



Centro de Estudios de Biotecnología Industrial
Universidad de Oriente

**Producción, caracterización y aplicabilidad en la industria petrolera de
los ramnolípidos sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* Y3-B1A**

Tesis presentada en opción del grado científico de
Doctor en Ciencias Biológicas

M. Sc. Yaima Barrios San Martín

Santiago de Cuba, 2022



Centro de Estudios de Biotecnología Industrial
Universidad de Oriente

**Producción, caracterización y aplicabilidad en la industria petrolera de
los ramnolípidos sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* Y3-B1A**

Tesis presentada en opción del grado científico de
Doctor en Ciencias Biológicas

Autor: M. Sc. Yaima Barrios San Martín

Tutores: Dr. C. Arelis Ábalos Rodríguez, PT
Dr. C. María Isabel Sánchez López, PT
Dr. C Odalys Rodríguez Gamez, PT

Santiago de Cuba, 2022

AGRADECIMIENTOS

Debo admitir que hacer el doctorado, aunque fascinante, no ha sido un camino de rosas, hubo momentos de frustraciones y estrés, pero todo se compensa con el balance global. Después de ver la evolución personal y profesional, y de haber conocido a personas maravillosas que me acompañaron en esta etapa de profundo aprendizaje; no cambiaría ni un día. A ellos dedicaré algunas palabras de agradecimientos:

Ante todo, agradecer a la Dr. C. Arelis Ábalos de la Universidad de Oriente, por aceptar amablemente ser mi tutora cuando apenas me conocía, por la confianza depositada en mí, por el apoyo brindado a este trabajo, el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor. Por la amistad infinita que ha crecido en el andar y por su paciencia, muchas gracias.

Agradezco a la Dr. C. María Isabel López de la Universidad de La Habana, quien fue mi profe en la licenciatura y se sumó como tutora a este equipo, sus orientaciones y discusión crítica también permitieron que esta tesis llegara a buen término.

Gracias a la Dr. C. Odalys Gámez de la Universidad de Oriente, concedora de los ramnolípidos, por la revisión cuidadosa que ha realizado de este texto y sus sugerencias.

A la Dr. C. Angeles Manresa de la Universidad de Barcelona, con cuyo trabajo estaré siempre en deuda. Gracias por facilitarme su laboratorio, su tiempo y sus ideas. Sus consejos y el ánimo que me dio fueron claves para seguir adelante y llegar hasta aquí.

A las Dr. C. Magda Grifoll y Ana Marqués, de la Universidad de Barcelona, gracias por la acogida en sus laboratorios, por el apoyo, por brindarme sus conocimientos y aclarar mis dudas.

Igualmente agradezco a las instituciones que hicieron posible la realización del trabajo presentado en esta tesis: Unión CubaPetróleo, Centro de Investigación del Petróleo y Empresa Comercializadora de Combustibles. Gracias por la confianza.

Agradezco al Comité de Doctorado de Biotecnología de la Universidad de Oriente, por aceptar a esta doctoranda del otro extremo del país, en especial a Catalina y Norita.

A mis compañeras del laboratorio del CEINPET, que siempre me apoyaron y soportaron: Silvia, Francis, Reglita, Danay y Rosa. Con especial cariño a Heidy, que se aventuró conmigo en el mundo de los ramnolípidos y terminó enamorándose de ellos.

A Anderson, Sara, Marc y Karla, mis compañeros de laboratorio en Barcelona, por todo ese tiempo que convivimos juntos y las charlas multilingües. Mi querida Shirin, mi amiga inseparable en Tensis, mi compañera de almuerzo, de nostalgia y tardes de viernes, gracias.

En este camino tuve varios jefes que me guiaron y comprendieron, a los que agradezco sus enseñanzas. Con especial afecto retribuyo a Rafael, por la confianza que siempre tuvo en que podría lograrlo; y a Ariel, su apoyo fue trascendental en la arrancada.

A los compañeros del CEBI que gentilmente me acogieron y compartieron sus conocimientos.

A mis compañeros de la ENCC, que me acogieron en mi recta final, en especial a los santiagueros que siempre me apoyaron en mis estancias en la tierra caliente.

A Jenniffer, otra vez amiga estuviste ahí para mí, apoyándome de forma indecible para terminar mi tercera tesis.

A Daniel, Neus y Sonya, mi familia catalana que me mimó.

A mi tata y mi Gaby, gracias por el aliento que me dieron.

A mi amiga Yisell, sin su infinita ayuda el camino habría sido más difícil, hemos soñado juntas con este día.

A mis padres, por ser los principales promotores de mis sueños, por creer en mis expectativas, por los consejos, valores y principios que me inculcaron; por el tiempo robado a la historia familiar.

Dicen que los primeros son los últimos y los últimos, los primeros. Tú estás al final y no por eso eres menos importante, sino todo lo contrario, sin tu apoyo este trabajo nunca se habría escrito. No puedo redactar este párrafo sin que se me humedezcan los ojos. Gracias Fiallo por hacerme reír en los malos momentos, por la comprensión, los consejos, la logística, la infinita confianza y por resistir conmigo la distancia; este trabajo es también tuyo.

