnolípidos con dos moléculas de ramnosa (Ver Figura 2.4). Estudios buscan su aplicación en el mejoramiento de la biorremediación en general (De Sousa et al., 2011).

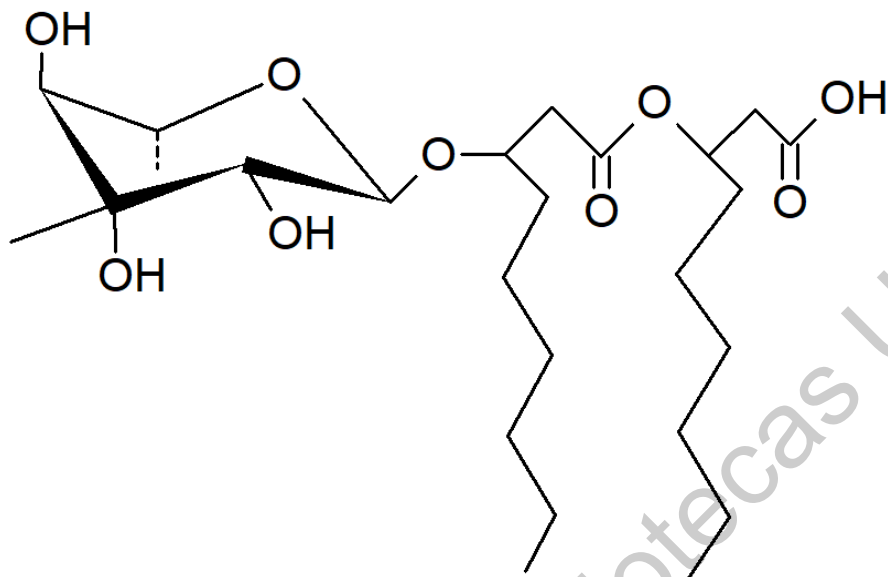


Figura 2.3. Estructura de BT: mono-ramnolípidos

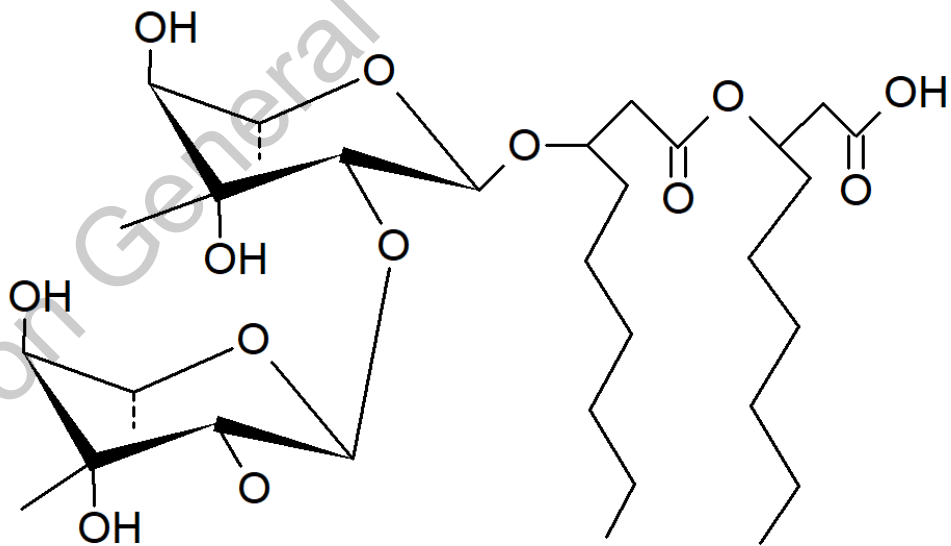


Figura 2.4. Estructura de BT: mono-diramnolipidos

2.9. Biorremediación por microorganismos

Ésta es una técnica de recuperación de áreas impactadas que utiliza tecnologías que estimulan la biodegradación del contaminante por bioprocesos. El uso de microorganismos específicos en la biorremediación, muestran su importancia prometedora en la biodegradación de hidrocarburos (Lnawniczak et al., 2013). El objetivo es minimizar las consecuencias de un derrame. Estos procesos de biodegradación pueden ser llevados a cabo por el microbiota autóctono o por microorganismos sumados con capacidades degradativas (Sharma et al., 2018). En ambos casos, lo que se obtiene es una biotransformación de sustancias peligrosas en sustancias menos tóxicas o inocuas.

Se han reportado numerosas cepas bacterianas de origen marino en la producción de biotensoactivos con alta capacidad emulsificante y reducción de la tensión superficial que utilizan hidrocarburos como fuente de carbono y están sujetos a la degradación aeróbica y anaeróbica (Deng et al., 2016).

Las bacterias comúnmente halladas en áreas de contaminación por hidrocarburos son de los géneros: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium* y *Nocardia*. Géneros similares se han logrado aislar de ambientes acuáticos, tanto de agua dulce como de agua salada (Darvishi et al., 2011). Géneros análogos como *Pseudomonas* es uno de los más proclives para la degradación de compuestos orgánicos, especialmente cepas de la especie *aeruginosa*, son los más ubicuos del planeta y el más adaptable a los diferentes contaminantes (González et al., 2011).

2.10. Espeleotemas

Los espeleotemas, son depósitos de mineral formado en cuevas, dentro puede haber estalactitas (estructuras que descienden del techo de las cuevas) y

estalagmitas (que crecen del suelo hacia arriba). El origen va ligado al escurrimiento de agua, y su capacidad de fijar capacidad movilizar metales, secuestrando CO₂ y logrando precipitar (mineralización) compuestos como el carbonato de calcio (Dhami et al., 2013). Los roles ecológicos y fisiológicos de la diversidad bacteriana en la producción de BT asociada a la biomineralización en la formación de depósitos de carbonato de calcio, aún no se conocen en su totalidad (Kaur et al., 2013). Se han aislado diferentes cepas bacterianas de cuevas: *Bacillus* (*pasteurii*, *subtilis*, *amyloliquefaciens* y *cereus*), *Myxococcus xanthus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus* sp., *Rhodococcus* sp., y *Arthrobacter* sp., entre otros (Rusznayk et al, 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe una gran diversidad de microorganismos en diferentes escenarios. En ese sentido existen nichos dónde pudieran existir actividades biológicas no conocidas o estudiadas. Los espeleotemas representan uno de ellos debido a la ecología existente de dinámica lenta y de baja energía acentuada en la formación de estructuras carbonatadas y la participación de microorganismos.

En ese sentido, es de suma relevancia destacar el papel fundamental de los microorganismos en la producción de BT, esenciales para prevenir y controlar los daños que puedan ocasionar derrames de hidrocarburos en ecosistemas vulnerables. Además de que existen microorganismos que están asociados en la biodegradación de hidrocarburos presentes en ecosistemas. Por esta razón, los microorganismos pueden ofrecer esta posibilidad para ser usados en tecnologías basadas en múltiples procesos de biorremediación, para ello es necesario conocer su comportamiento en los distintos parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura, salinidad, y otros) para lograr éxito en los bioprocesos.

En estudios recientes se ha logrado identificar a múltiples bacterias del género *Bacillus*, prometedores en la producción de éstos, y postulantes necesarios para ser usados con fines biotecnológicos.

Evaluar la capacidad de producción del BT conllevan a un aislamiento del microbiota nativo de lugares poco estudiados, en este caso los espeleotemas (depósitos calcáreos) desempeñan un nicho ecológico particular para el aislamiento de microorganismos con alto potencial en la producción de BT y su capacidad e implicancia en la biorremediación de aguas contaminadas con hidrocarburos.

4. OBJETIVOS

4.1. General

- Evaluar las cepas bacterianas aisladas de espeleotemas con capacidad en la biorremediación mejorada por contaminación de hidrocarburos en agua y suelo.

4.2. Específicos

- Aislar e identificar cepas bacterianas con potencial en la producción de biotensoactivos.
- Evaluar el efecto de pH, temperatura, porcentaje de salinidad sobre la biosíntesis de tensoactivos de la cepa bacteriana seleccionada.
- Determinar la efectividad de la cepa bacteriana seleccionada y el biotensoactivo producido como agentes en procesos de biorremediación.

5. HIPÓTESIS

La existencia de una cepa bacteriana aislada de espeleotemas de la gruta Los Herrera – San Joaquín, Querétaro, tiene la capacidad de producir biotensoactivos y al modificar las condiciones del medio de cultivo (pH, temperatura y salinidad), su producción puede incrementarse permitiendo su uso en el lavado de suelo y en la biodegradación de hidrocarburos en agua.

Dirección General de Bibliotecas UNQ

6. METODOLOGÍA

6.1. Colecta de muestras de espeleotemas

Las muestras de espeleotemas fueron colectadas de la gruta Los Herrera (20° 54' 53" N, 99° 33' 44" O) en Querétaro-México. Se seleccionaron tres espeleotemas distantes del sendero turístico y con accesibilidad nula. Siguiendo la técnica de García et al. (2016) y con la ayuda de un cincel y un martillo geológico, previamente esterilizados, se rasparon y colectaron muestras de ~1 g, a una altura entre 3 y 5 m del suelo. Estas muestras fueron conservadas en 500 mL de solución isotónica estéril de NaCl (0.8 % p/v) a 4 °C.

6.2. Aislamiento de microorganismos

En condiciones de laboratorio, las muestras fueron puestas en agitación por 24 h a fin de homogenizarlas. Se tomaron alícuotas proporcionales de 1 mL y se colocaron en placas Petri con agar nutritivo por 72 h a 28 °C. Posterior a ello se tomaron alícuotas para la siembra en placas con agar nutritivo por 5 días de incubación a 28 °C hasta la aparición de las primeras colonias bacterianas y se registraron las características morfológicas diferentes una de otras, las cuales se aislaron para su posterior estudio.

6.3. Evaluación de cepas bacterianas productoras de biotensoactivos

6.3.1. Cultivo de cepas aisladas

Las cepas aisladas fueron cultivadas en medio Marino Zobell (MZ) y en medio Bushnell Hass (BH). La composición del medio MZ fue (g/L): 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). La composición del medio BH fue (g/L): CaCl₂ (0.02), MgSO₄ (0.2), K₂HPO₄ (1.0), KH₂PO₄ (1.0), NH₄NO₃ (1.0), FeCl₃ (0.05). El pH

final fue ajustado a 7.0 ± 0.2 con NaOH (0.1 M) y HCl (1.0 M). Ambos medios de cultivo fueron suplementados con aceite vegetal residual de cocina (2 % v/v) como fuente de carbono. Se emplearon inóculos del 2 % con 0.7 de densidad óptica. Las condiciones de incubación fueron 170 rpm, 28 °C durante 72 h (Prendo INO 650V-9, México) (Elazzazy et al.,2015; Senthil et al.,2017; Ugalde-Sánchez, 2018). Culminado el tiempo de incubación y a fin de tener los sobrenadantes libres de células, éstos fueron centrifugados a 4,400 rpm por 15 minutos.

6.3.2. Evaluación del índice de emulsificación (E_{24}) de cepas aisladas

A fin de verificar la presencia del BT en el sobrenadante procedente de los cultivos bacterianos se empleó la técnica descrita por Nagwa et al. (2014). Para ello, en tubos de ensayo (13x100 mm) se añadieron 2 mL de un solvente orgánico (cloroformo, xileno o queroseno) y 2 mL del sobrenadante libre de células, luego se agitó vigorosamente en un vórtex por 2 minutos. La mezcla fue dejada en reposo por 24 h y para determinar la estabilidad de la emulsión el tubo de ensayo fue girado verticalmente. El porcentaje de emulsión (E_{24}) fue calculada según la Ecuación 1:

$$\%E_{24} = \frac{E_f}{E_t} * 100 \dots\dots(1)$$

Donde:

% E_{24} : Índice de emulsificación

E_f : altura de la emulsión formada

H_t : altura total

La cepa bacteriana que generó un sobrenadante con el mayor índice de emulsificación sobre las sustancias orgánicas indicadas fue seleccionada para las pruebas posteriores.

6.4. Evaluación de sustratos inductores de biotensoactivos

La cepa bacteriana seleccionada fue cultivada en 15 medios de cultivos diferentes. En 50 mL del agua de la llave se añadieron aceite vegetal residual (2 % v/v) y uno de los siguientes sustratos como inductor del proceso: glucosa (G), sacarosa (S), peptona (P), extracto de levadura (L) y las combinaciones posibles (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Los escenarios de incubación fueron: 170 rpm y 28 °C durante 72 h. El sustrato inductor que promueve el inicio de la biosíntesis representa un menor consumo de nutrientes y mayor consumo del aceite vegetal residual como fuente de carbono principal para la producción del BT de la cepa seleccionada.

Los resultados de Abouseoud et al. (2008) señala que el uso de glucosa (0.1 %) como suplemento inductor permite un aumento significativo del número de células microbianas de *Pseudomonas fluorescens* y que al ser incorporado en el medio de cultivo formulado permite una mayor producción de BT.

Pruthi y Cameotra (1997) incluyeron en el medio de cultivo el 0.1 % de sacarosa para *Serratia marcescens*. El sobrenadante mostró propiedades de emulsificación.

Durval et al. (2018) trabajó en la bioproducción de tensoactivos con *Bacillus cereus*, el cual dosificó 0.12 % de peptona como sustrato inductor y con el 2% de aceite vegetal residual como fuente de carbono.

En el trabajo de Martínez y Rodríguez (2010), establecieron una formulación de medio de cultivo utilizando un diseño experimental de Box-Behnken destinado a mejorar la producción de BT por *Pseudomonas putida* CB-100. Siendo las variables independientes evaluadas los porcentajes (%) de extracto de levadura: 0,005, 0,0075 y 0,01 a 37 ° C, agitado a 150 rpm, a pH 7, durante 5 días.

Cuadro 6.1. Sustratos inductores de biotensoactivos para cada medio de cultivo.