***A todos los que de alguna manera me ayudaron, con infinito amor y ternura,
gracias...***

SÍNTESIS

El descubrimiento y explotación del petróleo crudo ha tenido un impacto positivo en el desarrollo de la economía y la sociedad, sin embargo, su avance genera contaminación al medio ambiente, a la vez que disminuyen las reservas. La evolución de las tecnologías sostenibles ha conducido a la búsqueda de compuestos naturales biodegradables para darle solución a esta y otras problemáticas. Se espera que en los próximos años los tensioactivos biológicos sustituyan a los químicos, aunque aún está limitado por la poca disponibilidad de compañías que los produzcan a escala industrial, y los costos de producción y purificación. En este trabajo se evaluó la producción de biotensioactivos de 23 cepas provenientes de ecosistemas contaminados con hidrocarburos, siendo los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* Y3-B1A los más eficientes y eficaces. Se presenta una estrategia de cultivo que incrementa 2,91 veces la productividad volumétrica de ramnolípidos. Se comprobó la potencialidad del crudo de ramnolípidos (sin purificar), de formar emulsiones estables con queroseno y petróleo crudo en condiciones extremas de pH, salinidad y temperatura. Este es un bioproducto versátil que permitió a escala de laboratorio remover el 85,5 % del vanadio de sedimentos contaminados y recuperar el 21 % del petróleo crudo atrapado en columnas, confirmando su posible uso en la recuperación mejorada de crudo. Además, se determinó que tiene un efecto positivo como agente bioestimulador de la degradación de hidrocarburos en tres escalas diferentes (laboratorio, microcosmos y campo) sin provocar efectos tóxicos.

ABREVIATURAS

AOR:	índice de recobrado adicional
BA:	bioaumentación
BE:	bioestimulación
CEINPET:	Centro de Investigación del Petróleo
CEOR:	recuperación mejorada de crudo con productos químicos
CM:	cultivo mixto
CMC:	concentración micelar crítica
CUPET:	Unión Cubapetróleo
DMC:	dilución micelar crítica
DTCC:	División Territorial Comercializadora de Combustibles
E:	índice de emulsificación
EOR/IOR:	recuperación mejorada/asistida de crudo
GA:	grasas y aceites
H:	índice de adhesión bacteriana a hidrocarburos / {índice de hidrofobicidad
HAA:	ácidos 3-(3 hidroxialcanoiloxi) alcanoicos
HTP:	hidrocarburos totales del petróleo
MEOR:	recuperación mejorada/asistida de crudo con microorganismos
MMM:	medio mínimo mineral
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PQS:	moléculas señal quinolona de Pseudomonas
QS:	sistema quorum sensing
RL:	ramnolípidos
S:	índice de estabilidad de la emulsión
TS:	tensión superficial
vvm	1 volumen de aire / volumen de medio por minuto

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1. Biotensioactivos	9
2.2. Ramnolípidos: biosíntesis y características	10
2.3. Selección de microorganismos productores de ramnolípidos	11
2.4. Producción de ramnolípidos a gran escala.....	12
2.4.1. Estrategias para incrementar el rendimiento de ramnolípidos	14
2.4.2. Factores que influyen en la producción de ramnolípidos	16
2.5. Aplicaciones de los ramnolípidos en la industria petrolera	17
2.5.1. Biorremediación de ecosistemas contaminados con hidrocarburos.....	18
2.5.1.1. Toxicidad y biodegradabilidad de los ramnolípidos en el proceso de biorremediación.....	20
2.5.2. Remoción de vanadio	21
2.5.3. Recuperación mejorada de petróleo con microorganismos	24
2.5.3.1. Técnicas de MEOR empleando biotensioactivos	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Selección primaria de cepas productoras de biotensioactivos	27
3.2. Selección de cepas productoras de ramnolípidos	28
3.3. Clasificación taxonómica de la cepa seleccionada	29
3.4. Purificación de los ramnolípidos	30
3.5. Caracterización físico química y toxicológica de los ramnolípidos	31
3.6. Estrategia para incrementar la productividad volumétrica en la producción de ramnolípidos por la cepa seleccionada.....	31
3.6.1. Inóculo	31
3.6.2. Condiciones de cultivo	32
3.6.3. Cinética de crecimiento y producción de ramnolípidos de la cepa seleccionada en erlenmeyers de 3 L de capacidad.....	32
3.6.4. Selección de la concentración inicial de biomasa e inductor para la producción de ramnolípidos.....	33
3.6.5. Determinación del tiempo de cultivo para alcanzar la máxima productividad volumétrica.....	33
3.6.6. Evaluación del número de ciclos de cultivo secuencial discontinuo.....	34
3.6.7. Evaluación del crecimiento y producción de ramnolípidos de la cepa seleccionada en reactor Biostat B-MO.....	34
3.6.8. Determinación del número de ciclos de cultivo en reactor.....	35
3.7. Estudio de la estabilidad de las emulsiones formadas por los ramnolípidos	36
3.7.1. Actividad emulsificante con diferentes compuestos hidrofóbicos.....	36
3.7.2. Efecto del pH, temperatura y salinidad en la actividad superficial	36
3.7.3. Efecto del pH, temperatura y salinidad en la estabilidad de las emulsiones	36

3.8. Aplicaciones de los ramnolípidos producidos por la cepa seleccionada en la industria petrolera.....	37
3.8.1. Remoción de vanadio a escala de laboratorio.....	37
3.8.2. Biodegradación de hidrocarburos.....	38
3.8.2.1. Cultivo mixto.....	38
3.8.2.2. Diseño del ensayo.....	39
3.8.3. Recuperación de petróleo crudo en columnas empacadas.....	41
3.9. Determinaciones analíticas.....	42
3.10. Análisis estadístico.....	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Selección primaria de cepas productoras de biotensioactivos.....	46
4.2. Selección de cepas productoras de ramnolípidos.....	47
4.3. Clasificación taxonómica de la cepa Y3-B1A.....	48
4.4. Caracterización físico química y toxicológica de los ramnolípidos producidos por <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A.....	49
4.5. Estrategia para incrementar la productividad volumétrica de los ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A.....	51
4.5.1. Cinética de crecimiento y producción de ramnolípidos en incubadora con agitación orbital	51
4.5.2. Selección de la concentración de biomasa inicial e inductor para la producción de ramnolípidos.....	53
4.5.3. Determinación del tiempo de cultivo óptimo en incubadora con agitación orbital	54
4.5.4. Evaluación del número de ciclos para incrementar la productividad volumétrica en incubadora con agitación orbital.....	55
4.5.5. Cinética de crecimiento y producción de ramnolípidos en reactor.....	56
4.5.6. Determinación del número de ciclos para la producción de ramnolípidos en reactor	57
4.6. Evaluación de la estabilidad (S) de los ramnolípidos producidos por <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A	59
4.6.1. Actividad emulsificante (E) con diferentes compuestos hidrofóbicos.....	59
4.6.2. Efecto de las condiciones ambientales (pH, temperatura y salinidad) en la actividad superficial y emulsificante.....	59
4.6.3. Influencia de la esterilización en la estabilidad de la emulsión.....	62
4.7. Aplicaciones del crudo de ramnolípidos producidos por <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A en la industria petrolera.....	63
4.7.1. Remoción de vanadio.....	63
4.7.2. Degradación de crudo.....	63
4.7.2.1. Laboratorio.....	64
4.7.2.2. Microcosmos.....	64
4.7.2.3. Parcelas.....	66
4.7.3. Recuperación mejorada de petróleo crudo en columnas.....	68
5. DISCUSIÓN.....	69
5.1. Selección y clasificación taxonómica de una cepa productora de ramnolípidos.....	69

5.2. Caracterización físico química y toxicológica de los ramnolípidos producidos por <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A	72
5.3. Estrategia de incremento de la productividad volumétrica de los ramnolípidos producidos por <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A.....	75
5.4. Evaluación de la estabilidad del crudo de ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A....	83
5.5. Aplicaciones del crudo de ramnolípidos producidos por <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A en la industria petrolera:.....	86
5.5.1. Remoción de vanadio	86
5.5.2. Biodegradación de hidrocarburos.....	89
5.5.3. Recuperación de petróleo crudo en columnas empacadas	94
5.6. Producción y aplicación sostenible de los ramnolípidos	96
6. CONCLUSIONES	99
7. RECOMENDACIONES	100
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	i
9. AUTOBIOGRAFÍA VINCULADA CON LA TESIS	XXII

Índice de figuras

Figura 1. Vía de síntesis de ramnolípidos en <i>P. aeruginosa</i>	10
Figura 2. Estrategias desarrolladas para incrementar la producción de biotensioactivos.....	13
Figura 3. Interacciones entre los ramnolípidos, hidrocarburos, células microbianas y suelos durante la biorremediación.	15
Figura 4. Mecanismos de remoción de metales pesados en el suelo empleando biotensioactivos.....	23
Figura 5. Diferentes mecanismos de actuación de los biotensioactivos en la recuperación de crudo mejorada con microorganismos.....	28
Figura 6. Preparación de las columnas empacadas con arena para la determinación del índice de recobro adicional.....	29
Figura 7. Agrupamiento de las cepas aisladas en función de la actividad superficial demostrada con los análisis E ₂₄ , E ₇₂ , H y tensión superficial.....	47
Figura 8. Variación de la tensión superficial en función de la concentración del caldo de cultivo libre de células de las cepas D6, Y3-B1A, Y10-B10.	56
Figura 9. Árbol filogenético de la cepa Y3-B1A comparada con otras especies del género <i>Pseudomonas</i> . El árbol se generó por el método de <i>Neighbor Joining</i>	56
Figura 10. Aplicación del método API 20 NE en la clasificación de la cepa Y3-B1A..	56
Figura 11. Variación de la tensión superficial en función de la concentración de los ramnolípidos purificados de la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Y3-B1A.	49
Figura 12. Espectro infrarrojo del biotensioactivo producido por la cepa <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A.....	50