Nº cultivo	Sustrato inductor (% p/v)			
	Glucosa 0.1	Sacarosa 0.1	Peptona 0.12	Extracto de levadura 0.005
1	■			
2		■		
3			■	
4				■
5	■	■		
6	■		■	
7	■			■
8		■	■	
9		■		■
10			■	■
11	■	■	■	
12	■			■
13	■			■
14			■	■
15	■		■	■

6.5. Efecto de pH, temperatura y porcentaje de salinidad en la biosíntesis de tensoactivos de la cepa bacteriana seleccionada

6.5.1. Optimización de la temperatura, pH y NaCl

La óptima combinación de la temperatura, el pH y la concentración de cloruro de sodio (NaCl) que permita una mayor producción de biomasa bacteriana de la cepa seleccionada y una mayor emulsificación del xileno fue determinada mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR). Se siguió lo propuesto por Patowary et al. (2018) para elaborar el diseño central compuesto, el cual estuvo conformado por tres factores con dos niveles (Cuadro 6.2) aumentado con seis puntos centrales codificados como '0', los

puntos axiales fueron también codificados (Cuadro 6.3).

Cuadro 6.2. Variables (temperatura, pH y NaCl) y niveles (mínimo y máximo) del diseño experimental central compuesto

Código del factor	Nombre	Mínimo	Máximo
A	Temperatura	31	37
B	pH	4	7
C	NaCl	0	4

Cuadro 6.3. Factores (temperatura, pH y NaCl), corridas experimentales y repeticiones del diseño central compuesto usado para producción de biomasa y emulsificación del xileno (m, p, o-xilenos y etilbenceno).

Corrida	Nivel codificado	Factor 1 A: Temperatura (°C)	Factor 2 B: pH	Factor 3 C: NaCl (%)	Repeticiones
1	-1	34	5.5	5.36	3
2	-1	34	8.02	2	3
3	-1	34	5.5	0	3
4	-1	29	5.5	2	3
5	-1	39	5.5	2	3
6	-1	34	2.98	2	3
7	0	34	5.5	2	3
8	0	34	5.5	2	3
9	0	34	5.5	2	3
10	0	34	5.5	2	3
11	0	34	5.5	2	3
12	0	34	5.5	2	3
13	1	37	7	4	3
14	1	31	7	0	3
15	1	31	4	0	3

Corrida	Nivel codificado	Factor 1 A: Temperatura (°C)	Factor 2 B: pH	Factor 3 C: NaCl (%)	Repeticiones
16	1	37	4	0	3
17	1	37	7	0	3
18	1	31	7	4	3
19	1	31	4	4	3
20	1	37	4	4	3

6.5.1. Optimización del tamaño de inóculo, velocidad de agitación y tiempo de incubación

La óptima combinación de la agitación, la cantidad de inóculo y el tiempo de incubación que permita una mayor producción de biomasa bacteriana de LM 08 y una mayor emulsificación del xileno (m, p, o-xilenos y etilbenceno). Fue determinada mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR). Se siguió lo propuesto por Patowary et al. (2018) para elaborar el diseño central compuesto, el cual estuvo conformado por tres factores con dos niveles (Cuadro 6.4) aumentado con seis puntos centrales, codificados como '0', los puntos axiales fueron también codificados (Cuadro 6.5).

Cuadro 6.4. Variables (agitación, inóculo y tiempo) y niveles (mínimo y máximo) del diseño experimental central compuesto.

Código del factor	Nombre	Mínimo	Máximo
A	Agitación (rpm)	150	200
B	Cantidad de inóculo (% v/v)	2	4
C	Tiempo de incubación (días)	3	6

Cuadro 6.5. Factores (agitación, inóculo y tiempo), corridas experimentales y repeticiones del diseño central compuesto usado para producción de biomasa y emulsificación del xileno (m, p, o-xilenos y etilbenceno).

Corrida	Nivel codificado	Factor 1 A: Agitación (rpm)	Factor 2 B: Inóculo (%)	Factor 3 C: Días	Repeticiones
1	-1	175	3	7.02	3
2	-1	133	3	4.5	3
3	-1	175	1.32	4.5	3
4	-1	175	3	1.98	3
5	-1	217	3	4.5	3
6	-1	175	4.68	4.5	3
7	0	175	3	4.5	3
8	0	175	3	4.5	3
9	0	175	3	4.5	3
10	0	175	3	4.5	3
11	0	175	3	4.5	3
12	0	175	3	4.5	3
13	1	200	2	6	3
14	1	150	4	3	3
15	1	150	4	6	3
16	1	200	4	3	3
17	1	150	2	3	3
18	1	150	2	6	3
19	1	200	2	3	3
20	1	200	4	6	3

6.6. Métodos analíticos para evaluar la producción de biotensoactivos

6.6.1. Evaluación de la dispersión en aceite

En una placa Petri se colocaron 40 mL de agua de mar y se añadieron 20 μ L de petróleo y se aplicaron 10 μ L del caldo libre de células de sobrenadante a la superficie del petróleo. El área de dispersión formada determinó la presencia del BT (Qiao y Shao, 2010).

6.6.2. Test del colapso de gota

Para esta evaluación se siguió el protocolo de Kuiper et al. (2004), con modificaciones. Para ello, se distribuyeron 12 gotas de agua destilada (15 μ L) sobre una superficie plástica (Parafilm M, Laboratory Film), luego se agregaron 1, 3, 5 y 7 μ L, de cada sobrenadante de la cepa seleccionada. Como control se utilizaron tres gotas de agua destilada. Posteriormente, se agregó 1 μ l de azul de metileno, teniendo como registros los cambios observados. La observación del aplanamiento de la gota se realizó durante tres a cinco segundos y fue considerada positivo para la producción de BT. El sobrenadante de cada cepa bacteriana fue evaluado por triplicado.

6.7. Identificación de cepa aislada

6.7.1. Extracción de ADN total

La cepa LM 08 fue sometida a identificación molecular a través de un análisis filogenético basado en la amplificación del gen de rRNA 16S. Para lo cual, se realizaron extracciones de ADN por medio de digestión utilizando un amortiguador con los siguientes reactivos: Tris-HCl (50 mM), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (1 mM), dodecilsulfato de sodio (0.5 % v/v) y 10 μ L de proteinasa K. Esta mezcla de extracción se dejó incubar por 3 h a 55 °C (Coen et al.,2003). Para calcular la pureza del ADN se manejó un espectrofotómetro donde se tomó la absorción a longitudes de onda de 260,

280 y 230 nm.

6.7.2. Amplificación del gen rRNA 16S

La amplificación del gen de rRNA 16S se realizó a través de *PCR* o Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), bajo las condiciones descritas por Coen et al. (2003) utilizando los iniciadores universales 533f-GTGCCAGCAGCCGCGGTAA (Turner et al., 1999) y 1391r-GACGGGCGGTGTGTRCA (Weisburg et al., 1991). Los productos de *PCR* fueron purificados y secuenciados en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). El análisis de los productos de secuenciación se realizó con el programa <https://designer.genomecompiler.com>, en el cual las secuencias fueron editadas.

6.7.3. Análisis filogenético

Para determinar la identidad del aislado, las secuencias de los productos de *PCR* fueron contrastados en las bases de datos GeneBank de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y Ribosomal Database Project (Cole et al., 2014). La reconstrucción filogenética fue hecha usando 13 secuencias reportadas del gen rRNA 16S en las bases de datos. Las secuencias fueron alineadas usando el método de CLUSTAL_X (Larkin et al., 2013). El análisis filogenético fue hecho a través del algoritmo de Máxima Verosimilitud (Bootstrap: 2500 réplicas) con Kimura 2-parameter model, implementado en MEGA versión 6 (Tamura et al., 2013).

6.8. Experimentos de biorremediación

6.8.1. Remoción de HCs

La eficiencia de remoción de hidrocarburos (HCs) se evaluó por análisis gravimétrico. Los controles y los bioensayos tanto en suelo arenoso como en

agua de mar se determinaron utilizando hexano como líquido solvente en el proceso de extracción de hidrocarburos.

6.8.2. Intemperización de suelo arenoso

Se recolectó suelo arenoso de Ixtapa Zihuatanejo, Gro., México (17°38'12"N 101°33'05"O). El suelo se secó en un horno a 105 °C durante 24 h (horno de convección forzada AP120) y se homogeneizó en tamiz de 2 mm. Posteriormente el suelo pasó por un proceso de intemperización artificial, el primer paso fue contaminarlo con petróleo crudo (PEMEX-Tula) a concentraciones de 3,200 ppm de acuerdo con la NOM-138-SEMARNAT-2012. 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).

6.8.3. Lavado de suelos

La remoción del contaminante se realizó de acuerdo con los métodos descritos por Luna et al. (2011) y Lai et al. (2009). En los experimentos se utilizó 25 g de suelo arenoso contaminado y se transfirió a matraces Erlenmeyer de 250 mL, a los que se adicionó 10 mL de sobrenadante libre de células y 50 mL de agua destilada. Para los controles se utilizó suelo arenoso contaminado y agua destilada, sin adición del BT. Los matraces se agitaron a 150 rpm durante 5, 10 y 20 min, asimismo como en los tiempos de 1, 8, 16 y 24 h a 28 °C.

6.8.4. Bioensayo en agua de mar

Esta parte de la experimentación se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de agua de mar y 1 % de petróleo (v/v). Los medios fueron esterilizados y se adicionó el 5 % v/v de inóculo de la bacteria seleccionada LM 08 como productora de BT (conteniendo 10^7 UFC/mL) y

densidad óptica de 0.7 a 600 nm. Los experimentos se realizaron bajo tres diferentes condiciones y posterior análisis gravimétrico a los 9, 18 y 27 días, la cual consistió en agua de mar, petróleo, 5 % de inóculo y 10 mL de sobrenadante.

Las pruebas se realizaron por triplicado incluyendo un control. Los matracos se incubaron en un agitador orbital a 150 rpm durante 27 días (tres muestras). En Figura 6.1 se observa los diferentes bioensayos experimentales desarrollados en agua de mar



Figura 6.1. Bioensayos en agua de mar y tiempo de cultivo.
C: control, 1: 9 días, 2: 18 días y 3: 27 días.

6.8.5. Cálculo de la remoción de petróleo en suelo arenoso y agua de mar

Las cantidades iniciales y finales del contaminante hidrófobo se determinaron en el suelo arenoso tratado. Se añadieron 100 mL de n-hexano al suelo arenoso y se colocó en un agitador a 200 rpm durante dos horas. El extracto final de hexano y aceite se colocó en un horno entre 68 y 70 °C. El porcentaje de remoción (suelo) y/o degradación (agua) fueron evaluados por análisis gravimétrico después de lavar el suelo arenoso que contiene el contaminante restante con hexano. De la misma manera se usó hexano como líquido extractante para determinar la cantidad de petróleo existente luego de las experimentaciones. Se usaron promedios de los triplicados tanto del control como de los bioensayos.

El porcentaje de degradación se calculó con la Ecuación 2:

$$\% \text{ Degradación} = \frac{\text{Cantidad de aceite degradado}}{\text{Cantidad de aceite agregado al medio}} \times 100 \dots (2)$$

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. Colecta de la muestra

El sitio de muestreo fue la gruta de Los Herrera, localizada en el Municipio de San Joaquín, Querétaro, México (20° 54' 53" N 99° 33' 44" O) y una elevación de 2360 m.s.n.m. El microclima en su interior es templado-húmedo, con una temperatura mínima anual de 2 °C y máxima de 17 °C, y en el exterior con precipitaciones promedio de 126 mm en épocas de lluvia y de 8 mm en estiaje (Weather Spark).



Figura 7.1. Colecta de la muestra

7.2. Caracterización macroscópica de los microorganismos

Para el aislamiento de microorganismos productores de biotensoactivos a partir de espeleotemas es de especial interés debido a su capacidad de subsistir en ambientes de poca iluminación, aguas de goteo y formación de espeleotemas. Condiciones que permiten producir metabolitos de naturaleza tensoactiva. En condiciones de laboratorio se logró el aislamiento de 11 cepas bacterianas siendo LM 08 la que mostró mayor porcentaje de actividad emulsificante sobre solventes orgánicos.



Figura 7.2. Caracterización macroscópica de los aislados

LM 08 de acuerdo con la tinción Gram es una bacteria Grampositiva, y su morfología colonial tiene las siguientes características morfológicas:

Morfología colonial (LM 08)	
Tamaño	2-3 mm
Forma	Circular
Elevación	plana
Borde	Entero
Color	blanco
Superficie	Lisa
Aspecto	Húmedo
Consistencia	Viscosa
Luz reflejada	Tornasol

Cuadro 6.6. Morfología colonial de LM 08



Figura 7.3. Cepa bacteriana LM 08 aislada.

7.3. Aislamiento e identificación de cepas bacterianas productoras de biotensoactivos

Se aislaron 11 cepas bacterianas, las mismas que fueron cultivadas en medio MZ y BH, con el 2 % de aceite vegetal residual como fuente de carbono, seleccionado los mayores índices de emulsificación (E_{24}) con un solvente orgánico (cloroformo, xileno o queroseno). En la Figura 7.4 se observa que la cepa bacteriana LM 08 fue la que mostró el mayor índice de emulsificación sobre los compuestos orgánicos empleados.