Figura 13. Perfil de crecimiento y de producción de ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol (4% m/v) incubado durante 96 h en agitación orbital a 130 r.min ⁻¹ y 30 °C.....	52
Figura 14. Análisis matemático de la optimización de los valores de biomasa inicial en inductor para incrementar la productividad volumétrica durante el crecimiento y producción de ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v) incubado durante 96 h en agitación orbital a 130 r.min ⁻¹ y 30 °C. .	67
Figura 15. Cinética de crecimiento y de producción de ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol 4 %, utilizando una biomasa inicial de 2,1 g.L ⁻¹ y el inductor a 1,25 %.....	68
Figura 16. Cinética de crecimiento y de producción de ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v), biomasa inicial de 2,1 g.L ⁻¹ e inductor 1,25 %, cinco ciclos de cultivo de 60 horas.	57
Figura 17. Estrategia diseñada para incrementar la productividad volumétrica de ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A en cultivo agitado en erlenmeyers.	57
Figura 18. Incremento de productividad volumétrica de ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A durante el cultivo agitado en erlenmeyers.	57
Figura 19. Cinética de crecimiento y de producción de ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v), biomasa inicial de 2,1 g.L ⁻¹ e inductor 1,25 % y agitación de 130 r.min ⁻¹ en reactor Biostat B-MO.....	69
Figura 20. Análisis matemático de la optimización del tiempo y determinación del efecto de la inyección de oxígeno puro para incrementar la productividad volumétrica de ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v), biomasa inicial de 2,1 g.L ⁻¹ e inductor 1,25 % y agitación de 130 r.min ⁻¹ en reactor Biostat B-MO.....	69
Figura 21. Cinética de crecimiento y producción de ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A durante 5 ciclos de cultivo en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v), inyección de aire enriquecido con oxígeno (15 %, 1 vvm) biomasa inicial de 2,1 g.L ⁻¹ e inductor 1,25 %, 130 r.min ⁻¹ en reactor Biostat B-MO.....	61
Figura 22. Estrategia diseñada para incrementar la productividad volumétrica de ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A en el reactor Biostat B-MO.	62
Figura 23. Incremento de la productividad volumétrica durante el diseño de la estrategia en el reactor Biostat B-MO.	62
Figura 24. Comportamiento del índice de emulsificación de las emulsiones de ramnolípidos frente a cuatro compuestos hidrófobos de diferente estructura química: diésel, queroseno y petróleo crudo.	61
Figura 25. Evaluación de la influencia de A) pH, B) Salinidad, y C) Temperatura, en el índice de emulsificación de las emulsiones formadas por el ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A con queroseno.	71

Figura 26. Estabilidad de las emulsiones de los ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A, esterilizado con calor húmedo (121°C, 15 min).....	71
Figura 27. Biodegradación de hidrocarburos utilizando ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A a los 28 días de cultivo: (A) control, (B) cultivo mixto (CM), (C) cultivo mixto + ramnolípidos (CM+RL).....	73
Figura 28. Conteo de microorganismos en el proceso de biorremediación en microcosmos.....	74
Figura 29. Conteo de microorganismos en el proceso de biorremediación en parcelas.....	67
Figura 30. Índice de recuperación adicional de petróleo crudo a los 28 días en columnas empleando ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1.....	81

Índice de tablas

Tabla 1. Ventajas y desventajas de la producción y empleo de los biotensioactivos...9	
Tabla 2. Métodos de ensayos para la selección de microorganismos productores de biotensioactivos.....	13
Tabla 3. Remoción de hidrocarburos del petróleo empleando ramnolípidos.	15
Tabla 4. Remoción de metales con ramnolípidos.	23
Tabla 5. Resultados de recuperación residual de crudo a escala de laboratorio empleando biotensioactivos.....	28
Tabla 6. Origen de las cepas de la colección del CEINPET empleadas en el proceso de selección.	34
Tabla 7. Diseño de experimento factorial 3 ² para determinar a concentración inicial de biomasa y adición de inductor en MMM con glicerol (4 % m/v).	33
Tabla 8. Diseño del experimento para el estudio en reactor de la inyección de oxígeno y el tiempo de cultivo en MMM con glicerol (4 % m/v).	35
Tabla 9. Determinación de presencia de ramnolípidos mediante los índices E ₂₄ , E ₇₂ , H y la tensión superficial.....	55
Tabla 10. Determinación de presencia de ramnolípidos en los caldos de cultivo libres de células de las cepas seleccionadas: D6, Y3-B1A, Y10-B10.....	56
Tabla 11. Resultados de las pruebas bioquímicas confirmatorias de la especie.	56
Tabla 12. Iones pseudomoleculares observados en los ramnolípidos producidos por <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A.....	50
Tabla 13. Evaluación toxicológica de los ramnolípidos producidos por <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A empleando nauplios de <i>Artemia salina</i> y semillas de <i>Solanum lycopersicum</i>	50