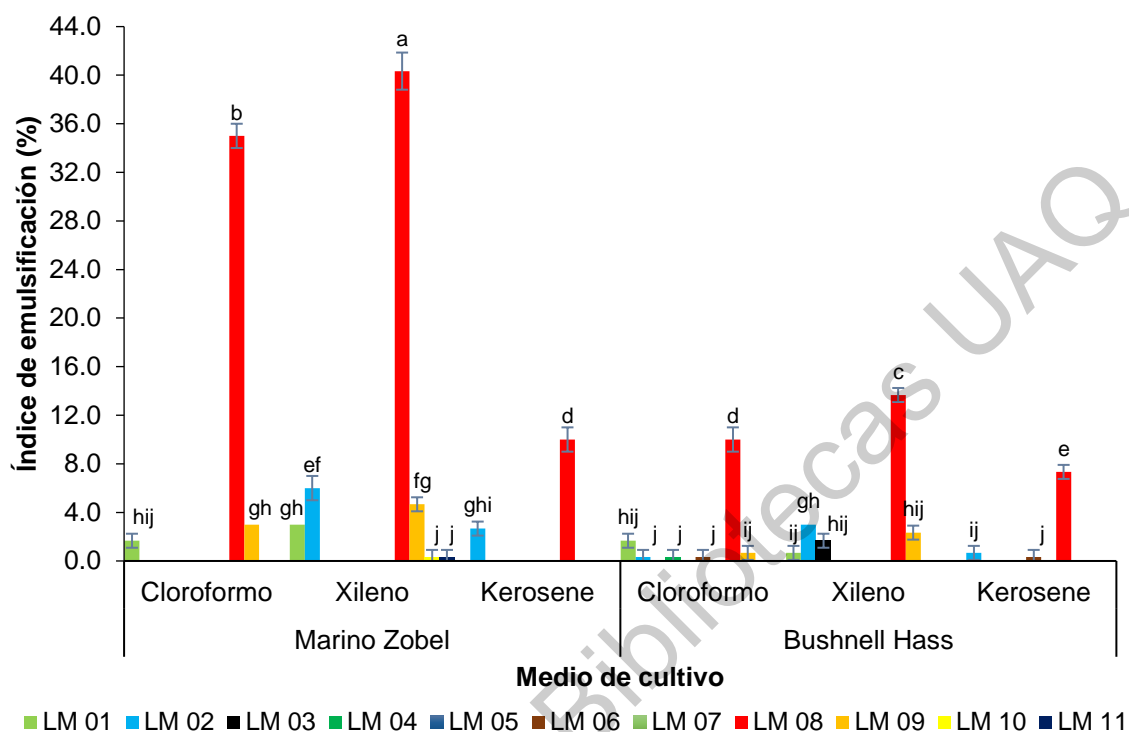


Figura 7.4. Índice de emulsificación de las cepas bacterianas aisladas sobre hidrocarburos. Los valores son promedios de tres repeticiones \pm DS. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

De acuerdo con los resultados de selección de la cepa productora de BT se tuvieron valores de emulsificación (xileno): MZ por encima del 40 %, mientras que en BH sólo del 12 %. Ambos medios de cultivo: MZ y BH tuvieron en su composición 16 y 6 compuestos respectivamente. Lo que indica que el número de compuestos de un medio de cultivo no determina la eficiencia del desarrollo del microorganismo aislado.

Para la selección de *Paenibacillus* sp., Jimoh and Lin (2020) utilizaron medios de producción de bajo costo, lo que incluía menor número de compuestos tan sólo usando aceites residuales de coco y girasol, ambos al 5 %. Vijaya et al. (2013) mencionaron que el uso de sustratos hidrofóbicos tales como aceites vegetales

incluyendo hidrocarburos como fuente de carbono, induce a la producción de tensoactivos biológicos de origen microbiano.

7.4. Efecto del sustrato inductor sobre el índice de emulsificación de xileno

En la Figura 7.5 se presenta el efecto de los diversos sustratos inductores en la densidad óptica del crecimiento de la bacteria LM 08. La comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) indica que la combinación de peptona con extracto de levadura generó la mayor densidad óptica (8.69) seguida de la sacarosa-peptona (7.25).

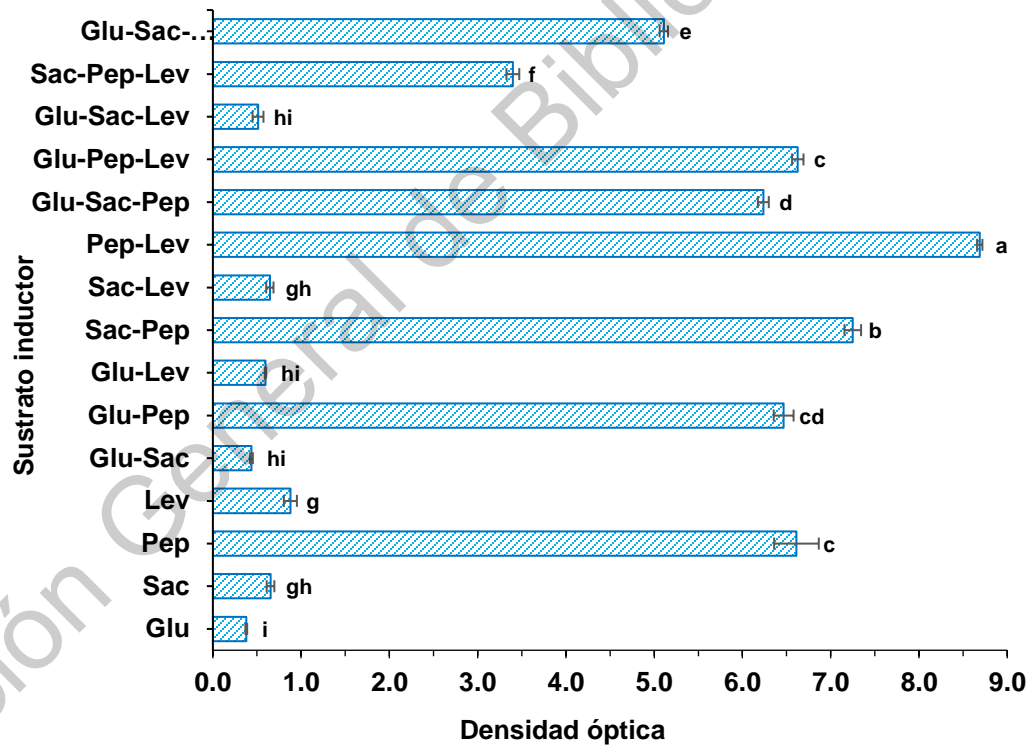


Figura 7.5. Efecto del sustrato inductor en la densidad óptica del crecimiento de LM 08. Los valores son promedios de tres repeticiones \pm DS. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha < 0.05$).

La capacidad emulsificadora del medio de cultivo de la cepa LM 08 sobre hidrocarburos (Figura 7.6), cuando se usó la combinación glucosa/peptona/extracto de levadura indujo la mayor emulsificación del xileno, seguida de la combinación de glucosa/sacarosa/peptona. En tanto que la mayor emulsificación del cloroformo fue suscitada cuando se usó glucosa/peptona/extracto de levadura, seguida del extracto de levadura. La emulsificación del queroseno y diésel fueron menores comparados con el xileno y cloroformo. En su mayoría, se observa que los medios enriquecidos con extracto de levadura favorecen el crecimiento bacteriano y al índice de emulsificación, generando espuma, esto se explicaría dado que el extracto de levadura al ser una fuente de nitrógeno (aminoácidos y otras vitaminas) resulta esencial para la síntesis de biomoléculas (proteínas y ADN) durante el crecimiento celular (Bibra et al., 2018). La elección de peptona como único sustrato inductor fue considerado debido a que presentó valores de emulsificación en los 4 solventes orgánicos evaluados.

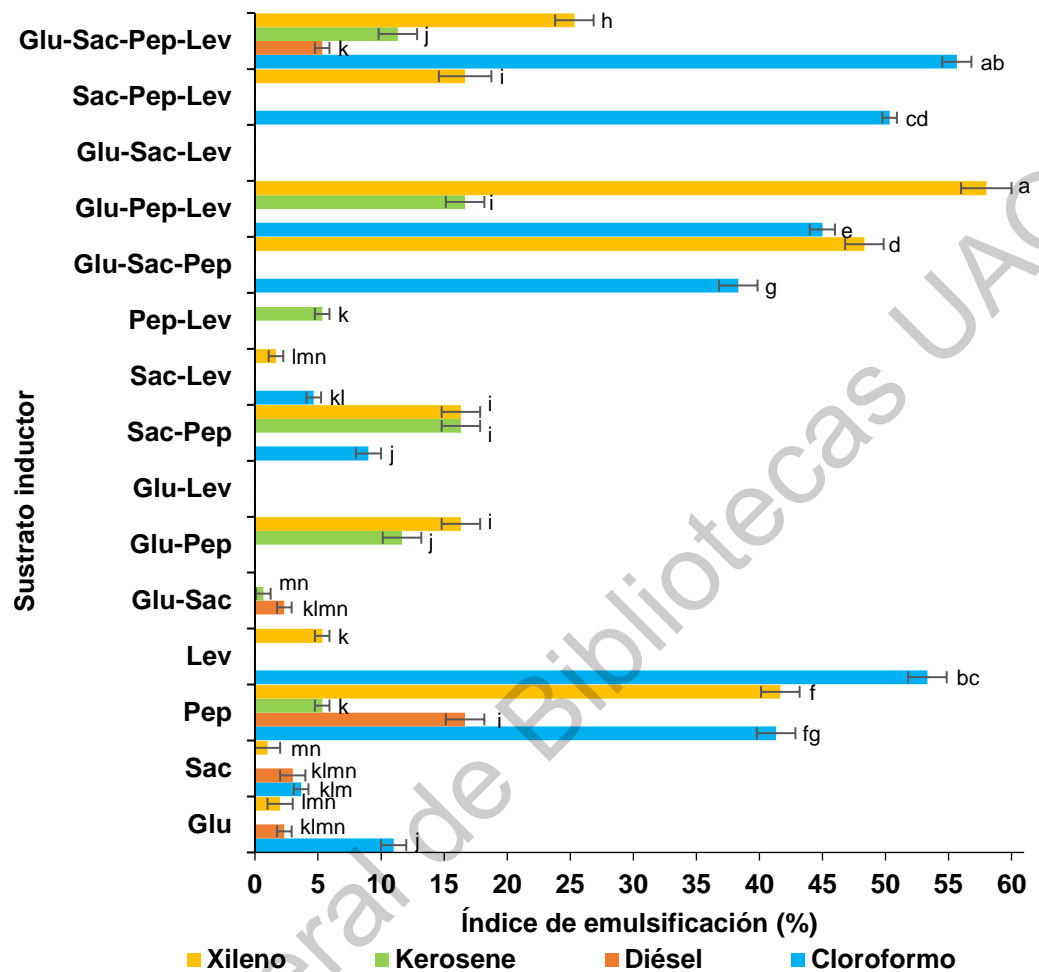


Figura 7.6. Efecto del sustrato inductor en el índice de emulsificación (%) de xileno, queroseno, diésel y cloroformo por parte de LM 08. Los valores son promedios de tres repeticiones \pm DS. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha < 0.05$).

Ram et al. (2019) en su estudio usó tres diferentes cultivos: medio TY, caldo nutritivo y caldo Marino Zobell, siendo el primero un medio sencillo y de bajo costo teniendo como sustrato inductor el extracto de levadura al 1 % en agua del grifo. Para LM 08 se utilizó únicamente la peptona de caseína (0.12 %) como sustrato inductor lo que permitió a LM 08 un crecimiento, desarrollo y capacidad de producir el BT.

El uso de sustratos inductores como iniciadores del proceso de la biosíntesis de tensoactivos juegan un papel importante debido a que favorece su producción. Lee et al. (2018) usaron como fuentes de energía (2 % p/v): manitol, glucosa, glicerol, almidón y aceite.

7.5. Efecto de pH, temperatura y porcentaje de salinidad en la producción del biotensoactivo

7.5.1. Efecto sobre la producción de biomasa

La formulación y selección del medio de cultivo basado sólo en peptona (0.12 %) y agua de la llave mostró los valores de la producción de biomasa en UFC (Unidades formadoras de Colonias) con una D.O. de 0.7 a 600 nm y emulsificación del xileno observados experimentalmente y se muestran en el Cuadro 7.1.

Cuadro 7.1. Efecto de la temperatura, pH y NaCl sobre la densidad óptica e índice de emulsificación del xileno

Corrida	Temperatura (°C)	pH	NaCl (%)	Biomasa (UFC/mL)	Xileno (%)
1	34	5.5	5.36	3.630	3.000
2	34	8.02	2	3.147	4.333
3	34	5.5	0	2.599	17.333
4	28.95	5.5	2	5.753	26.333
5	39.05	5.5	2	2.042	8.667
6	34	2.98	2	0.068	0.000
7	34	5.5	2	13.757	26.333
8	34	5.5	2	13.837	26.667
9	34	5.5	2	13.943	23.667
10	34	5.5	2	13.620	26.667
11	34	5.5	2	13.863	27.667
12	34	5.5	2	13.720	25.667
13	37	7	4	2.686	13.333

Corrida	Temperatura (°C)	pH	NaCl (%)	Biomasa (UFC/mL)	Xileno (%)
14	31	7	0	5.957	43.333
15	31	4	0	5.709	3.333
16	37	4	0	0.089	0.000
17	37	7	0	2.719	26.000
18	31	7	4	4.891	13.333
19	31	4	4	0.127	0.000
20	37	4	4	0.082	0.000

El ANOVA del modelo cuadrático indica que el modelo es significativo con base en el valor de F (9.32) y el valor de $\alpha < 0.05$. Los valores α son usados como una herramienta para verificar la significancia de cada uno de los coeficientes, que a su vez son necesarios para comprender el patrón de las interacciones mutuas entre las variables de prueba. El valor F y los valores α correspondientes, junto con las estimaciones de los coeficientes se presentan en la Cuadro 7.2. Cuanto menor es la magnitud de α , más significativo es el coeficiente correspondiente. Los factores A^2 , B^2 y C^2 fueron considerados significativos dado que los α valores fueron <0.05 , mientras que los factores A, B y C y las interacciones $A \times B$, $B \times C$ y $A \times C$ no fueron significativos. El ajuste del modelo también se expresó mediante el coeficiente de regresión R^2 , que resultó ser 0.8935, lo que indica que el modelo podría explicar el 89.35 % de la variabilidad en la respuesta (biomasa). A partir de las respuestas del diseño central compuesto se construyó una ecuación cuadrática polinómica para la producción de la biomasa:

$$Y = -408.9 + 22.16 \times A + 18.94 \times B - 1.78 \times C - 0.3366 \times A^2 - 1.706 \times B^2 - 0.958 \times C^2 + 0.006 \times A \times B + 0.138 \times A \times C + 0.187 \times B \times C$$

Donde Y es la biomasa, A es la temperatura, B es el pH y C es la concentración de NaCl.

Cuadro 7.2. Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de respuesta de superficie cuadrática de la producción de biomasa de la cepa LM 08.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor α
Modelo	9	507.216	56.357	9.32	0.001
Lineal	3	39.872	13.291	2.20	0.151
A: Temperatura	1	22.047	22.047	3.65	0.085
B: pH	1	17.417	17.417	2.88	0.121
C: NaCl	1	0.408	0.408	0.07	0.800
Cuadrado	3	455.195	151.732	25.09	0.000
A ²	1	133.369	133.369	22.06	0.001
B ²	1	214.183	214.183	35.42	0.000
C ²	1	133.025	133.025	22.00	0.001
Interacción de 2 factores	3	7.985	2.662	0.44	0.729
A x B	1	0.006	0.006	0.00	0.975
A x C	1	5.458	5.458	0.90	0.364
B x C	1	2.521	2.521	0.42	0.533
Error	10	60.468	6.047		
Falta de ajuste	5	60.402	12.080	915.49	0.000
Error puro	5	0.066	0.013		
Total	19	567.684			

R²: 0.8935, R² ajustado: 0.7976, GL=grados de libertad, SC=suma de cuadrados; MC=cuadrático medio; significativo, $\alpha \leq 0.05$; no significativo, $\alpha \geq 0.05$.