Tabla 14. Productividad volumétrica calculada durante el crecimiento y la producción de ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v) incubado durante 96 h en agitación orbital a 130 r.min ⁻¹ y 30 °C.....	52
Tabla 15. Concentraciones óptimas de biomasa inicial e inductor para incrementar la productividad volumétrica en el cultivo de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v) incubado durante 96 h en agitación orbital a 130 r.min ⁻¹ y 30 °C.	54
Tabla 16. Valores de productividad volumétrica calculados por intervalos de tiempo en el cultivo de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol 4 %, biomasa inicial de 2,1 g.L ⁻¹ e inductor al 1,25 %, incubado durante 96 h en agitación orbital a 130 r.min ⁻¹ y 30 °C.	68
Tabla 17. Valores de productividad volumétrica en el proceso de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A y de producción de ramnolípidos en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v), biomasa inicial de 2,1 g.L ⁻¹ e inductor 1,25 %, cinco ciclos de cultivo de 60 horas.	57
Tabla 18. Valores óptimos de tiempo y empleo de oxígeno para incrementar la productividad volumétrica calculada durante el crecimiento y la producción de ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v), biomasa inicial de 2,1 g.L ⁻¹ e inductor 1,25 % y agitación de 130 r.min ⁻¹ en reactor Biostat B-MO.....	57
Tabla 19. Influencia del número de ciclos de cultivo en la productividad volumétrica de <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A durante 5 ciclos de cultivo en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v), inyección de aire enriquecido con oxígeno (15 %, 1 vvm) biomasa inicial de 2,1 g.L ⁻¹ e inductor 1,25 %, 130 r.min ⁻¹ en reactor Biostat B-MO.....	61
Tabla 20. Estabilidad de las emulsiones de los ramnolípidos producidos por <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A con diferentes hidrocarburos calculada a los 14 y 60 días de incubación.....	61
Tabla 21. Estabilidad de las emulsiones de los ramnolípidos producidos por <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A con queroseno en variadas condiciones ambientales, calculada a los 14 y 60 días.....	60
Tabla 22. Estabilidad de las emulsiones de del crudo de ramnolípidos producidos por <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A y previamente esterilizado con queroseno, calculada a los 14 y 60 días.	71
Tabla 23. Eficiencia de la remoción de vanadio de los ramnolípidos producidos por <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A.....	63
Tabla 24. Efecto de la adición de los ramnolípidos producidos por <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A en la biodegradación de crudo. Las células se cultivaron en MMM suplementado con crudo (1 % m/v).....	74
Tabla 25. Contenido de nitrógeno y fósforo del suelo en el ensayo de microcosmos durante la biodegradación de hidrocarburos.....	77

Tabla 26. Biodegradación de hidrocarburos en microcosmos a los 30 días de tratamiento.	77
Tabla 27. Influencia de los ramnolípidos en la biodegradación de hidrocarburos en microcosmos.	77
Tabla 28. Contenido de nitrógeno y fósforo del suelo de las parcelas durante la biodegradación de hidrocarburos.	78
Tabla 29. Biodegradación de hidrocarburos en parcelas a los 30 días de tratamiento.	78
Tabla 30. Influencia de los ramnolípidos en la biodegradación de hidrocarburos en parcelas.	78
Tabla 31. Ensayo toxicológico con <i>Eisenia andrei</i> de las parcelas tratadas por bioestimulación y bioaumentación.	68
Tabla 32. Parámetros de la recuperación de petróleo crudo en columnas empacadas con arena empleando ramnolípidos producidos por <i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A.	81
Tabla 33. Producción de ramnolípidos por cepas de <i>P. aeruginosa</i> empleando glicerol como fuente de carbono.	78
Tabla 34. Estrategias de incremento de la producción de ramnolípidos por cepas de la especie <i>P. aeruginosa</i> : Estudios en erlenmeyers agitados.	81
Tabla 35. Estrategias de incremento de la producción de ramnolípidos por cepas de la especie <i>P. aeruginosa</i> : Estudios en reactor.	82
Tabla 36. Lista de metales pesados removidos por ramnolípidos en diferentes condiciones.	88
Tabla 37. Remoción de vanadio de suelo y sedimentos.	89
Tabla 38. Listado de ensayos a escala de laboratorio de degradación de hidrocarburos empleando biotensioactivos.	91
Tabla 39. Listado de ensayos en microcosmos de degradación de hidrocarburos empleando biotensioactivos.	92