Los gráficos de superficie de respuesta en función de dos factores a la vez, manteniendo todos los demás factores en niveles fijos, son más útiles para comprender los efectos principales y de interacción de estos dos factores. Los gráficos de superficie de respuesta 3D y los diagramas de contorno se muestran en la Figura 7.7.

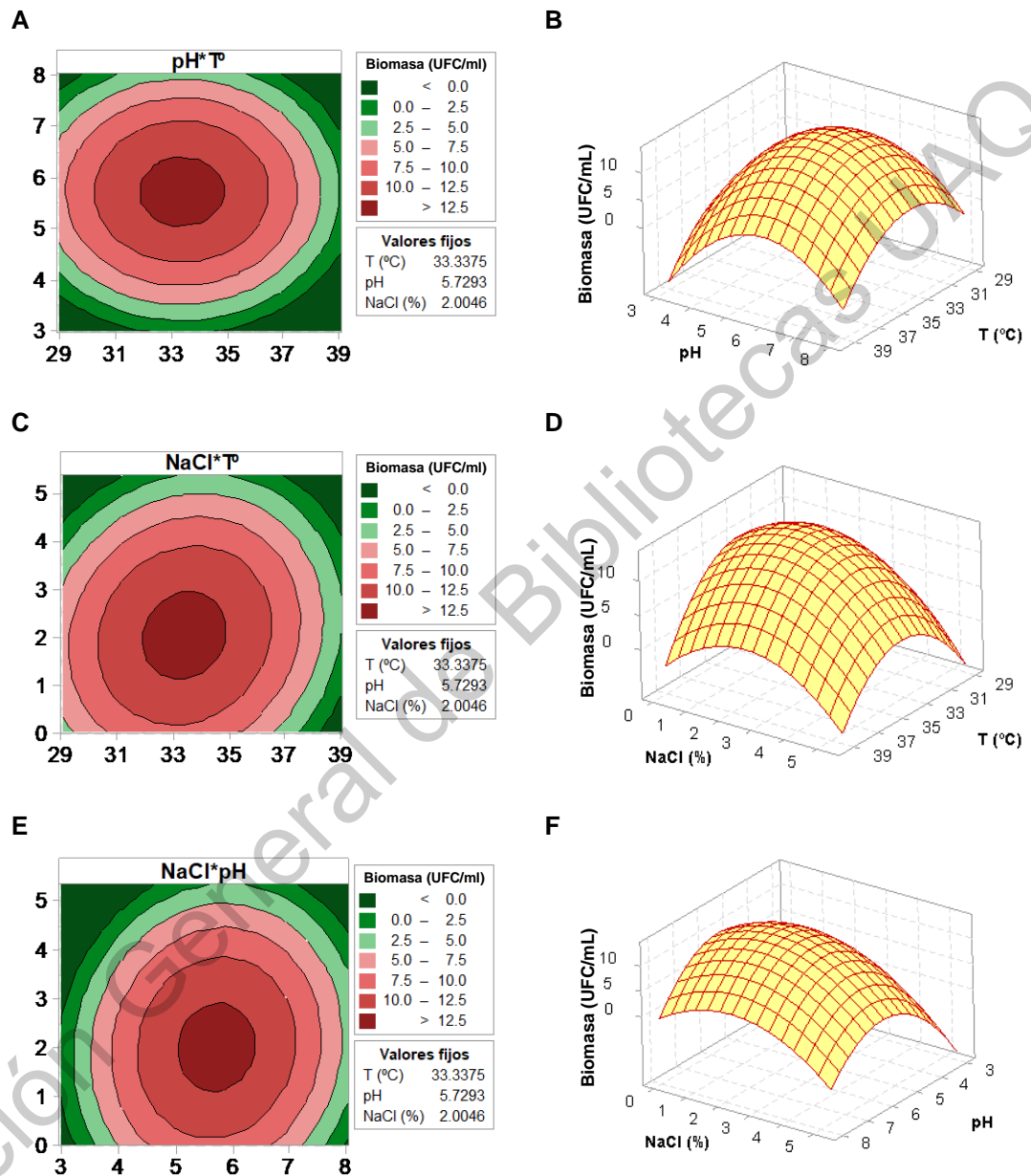


Figura 7.7. Gráficas de contorno y superficies de respuesta 3D que muestran la interacción entre (A-B) la temperatura y pH, (C-D) temperatura y NaCl, y (E-F) pH y NaCl en la producción de biomasa de LM 08.

7.5.2. Efecto sobre el índice de emulsificación del xileno

El ANOVA del modelo cuadrático indica que el modelo es significativo con base en el valor de F (5.64) y el valor de $\alpha < 0.05$. El valor F y los valores α correspondientes junto con las estimaciones de los coeficientes se presentan en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Los factores B, C y B^2 fueron considerados significativos dado que los α valores fueron < 0.05 , mientras que los factores A, A^2 y C^2 y las interacciones AxB, BxC y AxC no fueron significativos. El ajuste del modelo expresado en el coeficiente de regresión R^2 resultó ser de 0.8355, lo que indica que el modelo podría explicar el 83.55 % de la variabilidad en la respuesta (emulsificación del xileno). A partir de las respuestas del diseño central compuesto se construyó una ecuación cuadrática polinómica para la emulsificación del xileno:

$$Y = -381 + 15.4 \times A + 57.8 \times B - 3.5 \times \text{NaCl} - 0.225 \times A^2 - 3.310 \times B^2 - 1.143 \times C^2 - 0.389 \times A \times B + 0.431 \times A \times C - 1.639 \times B \times C$$

Donde Y es el índice de emulsificación, A es la temperatura, B es el pH y C es la concentración de NaCl.

Cuadro 7.3. Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de respuesta de superficie cuadrática del índice de emulsificación (E24) del Xileno por LM 08.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor α
Modelo	9	2619.27	291.031	5.64	0.006
Lineal	3	1175.60	391.868	7.60	0.006
A: Temperatura	1	185.84	185.839	3.60	0.087
B: pH	1	731.57	731.566	14.19	0.004
C: NaCl	1	258.20	258.198	5.01	0.049
Cuadrado	3	1026.72	342.241	6.64	0.010
A ²	1	59.68	59.682	1.16	0.307
B ²	1	806.09	806.089	15.63	0.003
C ²	1	189.35	189.350	3.67	0.084
Interacción de 2 factores	3	271.28	90.426	1.75	0.219
A x B	1	24.50	24.500	0.48	0.506
A x C	1	53.39	53.389	1.04	0.333
B x C	1	193.39	193.389	3.75	0.082
Error	10	515.68	51.568		
Falta de ajuste	5	506.42	101.283	54.69	0.000
Error puro	5	9.26	1.852		
Total	19	3134.95			

R²: 0.8355, R² ajustado: 0.6875, GL=grados de libertad, SC=suma de cuadrados; MC=cuadrático medio; significativo, $\alpha \leq 0.05$; no significativo, $\alpha \geq 0.05$.

Los gráficos de superficie de respuesta 3D y los diagramas de contorno se muestran en la Figura 7.8.

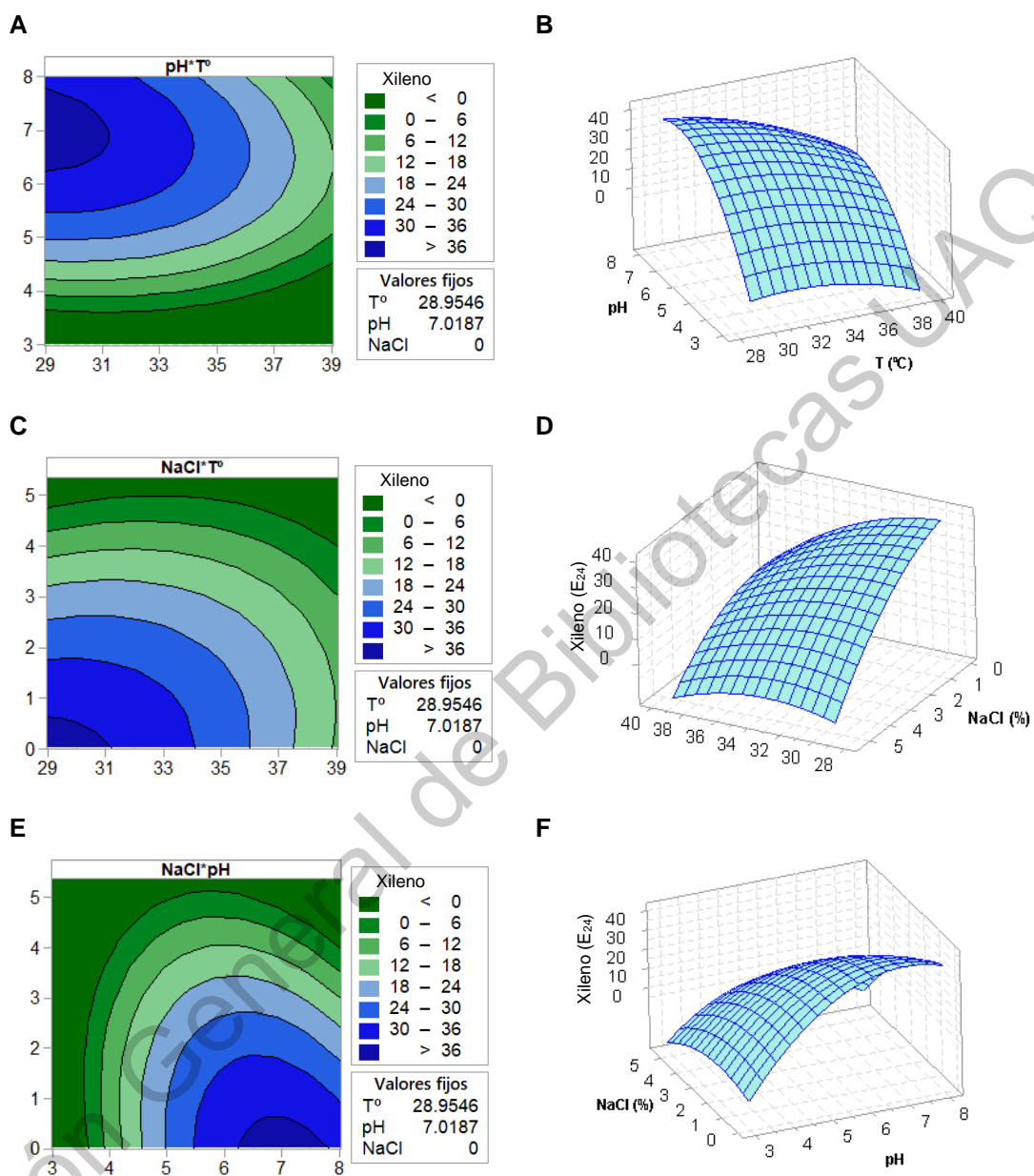


Figura 7.8. Gráficas de contorno y superficies de respuesta 3D que muestran la interacción entre (A-B) la temperatura y pH, (C-D) temperatura y NaCl, y (E-F) pH y NaCl en el índice de emulsificación del xileno por la cepa LM 08.

La Figura 7.9 muestra que la máxima emulsificación del xileno (IC_{95%} 17.54 – 58.51) se lograría con una temperatura de 28.95 °C, un pH de 7.02 y una concentración de NaCl de 0 % p/v.

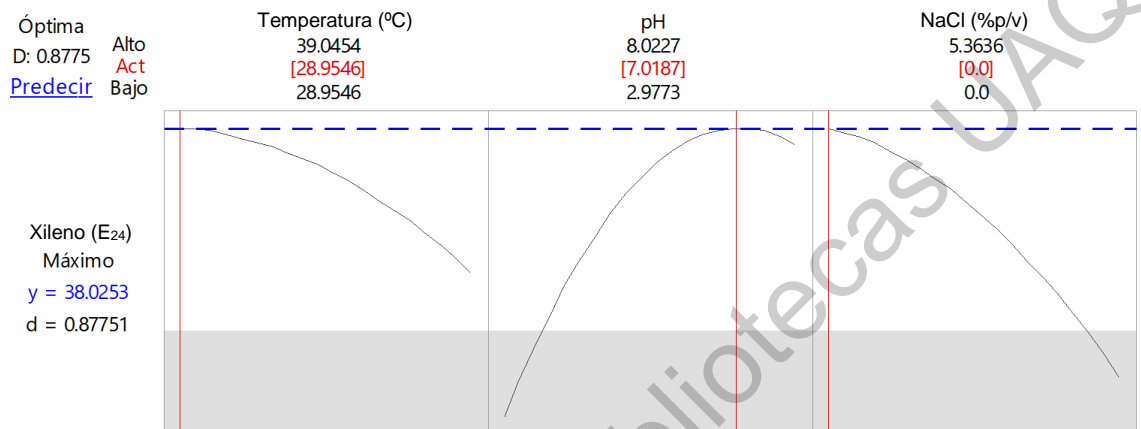


Figura 7.9. Condiciones de temperatura, pH y NaCl para la optimización del índice de emulsificación del xileno (E₂₄)

7.6. Efecto de la agitación, tamaño de inóculo y tiempo de fermentación en la biomasa y la biosíntesis de tensoactivos de la cepa bacteriana seleccionada

7.6.1. Efecto sobre la biomasa

Los valores de la producción de biomasa y emulsificación del xileno (%) observados experimentalmente se muestran en el Cuadro 7.3.

Cuadro 7.3. Efecto de la agitación, inóculo y tiempo sobre la biomasa y emulsificación del xileno.