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El petróleo crudo es crucial para la economía mundial, por ser un producto básico para la generación de energía y en varias industrias: automovilística, manufactura, farmacéutica, química, producción de fertilizantes, pesticidas y plásticos [1, 2]. La investigación y exploración de los combustibles fósiles, y el uso de hidrocarburos, como el petróleo crudo, ha tenido un impacto positivo en la economía y la sociedad [3]. Sin embargo, el incremento de la producción petrolera genera dos fenómenos importantes: (I) incremento de la contaminación ambiental [1], la cual se ha convertido en un problema de gran urgencia. Los contaminantes producidos por estas actividades tales como metales pesados y compuestos orgánicos e inorgánicos recalcitrantes terminan en los suelos, ríos y océanos, resultando perjudiciales para la flora y fauna terrestre y marina [4]. Y (II) la declinación de la producción de petróleo crudo en las próximas décadas, lo que podría provocar un aumento de su precio en el mercado en un tiempo relativamente corto. Además, es necesario tener en cuenta que el suministro del combustible fósil depende de la estabilidad socio-política de los países productores [3, 5, 6].

La declinación de las reservas de crudo ligero ha propiciado el incremento en la exploración y explotación del crudo pesado. La mayoría de los crudos contienen diferentes metales (sodio, potasio, litio, calcio, estroncio, cobre, plata, vanadio, manganeso, estaño, plomo, cobalto, titanio, oro, cromo y níquel) en concentraciones que varían desde elementos trazas a 1000 ppm dependiendo del origen. De estos metales los más abundantes e indeseables son el vanadio (0,1 – 1200 ppm) y el níquel (traza a 150 ppm) [7]. El vanadio está ampliamente distribuido en el planeta y ha sido

reconocido como un contaminante potencialmente peligroso al mismo nivel que el mercurio, plomo y arsénico [8–10].

El incremento de la concentración de vanadio en el medio ambiente se considera alarmante. Aunque el contenido total de este metal sigue siendo útil en muchas áreas, el conocimiento de la especiación es de gran importancia debido a que la toxicidad, movilidad, biodisponibilidad y bioacumulación dependen de las especies químicas. Las características biológicas y fisiológicas del vanadio también dependen de sus estados de oxidación, los cuales son principalmente cationes con valencia +4 y +5 en minerales. Generalmente, los compuestos V (+5) son más móviles y más tóxicos para las plantas y animales que los V (+4). Los niveles altos de vanadio tienen un efecto adverso en la biomasa microbiana y la actividad enzimática en el suelo [11].

Los avances en las tecnologías sostenibles han conducido a la búsqueda de compuestos naturales biodegradables, para sanear ecosistemas contaminados con hidrocarburos [12, 13]. La legislación ambiental y las restricciones gubernamentales relacionadas con el uso de detergentes tóxicos en productos también ha contribuido al desarrollo del uso de los biotensioactivos como posible alternativa a los tensioactivos sintéticos [3]. En comparación con estos últimos, los biotensioactivos son más eficientes en la reducción de la tensión superficial e interfacial, son más tolerantes a altas temperaturas, así como a valores extremos de pH y fuerza iónica. Los biotensioactivos son considerados la próxima generación de los tensioactivos industriales debido a su compatibilidad con el medio ambiente, su baja (o nula) toxicidad y su alta biodegradabilidad entre otras ventajas [1, 3, 14]. También son considerados productos versátiles gracias a su amplia aplicabilidad en la industria

petrolera, química, alimenticia, farmacéutica, textil, cosmética y agrícola [15–17]. Actualmente los biotensioactivos representan el 5 % del mercado de tensioactivos [5], sin embargo, en un futuro no muy lejano se espera que el mercado de los biotensioactivos supere al de los tensioactivos sintéticos [3, 5, 6].

Los biotensioactivos constituyen un grupo de compuestos estructuralmente diversos, que va desde moléculas simples como los fosfolípidos y ácidos grasos hasta glicolípidos, lipopéptidos y polímeros de alto peso molecular. La parte hidrofílica puede estar compuesta por un carbohidrato, aminoácido, péptido cíclico, fosfato, ácido carboxílico o alcohol; mientras que la hidrofóbica, puede estar compuesta por cadenas largas de ácidos grasos, ácidos grasos hidroxilados u otras estructuras [1, 13, 18]. La mayoría de los biotensioactivos son glicolípidos, de estos los más conocidos son los ramnolípidos y soforolípidos [19–21].

Los ramnolípidos son metabolitos extracelulares producidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* en una amplia variedad de sustratos [22–24]. Son adecuados para varias aplicaciones industriales debido a su actividad superficial y biológica. Se han empleado en la biorremediación de hidrocarburos, metales pesados, pesticidas, plásticos; en la recuperación mejorada de petróleo; en la agricultura, y en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica [3, 14, 25–27]. Algunos ramnolípidos tienen propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales [27, 28].

El registro de patentes internacionales para la aplicación de biotensioactivos crece de manera significativa año tras año. Las estadísticas muestran que existen en el mundo más de 250 patentes relacionadas con biotensioactivos y bioemulsificantes, de las cuales el 33 % está relacionada con la industria petrolera [12].

La remoción de hidrocarburos por métodos físicos por lo general es costosa e inefectiva. Los procesos de descomposición biológica de estos compuestos son muy lentos; debido a la baja biodisponibilidad de los hidrocarburos para los microorganismos que son capaces de emplearlos como fuente de carbono y energía. Los biotensioactivos pueden incrementar la capacidad de las bacterias de biodegradar hidrocarburos mediante dos mecanismos: (i) el incremento de la biodisponibilidad del sustrato y (ii) modificación celular, incluyendo cambios en la hidrofobicidad superficial y la permeabilidad de la membrana [29].

En las últimas décadas se ha incrementado la investigación enfocada hacia el uso de los ramnolípidos para remover metales pesados contaminantes de suelos [30]. La remoción de metales pesados del suelo empleando biotensioactivos ocurre en tres fases: (1) ad/absorción del biotensioactivo a la superficie del suelo y acomplejamiento con el metal, (2) desorción del metal del suelo hacia la solución y (3) asociación del metal con las micelas. Los metales pesados son atrapados dentro de las micelas mediante interacciones electrostáticas y se pueden remover fácilmente de ellas a través de procesos de precipitación o separación por membrana [16].

Actualmente, el mayor mercado emergente de biotensioactivos en la industria petrolera corresponde a la exploración de petróleo crudo pesado; el empleo de estos tiene ventajas sobre los tensioactivos químicos en procesos de extracción, transportación, almacenamiento y refinación [5, 14, 31, 32].

La recuperación mejorada de crudo con microorganismos (MEOR, por sus siglas en inglés), es un tratamiento terciario de recuperación de crudo que se aplica cuando la inundación por agua deja de ser económica y se han agotado todos los métodos

secundarios [33]. Los biotensioactivos son los compuestos producidos por microorganismos con mayor potencialidad para aplicaciones en MEOR [26]. Estos son efectivos para incrementar la recuperación de crudo de reservorios agotados por diferentes mecanismos: reducción de la tensión superficial e interfacial, alteración de la humectabilidad y emulsión del crudo [34]. A escala de laboratorio ha sido demostrada la factibilidad del empleo de biotensioactivos *ex situ* en MEOR con resultados favorables de estabilidad, reducción de tensiones superficial e interfacial, capacidad de emulsificación y por cientos de recuperación comparables a métodos físicos y químicos [26]. Sin embargo, su aplicación a escala de campo no se ha considerado apropiada debido a los altos costos de producción, el escalado en biorreactores, los bajos rendimientos [26] y a la poca disponibilidad de compañías que lo producen a escala industrial [3, 35].

Los costos de extracción y purificación de los biotensioactivos pueden llegar a constituir el 60 % del costo de cualquier producto biotecnológico [5, 26]; la fuente de carbono en ocasiones representa el 50 % [3, 36]. A pesar de que en las dos últimas décadas se han realizado numerosas investigaciones con el objetivo de disminuir los costos de producción de biotensioactivos, su contraparte química sigue siendo más rentable[5]. Para que sea económicamente factible la aplicación de los biotensioactivos en la biorremediación de hidrocarburos, remoción de metales y MEOR; se pueden emplear materias primas residuales o baratas y utilizar el biotensioactivo en su forma cruda sin ningún proceso de purificación [3, 26, 36].

Teniendo en cuenta los antecedentes planteados se define como **problema** de la investigación que *la contaminación ambiental por hidrocarburos y metales pesados,*

generada por la industria petrolera y la extracción de crudo de los yacimientos en declive, requieren del desarrollo de estrategias que contemplen el empleo de productos eco-amigables para alcanzar un desarrollo económico y social sostenible.

Se plantea como punto de partida de la investigación la siguiente **hipótesis**: *los ramnolípidos producidos por una cepa bacteriana se pueden emplear en el diseño de una estrategia para disminuir la contaminación generada por la industria petrolera, y en la recuperación de crudo de yacimientos en declive.* Para aceptar o refutar la hipótesis se propone como **objetivo general**:

Evaluar la producción de ramnolípidos sintetizados por una cepa bacteriana y la aplicabilidad de estos en la industria petrolera.

Objetivos Específicos

1. Seleccionar una cepa bacteriana, aislada de un ecosistema contaminado con hidrocarburos, productora de ramnolípidos.
2. Caracterizar utilizando métodos físicos, químicos y ecotoxicológicos, los ramnolípidos producidos por la cepa seleccionada.
3. Diseñar una estrategia de cultivo para incrementar la productividad volumétrica de los ramnolípidos producidos por la cepa seleccionada.
4. Evaluar la estabilidad del crudo de ramnolípidos obtenidos para su aplicación en la industria petrolera.
5. Determinar el efecto de la aplicación del crudo de ramnolípidos en la remoción de vanadio de sedimentos, la biodegradación de hidrocarburos en ecosistemas contaminados y el recobro de petróleo en columnas.