Corrida	Factor 1 A: agitación (°C)	Factor 2 B: inóculo (%)	Factor 3 C: días	Respuesta biomasa (UFC/mL)	Respuesta xileno (%)
1	175	3	7.02	21.84	44.67
2	132.96	3	4.5	25.03	30.00
3	175	1.32	4.5	14.13	19.00
4	175	3	1.98	3.96	26.67
5	217.04	3	4.5	5.23	22.33
6	175	4.68	4.5	22.38	42.00
7	175	3	4.5	26.04	53.67
8	175	3	4.5	25.77	52.67
9	175	3	4.5	26.01	53.00
10	175	3	4.5	25.77	52.67
11	175	3	4.5	25.77	53.67
12	175	3	4.5	25.54	53.33
13	200	2	6	14.70	29.10
14	150	4	3	12.24	28.67
15	150	4	6	29.66	36.33
16	200	4	3	14.68	44.12
17	150	2	3	7.52	39.67
18	150	2	6	14.48	31.00
19	200	2	3	5.28	34.05
20	200	4	6	14.47	37.23

El ANOVA del modelo cuadrático indica que el modelo es significativo con base en el valor de F (11.59) y el valor de $\alpha < 0.05$. El valor F y los valores α correspondientes, junto con las estimaciones de los coeficientes se presentan en el Cuadro 7.4. Cuanto menor es la magnitud de α , más significativo es el coeficiente correspondiente. Los factores A, B, C, A², B² y C² fueron considerados significativos dado que los α valores fueron <0.05 , mientras que

la interacción entre los factores AxB, AxC y BxC no fueron significativos. El ajuste del modelo también se expresó mediante el coeficiente de regresión R², que resultó ser 0.8338, lo que indica que el modelo podría explicar el 83,38 % de la variabilidad en la respuesta (biomasa). A partir de las respuestas del diseño central compuesto se construyó una ecuación cuadrática polinómica para la producción de la biomasa:

$$Y = -299.8 + 2.443 \times A + 29.1 \times B + 30.59 \times C - 0.00627 \times A^2 - 2.816 \times B^2 - 2.092 \times C^2 - 0.0536 \times A \times B - 0.0506 \times A \times C + 0.069 \times B \times C$$

Donde Y es la biomasa, A es la agitación, B es la cantidad de inóculo y C el tiempo de incubación.

Cuadro 7.4. Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de respuesta de superficie cuadrática de la producción de biomasa de LM 08.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	1197.99	133.110	11.59	0.000
Lineal	3	600.88	200.294	17.44	0.000
A: Agitación	1	169.07	169.074	14.72	0.003
B: Inóculo	1	135.00	134.996	11.75	0.006
C: Días	1	296.81	296.813	25.84	0.000
Cuadrado	3	553.82	184.607	16.07	0.000
A ²	1	221.47	221.467	19.28	0.001
B ²	1	114.28	114.280	9.95	0.010
C ²	1	319.44	319.445	27.81	0.000
Interacción de 2 factores	3	43.29	14.429	1.26	0.341
A x B	1	14.39	14.386	1.25	0.289
A x C	1	28.81	28.814	2.51	0.144

B x C	1	0.09	0.085	0.01	0.933
Error	10	114.85	11.485		
Falta de ajuste	5	114.68	22.937	686.65	0.000
Error puro	5	0.17	0.033		
Total	19	1312.84			

R²: 0.9125, R² ajustado: 0.8338, GL=grados de libertad, SC=suma de cuadrados; MC=cuadrático medio; significativo, $\alpha \leq 0.05$; no significativo, $\alpha \geq 0.05$.

La Figura 7.10 A-B muestra que cuando la agitación se encuentra cercana a 159.8 rpm y la cantidad de inóculo es ~3.8 % la producción de biomasa (UFC/mL) es mayor (27.9). De manera similar, en la Figura 7.7 C-D una mayor producción de biomasa (28.3) se da cuando el tiempo de incubación es ~5.4 días con una agitación de 158 rpm. Cuando el tiempo de incubación es ~5.2 días y la cantidad de inóculo es ~3.5 % la biomasa alcanza el máximo (27.9) (Figura 7.7 E-F).

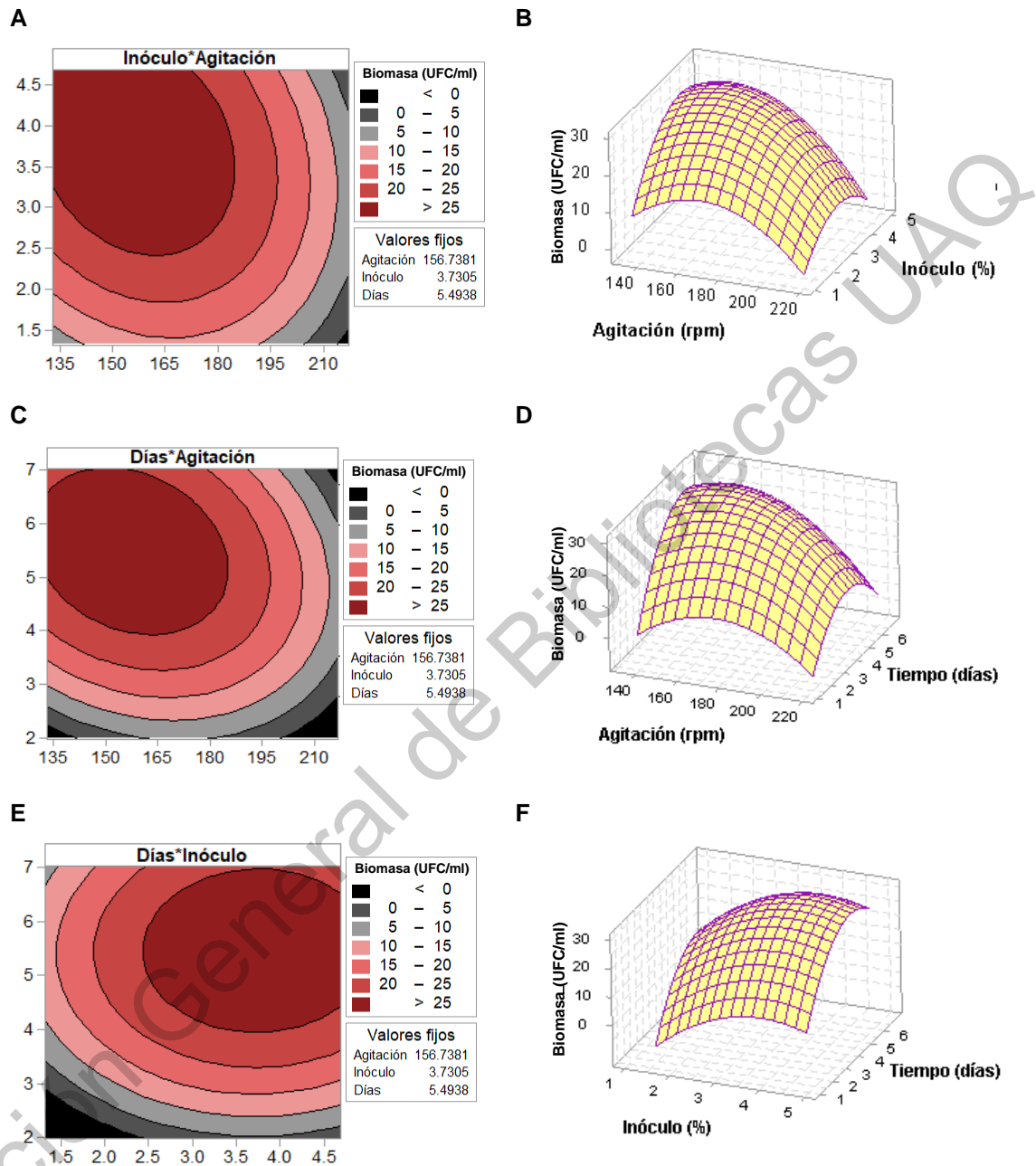


Figura 7.10. Gráficas de contorno y superficies de respuesta 3D que muestran la interacción entre (A-B) la agitación e inóculo, (C-D) agitación y tiempo y (E-F) inóculo y tiempo en la producción de biomasa de la cepa LM 08.

7.6.2. Efecto sobre la emulsificación del xileno

El ANOVA del modelo cuadrático indica que el modelo es significativo con base en el valor de F (5.27) y el valor de $\alpha < 0.05$. El valor F y los valores α correspondientes junto con las estimaciones de los coeficientes se presentan en el Cuadro 7.5. Los factores B, A^2 , B^2 , C^2 fueron considerados significativos dado que los α valores fueron < 0.05 , mientras que los factores A y C y las interacciones AxB, AxC y BxC no fueron significativos. El ajuste del modelo expresado en el coeficiente de regresión R^2 resultó ser de 0.8258, lo que indica que el modelo podría explicar el 82.58 % de la variabilidad en la respuesta (emulsificación del Xileno). A partir de las respuestas del diseño central compuesto se construyó una ecuación cuadrática polinómica para la emulsificación del xileno:

$$Y = -426 + 4.48 \times A + 18.5 \times B + 23.6 \times C - 0.01338 \times A^2 - 6.83 \times B^2 - 2.225 \times C^2 + 0.1193 \times A \times B - 0.0361 \times A \times C + 1.20 \times B \times C$$

Donde Y es la emulsificación del xileno, A es la agitación, B es la cantidad de inóculo y C el tiempo de incubación.

Cuadro 7.5. Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de respuesta de superficie cuadrática del índice de emulsificación del Xileno por la cepa LM 08.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor α
Modelo	9	2053.34	228.15	5.27	0.008
Lineal	3	215.54	71.85	1.66	0.238
A	1	1.21	1.21	0.03	0.871
B	1	192.06	192.06	4.43	0.062
C	1	22.27	22.27	0.51	0.490
Cuadrado	3	1726.02	575.34	13.28	0.001
A ²	1	1008.15	1008.15	23.27	0.001
B ²	1	672.64	672.64	15.52	0.003
C ²	1	361.03	361.03	8.33	0.016
Interacción de 2 factores	3	111.79	37.26	0.86	0.493
A x B	1	71.20	71.20	1.64	0.229
A x C	1	14.67	14.67	0.34	0.574
B x C	1	25.92	25.92	0.60	0.457
Error	10	433.29	43.33		
Falta de ajuste	5	432.24	86.45	409.49	0.000
Error puro	5	1.06	0.21		
Total	19	2486.63			

R²: 0.8258, R² ajustado: 0.6689, GL=grados de libertad, SC=suma de cuadrados;

MC=cuadrático medio; significativo, $\alpha \leq 0.05$; no significativo, $\alpha \geq 0.05$

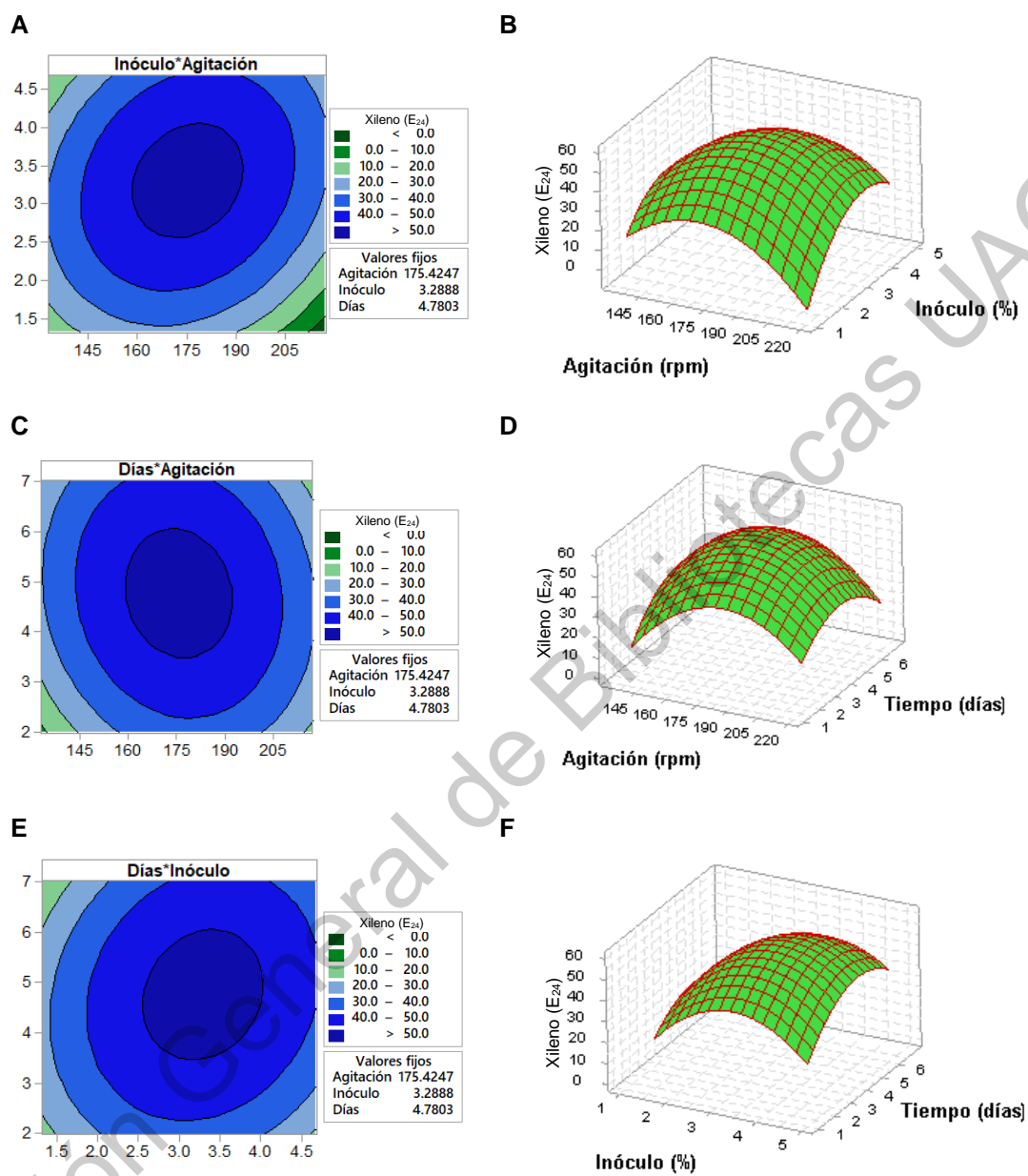


Figura 7.11. Gráficas de contorno y superficies de respuesta 3D que muestran la interacción entre (A-B) la agitación e inóculo, (C-D) agitación y tiempo y (E-F) inóculo y el índice de emulsificación (%) del xileno por la cepa LM 08.

La Figura 7.12 A-B muestra que cuando la agitación se encuentra cercana a 176.3 rpm y la cantidad de inóculo es ~3.3 % la emulsificación del xileno es

mayor (53.50). De manera similar, la Figura 7.12 C-D muestra una mayor emulsificación del xileno (53.07) cuando el tiempo de incubación es cercano a los 4.75 días con una agitación de ~173.99 rpm. Cuando el tiempo de incubación es cercano a los 4.84 días y la cantidad de inóculo es ~3.33 % la emulsificación del xileno alcanza el máximo (53.65) (Figura 7.8 E-F).

La Figura 7.12 muestra que la máxima emulsificación del xileno (IC_{95%} 47.05 – 58.82) se conseguiría con una agitación de 175.42 rpm, una cantidad de inóculo de 3.29 % v/v con un tiempo de incubación de 4.78 días.

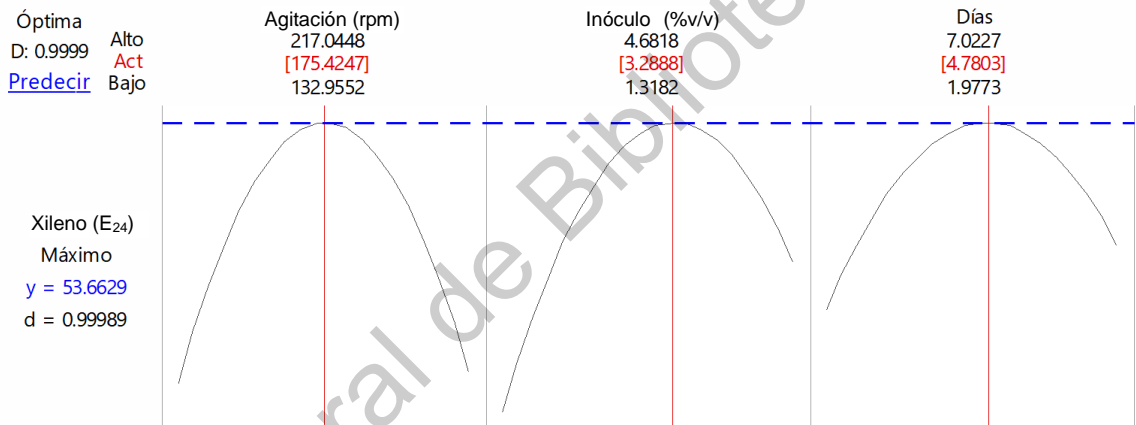


Figura 7.12. Condiciones de agitación, cantidad de inóculo y tiempo de incubación para la optimización del índice de emulsificación del xileno

El estudio de Sharma et al. (2019) con *Agrobacterium fabrum* SLAJ731 y la producción de BT se dio entre las 48 – 120 h, metabolito secundario producido durante la fase estacionaria. Thavasi et al. (2011) mencionan que la producción y liberación extracelular de BT durante la fase estacionaria permite que la actividad de E₂₄ se incremente con el aumento en la producción de BT y el máximo E₂₄ que se encontró es de 65 ± 0,2 % a las 144 h. De manera similar y en función a los resultados obtenidos con E₂₄ (Fig. 7.12) demuestra que la máxima producción del BT fue a las 114 h (4.78 días) con índices del 53.6 %.

7.7. Efecto de biotensoactivo sobre petróleo crudo

7.7.1. Desplazamiento en petróleo crudo

En la Figura 7.13. se observa que la adición del sobrenadante libre de células desplaza el petróleo y genera un halo con un diámetro superior a 8 cm.

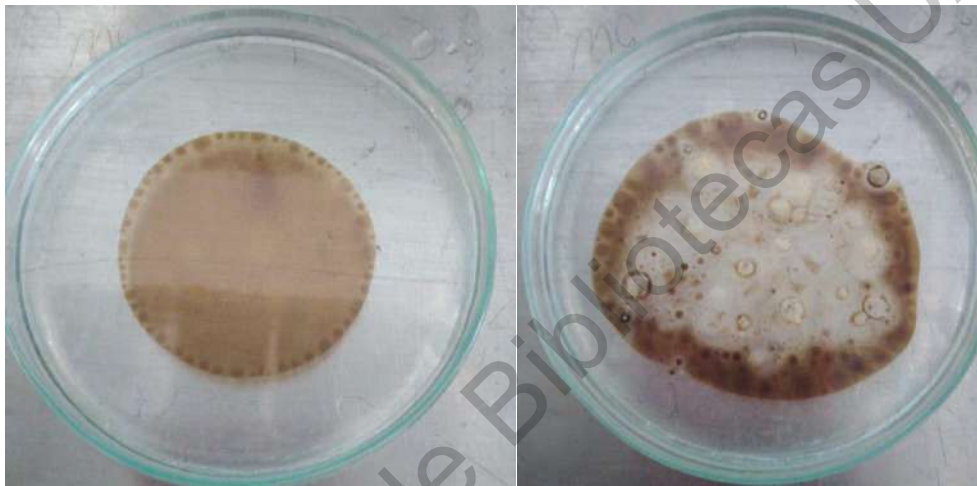


Figura 7.13. Desplazamiento de petróleo por acción del BT

7.7.2. Test del colapso de la gota

La adición del sobrenadante libre de células en diferentes dosis (1 μL , 3 μL , 5 μL y 7 μL) sobre la gota de agua de mar que contiene petróleo genera un aplanamiento de esta a medida que la dosis aumenta, algo que no se observa con el control. Esto confirma la presencia del BT en el sobrenadante (Figura 7.14).



Figura 7.14. Colapso de gota por acción del BT

7.7.3. Tensión superficial

En la Figura 7.15 observa la medición de la tensión superficial del sobrenadante producido con un valor de 40 mN / m.



Figura 7.15. Medición de la tensión superficial del sobrenadante

El estudio de Durval et al. (2018) con *Bacillus cereus* BCS1, mostró que la tensión superficial del sobrenadante fue $\approx 44,4 \text{ mN m}^{-1}$ cuando se utilizó aceite vegetal usado en comparación con el agua destilada que fue $\approx 71.63 \text{ mN m}^{-1}$ para calibrar el sistema de medición y menciona que es la fuente de carbono más adecuada para la producción de BT. El aceite de freír de desecho condujo a una mayor reducción de la TS siendo una fuente de carbono de bajo costo y de fácil acceso. De hecho, la elección de un sustrato es uno de los principales factores limitantes con respecto a la producción de BT a gran escala, y a sus aplicaciones ambientales.

Según los aportes de Abbasi et al. (2012) resaltan el uso de fuentes de carbono residuales como el aceite vegetal de cocina, lo cual amplía el panorama para la producción de BT, ya que es una fuente alternativa viable para la producción de éstos. Al ser un residual contaminante, se elimina un problema ambiental como la disminución de la contaminación por desechos de diversas industrias, con un beneficio técnico, ecológico y económico.

7.8. Efectividad de la cepa bacteriana seleccionada y el biotensoactivo producido en procesos de biorremediación

7.8.1. Remoción de hidrocarburo de suelo contaminado

En la Figura 7.16 se presentan los porcentajes de remoción de hidrocarburos según el tiempo de tratamiento. Se observa que la remoción causada por Tween 20 y el BT de la cepa LM 08 es mucho mayor que el control (agua) y que se va incrementando conforme aumenta el tiempo de tratamiento. La comparación múltiple de medias mediante el estadístico de Tukey ($\alpha=0.05$) indica que el mayor porcentaje de remoción ($43.6 \pm 0.37 \%$) de hidrocarburos tanto por la acción del Tween 20 y el BT de la cepa LM 08 ocurre a las 24 horas. Asimismo, se aprecia que a partir de los 10 minutos de tratamiento y para cada momento de evaluación la remoción por Tween 20 y el BT de LM 08 son similares.

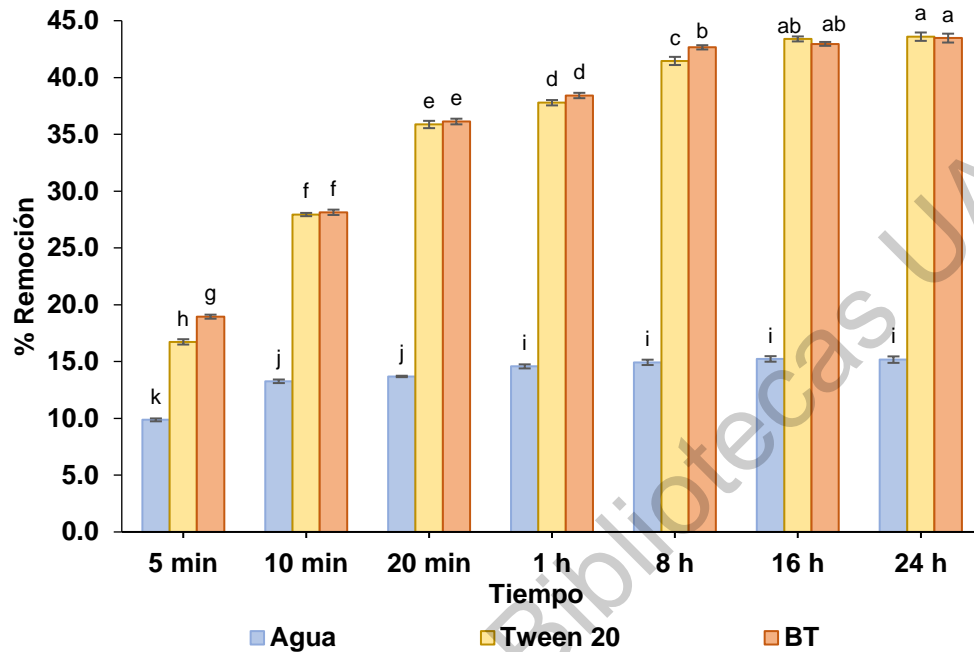


Figura 7.16. Remoción (%) del hidrocarburo del suelo contaminado durante 24 h usando agua, Tween 20 y BT de la cepa LM 08

7.8.2. Degradación de hidrocarburos en agua de mar

En la Figura 7.17 se presentan los porcentajes de degradación de hidrocarburos presentes en el agua de mar según el tiempo de tratamiento. La comparación múltiple de medias mediante el estadístico de Tukey ($\alpha=0.05$) indica que: (1) los controles negativos (ausencia del microorganismo – LM 08) presentaron una menor degradación comparados con los tratamientos, (2) el grado de degradación causada por la bacteria LM 08 es similar a los 9, 18 y 27 días y (3) la degradación provocada por la acción combinada entre la bacteria LM 08 y el BT fue mayor comparada cuando se empleó únicamente la bacteria LM 08, siendo más evidente a los 18 días y se mantuvo de manera similar hasta los 27 días.

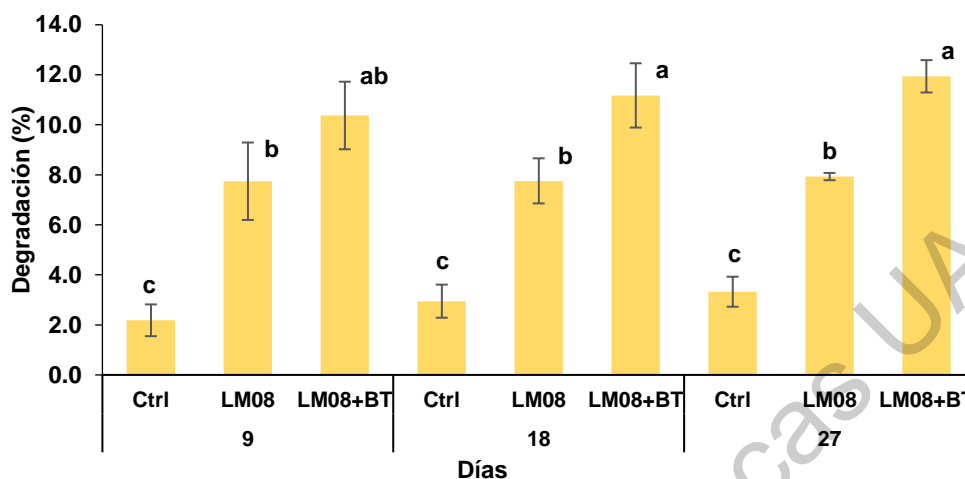


Figura 7.17. Degradación del hidrocarburo del agua marina

De acuerdo con los resultados el uso de hidrocarburo como sustrato y su degradación registra valores por debajo del 15 %. La baja síntesis de BT y posterior degradación de este puede explicarse por el hecho de que estos compuestos son menos biodegradables debido a sus estructuras complejas, lo que conduce a un crecimiento bacteriano débil y posteriormente porcentajes bajos de biodegradación (Chebbi et al., 2017).

7.8.3. Identificación molecular

Se realizó la identificación molecular del aislado LM 08 mediante el análisis del gen de rRNA 16S basado en una reconstrucción filogenética. Los resultados muestran que la similitud de la secuencia del gen de rRNA 16S entre el aislado LM 08 y otras cepas del género *Glutamicibacter* relacionadas filogenéticamente fue de 97.30 a 99.40 %. Los valores obtenidos en este estudio cumplen con los criterios ampliamente aceptados de delimitación de especies actual en bacteriología (Stackebrandt et al., 1994). Tal análisis reveló proximidad de LM 08 con *Glutamicibacter endophyticus*, agrupándose ambas cepas en un mismo lado con un nivel de confianza de 79 % (Figura 7.15). Árbol filogenético construido a partir del método de Máxima Verosimilitud y

derivado del análisis de secuencias del gen de rRNA 16S de la cepa LM 08 y otras cepas de *Glutamicibacter*. Los números representan los valores de Bootstrap expresados como porcentajes de 2500 réplicas. Los números de acceso a *GeneBank* de las secuencias se muestran en paréntesis. Bar, 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.

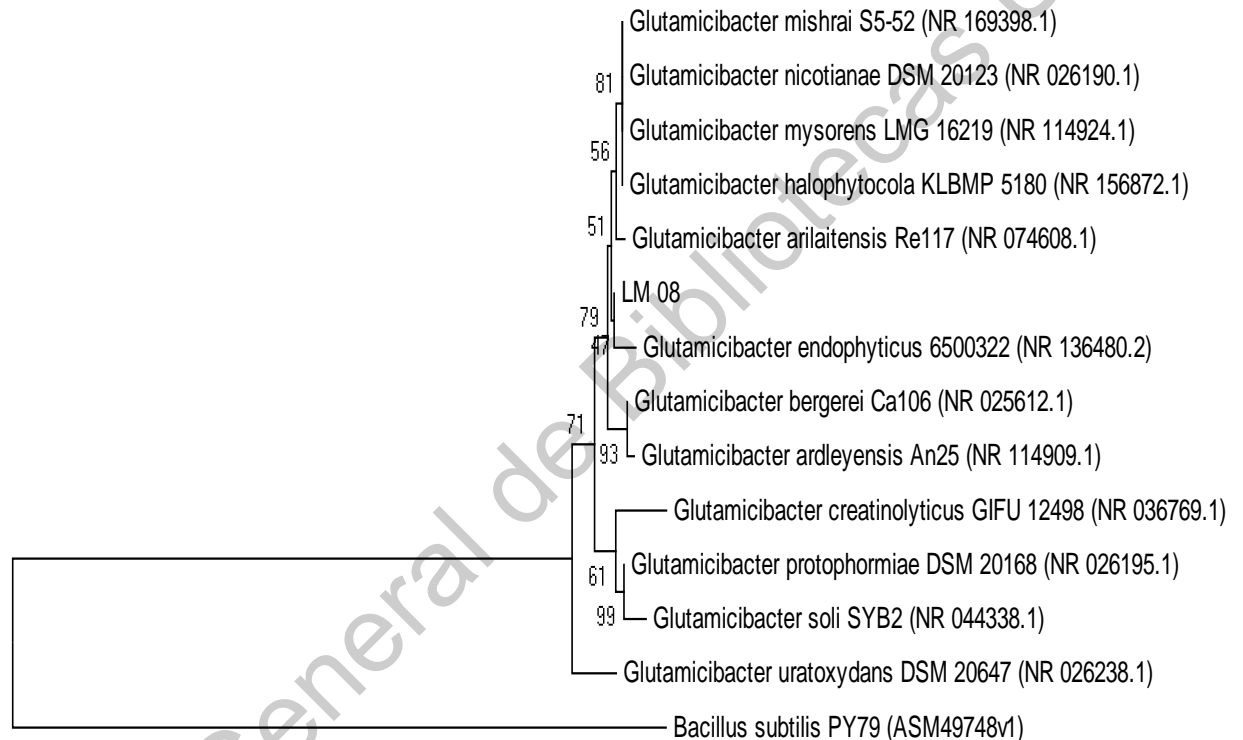


Figura 7.18. Árbol filogenético construido para la cepa LM 08.

Las bacterias del género *Glutamicibacter* debido a su ubicuidad se han aislado de diferentes hábitats, incluidos diferentes tipos de suelo (Shen et al., 2013), muestras clínicas (Hou et al., 1998; Yamamoto et al., 2017), quesos (Monnet et al., 2010), plantas (Feng et al., 2017) y en el tracto urinario de una yegua (Gonçalves et al., 2013).

En relación con el estudio de Yao et al. (2015) consideran que la prevalencia ambiental de las cepas de *Glutamicibacter* sp. en diversos escenarios se debe a su versatilidad y adaptabilidad nutricional teniendo la capacidad para responder a las tensiones ambientales o condiciones poco favorables.

Según Yamamoto et al. (2017) este género juega un papel importante en muchos ecosistemas y realiza diversos procesos biotecnológicos, sin embargo, como patógeno se asocia con diferentes afectaciones al bienestar humano.

Lu et al. (2019) mencionan que la biodisponibilidad y degradabilidad de los HAP presentes en el compostaje de lodos deshidratados es atribuida principalmente a las bacterias pertenecientes a los géneros: *Luteimonas*, *Glutamicibacter*, *Alcanivorax* entre otras.

Ghorbannezhada et al. (2018) investigaron las capacidades mixtas (hongo - bacteria) de *Aspergillus calidoustus* y *Glutamicibacter* sp. en el proceso de degradación de hidrocarburos de petróleo concluyendo que el uso de un cultivo mixta y no individual sería un enfoque prometedor en la biorremediación de la contaminación del petróleo en escenarios perturbados.

8. CONCLUSIONES

La cepa bacteriana aislada denominada LM 08 fue la que mostró mayor capacidad emulsificadora sobre solventes orgánicos.

Fue posible a través de la metodología de superficie de respuesta la emulsificación del xileno fue registrando una máxima de 38.03 cuando se manejaron condiciones de cultivo de la cepa bacteriana LM 08 a 28.95 °C, 7.02 de pH y 0 % p/v de NaCl. Las condiciones de agitación fueron de 175.42 rpm, un tamaño de inóculo de 3.29 % v/v y un tiempo de incubación de 4.78 días se registró un índice máximo de emulsificación en xileno hasta 53.66 %.

Los metabolitos producidos por la cepa LM 08 logró la remoción de HCs presentes en suelo por la acción del BT con el 43.5 % promedio en un tiempo de 16 h muy similar al Tween20. Mientras que la biorremediación mejorada en el ensayo en agua de mar fue \approx 11 %.

Fue posible la identificación bacteriana y la construcción del árbol filogenético del aislado LM 08, mediante la secuenciación del gen RNAr 16S, como herramienta aplicada en la caracterización molecular, cuya similitud fue de 97.30 a 99.40 % con el género y especie *Glutamicibacter endophyticus*.

El aislamiento y el uso de la cepa bacteriana *Glutamicibacter endophyticus* mostró ser una opción viable para sus aplicaciones en la remoción de HCs de sitios contaminados.

9. REFERENCIAS

Abalos, A., Viñas, J., Sabaté, M., Manresa, A., Solanas, M. 2004. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas Aeruginosa* AT10. *Biodegradation*. 15: 249-260.

Abbasi H., Hamedi M. M., Lotfabad T. B., Zahiri H. S., Sharafi H., Masoomi F., MoosaviMovahedi A. A., Ortiz A., Amanlou M., Noghabi K. A. (2012). Biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant, *J. Biosci. Bioeng.* 113 (2): 211-219.

Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S., & Nabi, A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 223(1-3), 143–151.

Al-Wahaibi, Y., Joshi, S., Al-Bahry, S., Elshafie, A., Al-Bemani, A., Shibulal, B. 2014. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 114:324-33.

Amani, H., Müller M., Syldatk, C., Hausmann, R. 2013. Production of microbial rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* MM1011 for ex situ enhanced oil recovery. *Applied biochemistry and biotechnology*. 170 (5): 1080-93.

Anaukwu, C., Ekwealor, A., Ezemba, C., Anakwenze, V., Okafor, U., Archibong, E. 2015. *Pseudomonas monteilli* and *Citrobacter murlinae*, biosurfactant-producing bacteria isolated from Nigerian soil. *British Microbiology Research Journal*. 10 (1): 1-9.

Asalde, G., Enríquez, J. 2015. Rendimiento de surfactantes producidos por bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo. Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo - Perú.

Balba, T., Al-Daher, R., Al-Awadhi, N., Chino, H., Tsuji, H. 1998. Bioremediation of oil contaminated desert soil: the Kuwaiti experience. *Environment International*. 24 (1-2): 163-173.

Befkadu A., Chen Y. 2018. Surfactant-enhanced soil washing for removal of petroleum hydrocarbons from contaminated soils: a review. *Pedosphere*. 28(3):383–410.

Berdichevsky, H., Gutnick Y. 2003. An exocellular protein from the oildegrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan, *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (5): 2608-2615.

Bezerra, O., Rufino, D., Luna, M., Sarubbo, A. 2018. Saponins and microbial biosurfactants: potential raw materials for the formulation of cosmetics. *Biotechnology Progress*. 34, 1483–1493.

British Petroleum (BP). 2018. *Statistical Review of World Energy 2018*, London: BP

Camacho-Chab, J., Guézennec, J., Chan-Bacab, M., Ríos-Leal, E., C. Sinquin, C., Muniz-Salazar, R., De la Rosa-Garcia, S., Reyes-Estebanez, M., Ortega-Morales, B. 2013. Emulsifying activity and stability of a non-toxic bioemulsifier synthesized by *Microbacterium* sp. MC3B-10. *International journal of molecular sciences*. 14 (9):18959-18972.

Cavazos-Arroyo, J., Pérez-Armendáriz, B., Mauricio-Gutiérrez, A. 2014. Impacts and consequences from hydrocarbon spills on agricultural soils in Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*. 11: 539-550.

Chandankere, R., Yao, J., Choi, F., Masakorala, K., Chan, Y. 2013. An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir. *Biochemical Engineering Journal*. 74: 46-53.

Coen D. Contributing Editor (Chapter 15). Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl (eds.) 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*.

Comisión Nacional de Hidrocarburos (CNH). 2013. Reporte de derrames de petróleo crudo al segundo semestre del 2013. [fecha de consulta 19/11/2014].

Cole, J. R., Q. Wang, J. A. Fish, B. Chai, D. M. McGarrell, Y. Sun, C. T. Brown, A. Porras-Alfaro, C. R. Kuske, and J. M. Tiedje. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis *Nucl. Acids Res*. 42.

Cuanalo, Campos Oscar A., y Guillermo Melgarejo Palafox. 2002. Inestabilidad de laderas en la Sierra Norte y Nororiental del estado de Puebla. *Elementos. Ciencia y Cultura*. Vol. 9, No. 47.

De Sousa, J., Da Costa, J., De Almeida, L., Rodrigues, S., Pessoa, O., Melo, M., Goncalves, L. 2011. Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production of biosurfactant by *P. aeruginosa* MSIC02. *Process Biochemistry*. 46: 1831-1839.

Dhami, N. K., Reddy, M. S., & Mukherjee, M. S. 2013. Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: A review. *Frontiers in Microbiology*. 4:314.

Darvishi, P.; Ayatollah, S.; Mowla, D.; Nazi, A. 2011. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPP1-2. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces* 84: 292-300.

DWH NRDA (Deepwater Horizon Natural Resource Damage Assessment) Trustees, 2016. *Deepwater Horizon Oil Spill: Final Programmatic Damage Assessment and Restoration Plan and Final Programmatic Environmental Impact Statement*. NOAA, Silver Spring, MD www.gulfspillrestoration.noaa.gov/restoration-planning/gulf-plan, Accessed date: 23 August 2017.

Dzionic, A., Wojcieszńska, D., Guzik U. 2016. Natural carriers in bioremediation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*. 23: 28-36.

Enerdata, Global energy consumption statistical yearbook 2013. EMEA, Londres, 2013 [en línea] [fecha de consulta: 29/08/2014].

Fernandes, L., Rodrigues, M., Paiva, R., Ayupe, L., McInerney, J., Tótola, R. 2016. Biosurfactant, solvents and polymer production by *Bacillus subtilis* RI4914 and their application for enhanced oil recovery. *Fuel*. 180: 551-557.

Galán C., Nieto M., Forstner J., Rivas J. 2020. Ecology of a fossil cavity in the high mountain range of Aralar, central Jurassic karst. *Sociedad de Ciencias Aranzadi. Laboratorio de Bioespeleología. Alto de Zorroaga. E-20014 San Sebastián - Spain.*

García G., Márquez G., Moreno H. 2016. Characterization of bacterial diversity associated with calcareous deposits and drip-waters, and isolation of calcifying bacteria from two Colombian mines. *Microbiological Research*. 182: 21–30.

Gavrilescu, M., Pavel, L., Cretescu I. 2009. Characterization and remediation of soils contaminated with uranium. *Journal of Hazardous Materials*. 163(2-3): 475-510.

Ghorbannezhada, H., Moghimia H., Mohammad, S., Dastgheibb, M. 2018. Evaluation of heavy petroleum degradation using bacterial-fungal mixed cultures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 164: 434–439

Gómez, S., Gutiérrez, D., Hernández, A., Hernández, C., Losada, M., Mantilla, P. 2008. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *NOVA* 6(9):76-84.

González., J. 2011. Aplicación del ramnolípido producido por *Pseudomonas aeruginosa*, en el lavado y biodegradación de compuestos presentes en suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Tesis para optar el grado de Magister en Bioprocesos. Instituto Politécnico Nacional. México 122 p.

Gonçalves, R., Hurtado R., Rodrigues, L., Profeta R., Rifici, C., Attili, A., Spier, S., Mazzullo, G., Morais-Rodrigues, F., Pinto, A., Brenig, B., Gala-García, A., Cuteri, V., Luiz de Paula, T., Ghosh, P., Seyffert, N., Azevedo, V. 2020. Complete genome analysis of *Glutamicibacter creatinolyticus* from mare abscess and comparative genomics provide insight of diversity and adaptation for *Glutamicibacter*. *Gene* 741:144566

Grid-Arendal. Consumo de energía, desarrollo económico y emisiones de CO₂ en algunos países de América Latina, Norway, 2014 (en línea) [fecha de consulta: 2/09/2014].

Hejazi, R. F. 2002. Oily sludge degradation study under arid conditions using a combination of landfarm and bioreactor technologies. PhD Thesis. Faculty of Engineering and Applied Science. Memorial University of Newfoundland, St. John's, Canada.

Hou, X., Kawamura, Y., Sultana, F., Shu, S., Hirose, K., Goto, K. 1998. Description of *Arthrobacter creatinolyticus* sp. nov., isolated from human urine. *Int. J. Syst. Bacteriol.* (48)423–429.

Huirache-Acuña, R., Rivera-Muñoz, E.M., Pawelec, B., Ostrooumov, M., Maya-Yescas, R., Rico, L. 2014. The use of a natural Mexican zeolite as support of NiMoW sulphide hydrotreating catalysts. *Catalysis Today*. 220-222: 301-309.

INEGI (Instituto Mexicano de Estadística y Geografía). 2015. Capítulo V: Golfo de México. Catálogo de Territorio Insular Mexicano. Pag. 127–172.

Iturbe, R., Flores, C., Castro, A., Torres L. 2007. Sub-soil contamination due to oil spills in zones surrounding oil pipeline-pump stations and oil pipeline right-of-ways in Southwest-Mexico. *Environmental Monitoring and Assessment*. 133: 387–398.

Jain, K., Gupta, K., Gaur, K., Lowry, M., Jaroli, P., Chauhan, K. 2011. Bioremediation of petroleum oil contaminated soil and water. *Research Journal of Environmental Toxicology*. 5 (1): 1-26.

Jiménez, D., Medina, S., Gracida, J. 2010. Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Revista Internacional Contaminación Ambiental*. 26 (1): 65-84.

Joy, S., Rahman, M., Sharma, S. 2017. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Biodegradation and Bioconversion of Hydrocarbons*. Springer, Singapore, p. 259-305.

Kaifer, J., Aguilar, A., Arana, A., Balseiro, C., Torá, I., Caleyá, M., Pijls, C. 2004. *Guía de Tecnologías de Recuperación de Suelos Contaminados*. Comunidad de Madrid, Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Madrid. 175 pp.

Kanga, S., Bonner, J., A. Page, C., Mills, M., Autenrieth, R. 1997. Solubilization of naphthalene and methyl substituted naphthalenes from crude oil using biosurfactants. *Environmental Science & Technology*. 31:556-561.

Kampbell, H., Wilson, T. 1991. Bioventing to treat fuel spills from underground storage tanks. *Journal of Hazardous Materials*. 28 (1-2): 75-80.

Kaur, N., Reddy, S., Mukherjee, A. 2013. Biomineralization of calcium carbonate polymorphs by the bacterial strains isolated from calcareous sites. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(5):707-14.

Kiran, S., Sabu, A., Selvin, J. 2010. Synthesis of silver nanoparticles by glycolipid biosurfactant produced from marine *Brevibacterium casei* MSA19. *Journal of Biotechnology*. 148(4):221-5.

Lawniczak, L., Marecik, R., Chrzanowski, L. 2013. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97: 2327–2339.

Larkin, MA., Blackshields, G., Brown, NP., Chenna, R., McGettigan, PA., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, IM., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, JD., Gibson, TJ., Higgins, DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0.

Bioinformatics. Nov 1;23(21):2947-8.

Lane, M., Smith, R., Mitchell, J., Balmer, C., Barry, P., McDonald, T. 2015. Reproductive outcome and survival of common bottlenose dolphin sampled in Barataria Bay, Louisiana, USA, following the *Deepwater Horizon* oil spill. Proceedings of the royal society. 20151944.

Liu, B., Liu, J., Ju, M., Li, X., Yu, Q. 2016. Purification and characterization of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* Y-1 and its application in remediation of petroleum contaminated soil. Marine Pollution Bulletin. 107(1):46-51.

Liu, Q., Lin, J., Wang, W., Huang, H., Li, S. 2015. Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. Biochemical Engineering Journal. 93: 31-37.

Lu, Y., Zheng G., Zhou W., Wang, J., Zhou L. 2019. Bioleaching conditioning increased the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons to promote their removal during co-composting of industrial and municipal sewage sludges. Science of the Total Environment 665 (2019) 1073–1082

Kuyukina, M., Ivshina, I., Baeva, T., Kochina, O., Gein, S., Chereshnev, V. 2015. Trehalolipid biosurfactants from nonpathogenic *Rhodococcus* actinobacteria with diverse immunomodulatory activities. New biotechnology. 32 (6): 559-568

Maier, M., Soberón-Chávez, G. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: Biosynthesis and potential applications. Applied Microbiology and Biotechnology. 54: 625–633.

Malina, G., Grotenhuis, C., Rulkens, H. 1999. The effect of temperature on the bioventing of soil contaminated with toluene and decane. *Journal of soil contamination*. 8 (4): 455-480.

Martínez-Toledo, A., & Rodríguez-Vázquez, R. (2010). Response surface methodology (Box-Behnken) to improve a liquid media formulation to produce biosurfactant and phenanthrene removal by *Pseudomonas putida*. *Annals of Microbiology*, 61(3), 605–613.

Michel, J., Owens, H., Zengel, S., Graham, A., Nixon, Z., Allard, T. 2013. Extent and degree of shoreline oiling: Deepwater Horizon oil spill, Gulf of Mexico, USA. *PLoS One* 8, 65087. doi: 10.1371/journal.pone.0065087.

Monnet, C., Loux, V., Gibrat, J.F., Spinnler, E., Barbe, V., Vacherie, B., et al. 2010. The *Arthrobacter arilaitensis* Re117 genome sequence reveals its genetic adaptation to the surface of cheese. *PLoS ONE* 5, e15489.

Morita, T., Imura, T., Fukuoka, M., Ryu, K., Igarashi, Y., Hirata, D., Kitamoto. 2014. Spontaneous vesicle formation from sodium salt of acidic sophorolipid and its application as a skin penetration enhancer. *Journal of oleo science*. 63(2): 141-147.

Morita, T., Konish, M., Fukuoka, T. 2007. Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma Antarctica* JCM 10317. *Journal of bioscience and bioengineering*. 104: 78-81.

Mosa, A., Saadoun, I., Kumar, K., Helmy, M., Dhankher, O. 2016. Potential biotechnological strategies for the cleanup of heavy metals and metalloids. *Frontiers in plant science*. 7: 303.

Mulligan, C. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*. 133(2):183-98.

Mukherjee, S., Das, P., Sen, R. 2006. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in biotechnology*. 24(11): 509-15.

Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T., Sivachidambaram, P. 2008. Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Current Science*. Vol. 94, p.736-747.

Navarro, R. 2009. Los desastres en su interacción con la ciencia, la tecnología y la sociedad. *MediSur, revista electrónica*. Vol. 4: 2.

Ndimele E., Saba O., Ojo O., Ndimele C., Anetekhai A. & Erondú 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>

OPEC. Monetary policies and their impact on the oil market. *Monthly Oil Market Report*, 18 January 2018. Vienna, Austria. Organization of the Petroleum Exporting Countries.

Österreicher-Cunha, P., Amaral Vargas, E., Davée, R., Pereira de Campos, M., Ferreira Nunes, M., Costa, A., Dos Santos Antunes, F., Pais da Silva, I., Mano, M. 2004. Evaluation of bioventing on a gasolina-ethanol contaminated undisturbed residual soil. *Journal of Hazardous Materials*. 110 (1-3): 63-76.

Plaza G, Nalecz-Jawecki G, Ulfing K, Brigmon RL (2005) The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere* 59:289-296.

Patowary, R., Patowary, K., Kalita, C., Deka, S. 2018. Application of biosurfactant for enhancement of bioremediation process of crude oil contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 129: 50-60.

Pérez-Juárez, N., Jiménez-Bandala, C. 2019. El Mercado negro de PEMEX. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/338253654>

Peschard, J., Salazar, M., Olea, O. 2020. What We Know So Far about Oil Theft in Mexico: Chiaroscuros of a Persistent Crime. *Revista Mexicana de Ciencias Políticas y Sociales*. Universidad Nacional Autónoma de México. 241: 245-280.

Pruthi, V., & Cameotra, S. S. (1997). Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface active properties by *Serratia marcescens*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 13(1), 133–135.

Qiu, Y., Xiao, F., Wei, X., Wen, Z., Chen S. 2014. Improvement of lichenysin production in *Bacillus licheniformis* by replacement of native promoter of lichenysin biosynthesis operon and medium optimization. *Applied microbiology and biotechnology*. 98 (21): 8895-8903.

Rabiei, A., Sharifinik, M., Niazi, A., Hashemi, A., Ayatollahi, S. 2013. Core flooding tests to investigate the effects of IFT reduction and wettability alteration on oil recovery during MEOR process in an Iranian oil reservoir. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(13): 5979-91.

Redman, D., McGrath, A., Stubblefield, A., Maki, W., Di Toro, D. 2012. Quantifying the concentration of crude oil microdroplets in oil-water preparations. *Environmental toxicology and chemistry*. 31 (8): 1814-1822.

Rivera-Cruz, M., Ferrera-Cerrato, V., Rodriguez, R., Fernández, L. 2002. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra Latinoamericana* 20 (4): 423-434.

Rocha y Silva, P., Rocha e Silva, P., Luna, M., Rufino, D., Santos, A., Sarubbo, A., 2018. Dissolved air flotation combined to biosurfactants: a clean and efficient alternative to treat industrial oily water. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 17, 591–602.

Ron, Z., Rosenberg, E. 2001. Natural roles of biosurfactants. Minireview. *Environmental Microbiology*. 3: 229-236.

Ron, Z., Rosenberg, E., 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current opinion in biotechnology*. 13(3): 249-252.

Rufino, R.D., Moura de Luna, J., Campos Takaki, G., Sarubbo, A. 2014. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Electronic Journal Biotechnology*. Vol. 17 (1): 34-38.

Rusznayk, A., Akob, D. M., Nietzsche, S., Eusterhues, K., Totsche, K. U., Neu, T. R., Kysel, K. 2012. Calcite biomineralization by bacterial isolates from the recently discovered pristine karstic herrenberg cave. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(4): 1157-67.

S. Chen, L. Yang, M. Hu, J. Liu. 2011. Biodegradation of fenvalerate and 3-phenoxybenzoic acid by a novel *Stenotrophomonas sp.* strain ZS-S-01 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Applied microbiology and biotechnology*. 90 (2): 755-767.

S. Goldman, Y. Shabtai, C. Rubinovitz, E. Rosenberg, D.L. Gutnick. 1982. Emulsan in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1: distribution of cell-free and cell-associated cross-reacting material, *Applied and Environmental Microbiology*. 44 (1): 165-170.

Saikia, R., Deka, S., Deka, I., Banat, M. 2012. Isolation of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production. *Annals Microbiology*. 62:753–63.

Santa Anna, M., Sebastian, V., Menezes, P., Alves, L. M., Santos, S., Pereira, N., Freire, G. 2002. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 19: 2.

Sarmiento, M., Espinoza, E., Álvarez J. 2003. Emergencias ambientales asociadas a sustancias químicas en México. *Gaceta Ecológica*, Instituto Nacional de Ecología. No. 066.

Schlumberger Company (2016) Heavy Oil. (En línea) [fecha de consulta: 15/07/2018].

Scholz-Böttcher, B.M., S. Ahlf, F. VazquezGuitierrez, & J. Rullkötter, 2008. Sources of hydrocarbon pollution in surface sediments of the Campeche Sound, Gulf of Mexico, revealed by biomarker analysis. *Organic Geochemistry*. 39: 1104-1108.

Schrope, M., 2010. The lost legacy of the last great oil spill. *Nature*. 466: 304-305.

Schwacke, H., Smith, R., Townsend, I., Wells, S., Hart, B., Balmer, C. 2014. Health of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in Barataria Bay, Louisiana,

following the *Deepwater Horizon* oil spill. *Environmental science & technology*. 48(1): 93–103.

SENER (Secretaría de Energía). 2017. *Prospectiva de petróleo y petrolíferos 2017-2031*. (En línea) [Fecha de consulta: 10/09/2018].

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.

Shen,Z., Han,J., Wang,Y., Sahin,O., Zhang,Q. 2013. The contribution of ArsB to arsenic Resistance in *Campylobacter jejuni*. *PLoS ONE* 8, e58894.

Stackebrandt, E., Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacterio* 44, 846–849.

Sidkey M., Al Hadry E. 2014. Biosurfactant Production by *Bacillus cereus*, B7 from Lubricant Oil Waste. *International journal of science and research (IJSR)*. Vol 3: 1.

Silva, J., Rocha, M., Rufino, D., Luna, M., Silva, O., Sarubbo, A. 2014a. Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*.117, 36–41.

Smith, R., Rowles, K., Hart, B., Townsend, I., Wells, S., Zolman, S. 2017. Slow recovery of Barataria Bay dolphin health following the *Deepwater Horizon* oil spill (2013–2014), with evidence of persistent lung disease and impaired stress response. *Endangered Species Research*. 33(1): 127–142.

Sobrinho, B., Luna, M., Rufino, D., Porto, L., Sarubbo, L. 2014. Biosurfactants: Classification, Properties and Environmental Applications. *Biotechnology*. 11:1–29.

Solaiman, D., Ashby, R., Zerkowski J. 2007. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. *Biotechnology letters*. 29(9): 1341-7.

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.

Thavasi, R., Nambaru, S., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., Banat, M. 2011. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* from renewable resources. *Indian journal of microbiology*. 51 (1): 30–36.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*:30 2725-2729.

Thorn, A., Kennedy, R. 2002. ¹⁵N NMR investigation of the covalent binding of reduced TNT amines to soil humic acid, model compounds, and lignocellulose. *Environmental science and technology*.36 (17): 3787-3796.

Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., and Palmer, J.D. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 46: 327–338.

Urum, K., Pekdemir, T. 2004. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing, *Chemosphere* 57: 1139-1150.

Van Hamme, J., Singh, D., Ward, O. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. 67(4): 503-49.

Vijayakuma, S., Saravanan, V., 2015. Biosurfactants-types, sources and applications. *Research journal of microbiology*. 10 (5): 181–192.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703

Yañez-Ocampo, G., Wong-Villarreal, A. 2013. Biosurfactantes microbianos, producción potencial con residuos agroindustriales de Chiapas. *Revista BioTecnología* 17 (3): 12-28.

Yakimov, M., Timmis, K., Wray, V., Fredrickson H. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied and environmental microbiology*. 61(5): 1706-1713.

Yamamoto, K., Hayakawa, K., Nagamatsu, M., Fujiya, Y., Mawatari, M., Kutsuna, S., et al. 2017. Bacteremia Due to *Arthrobacter creatinolyticus* in an Elderly Diabetic Man with Acute Cholangitis. *Jpn. J. Infect. Dis.* 70, 201–202.

Yao, Y., Tang, H., Su, F., Xu, P. 2015. Comparative genome analysis reveals the molecular basis of nicotine degradation and survival capacities of *Arthrobacter*. *Sci. Rep.* 5, 8642.

Zhang, C., Daprato, C., Nishino, F., Spain, C., Hughes, B. 2001. Remediation of dinitrotoluene contaminated soils from former ammunition plants: Soil washing efficiency and effective process monitoring in bioslurry reactors. *Journal of hazardous materials*. 87(1-3): 139-154.

Zhao, F., Shi, R., Cui, Q., Han, S., Dong, H., Zhang, Y. 2017. Biosurfactant production under diverse conditions by two kinds of biosurfactant-producing

bacteria for microbial enhanced oil recovery. Journal of petroleum science and engineering. 157: 124-130.

Dirección General de Bibliotecas UAQ