Novedad científica

Se establece una nueva estrategia de cultivo para incrementar la productividad volumétrica de ramnolípidos por la cepa *Pseudomonas aeruginosa* Y3-B1A, la que combina la concentración de biomasa inicial óptima con la adición de inductor en cuatro ciclos de cultivo discontinuo.

Se informa por primera vez el empleo de ramnolípidos en la remoción de vanadio de sedimentos, lo que podría favorecer la reutilización de catalizadores hidrodesmetalizadores en el proceso de refinación de petróleo y la recuperación del metal.

Se aplica por vez primera en el proceso de biorremediación de petróleo en campo un crudo de ramnolípidos, inactivándose la viabilidad celular con calor húmedo sin afectación de la estabilidad de las emulsiones.

Aporte teórico

El protocolo empleado en la selección de la cepa productora de ramnolípidos fue efectivo y se desarrolló de forma escalonada, este podrá emplearse en la búsqueda de nuevas cepas. Se partió de cepas aisladas de ecosistemas contaminados con hidrocarburos, su posterior cultivo en medios enriquecidos y la detección de la actividad superficial por métodos sencillos y rápidos; la identificación de la cepa; y finalmente la caracterización y purificación de los biotensioactivos.

Los métodos y procedimientos descritos en este trabajo podrán utilizarse en otras investigaciones relacionadas con posibles aplicaciones de los biotensioactivos en la industria petrolera.

La estrategia para incrementar la productividad volumétrica incorporó conocimientos sobre la fisiología y el metabolismo del glicerol del género *Pseudomonas*, la metodología empleada podrá aplicarse en estudios similares.

Importancia práctica

Las estrategias de incremento de la productividad volumétrica del ramnolípido podrán emplearse en la producción a mayor escala con el fin de reducir los costos.

El crudo de ramnolípidos obtenido estará a disposición de la industria petrolera, la cual podrá emplearlo en el saneamiento y recuperación de ecosistemas impactados por derrames accidentales de hidrocarburos de petróleo; en sistemas de tratamiento de residuales oleosos; en áreas de tratamiento de residuos sólidos petrolizados y para incrementar los niveles de producción de crudo en yacimientos con baja productividad. Los ramnolípidos también podrán emplearse en sistemas de descontaminación de catalizadores agotados previa disposición final y en la recuperación de vanadio a partir de estos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biotensioactivos

Los biotensioactivos son los tensioactivos naturales más estudiados y tienen propiedades semejantes a los químicos [32]. Son compuestos anfipáticos sintetizados por los microorganismos durante su crecimiento en sustratos específicos, durante la fase estacionaria o en respuesta a las condiciones ambientales. Estos pueden ser productos intracelulares o extracelulares [24, 27, 37].

Existe una amplia variedad de microorganismos descritos en la literatura como productores de biotensioactivos: levaduras, bacterias y algunos hongos filamentosos, lo que contribuye a la diversidad en la composición química [38]. Cada microorganismo generalmente produce un tipo de biotensioactivo particular. Las cepas productoras más citadas en la literatura pertenecen a los géneros de bacterias *Pseudomonas* y *Bacillus* [16, 39].

Generalmente los biotensioactivos comparten propiedades que los hacen más atractivos para su empleo que los tensioactivos convencionales. La **Tabla 1** muestra las ventajas y desventajas de su producción y empleo.

La mayoría de los biotensioactivos estudiados son glicolípidos, estos son carbohidratos en combinación con cadenas largas de ácidos alifáticos o ácidos hidroxialifáticos. Consisten en mono-, di-, tri- y tetra-sacáridos, que incluyen glucosa, manosa, galactosa, ramnosa, ácido glucónico y sulfato de galactosa. Por lo general la composición del ácido graso es un fosfolípido similar a los de las estructuras del microorganismo productor. Los glicolípidos más comunes son los ramnolípidos y soforolípidos [28, 37, 39, 40].

Tabla 1. Ventajas y desventajas de la producción y empleo de los biotensioactivos.

Ventajas	Desventajas
Biodegradables: son fáciles de biodegradar por bacterias y hongos. Su empleo en la biorremediación o dispersión de crudo no implica la adición de un contaminante más	La actividad hemolítica de algunos puede romper los eritrocitos a 37°C
Baja toxicidad: existen muy pocas publicaciones acerca de ensayos de toxicidad a biotensioactivos, aun así se consideran no tóxicos o con muy baja toxicidad	Generalmente las cepas muestran baja productividad. Las cepas súper productoras y recombinantes son escasas.
Biocompatibilidad y digestibilidad: su presencia en la naturaleza no altera la actividad de los organismos vivos, lo que posibilita su uso en productos cosméticos, farmacéuticos, como aditivo en alimentos y en procesos de biorremediación	La obtención de un biotensioactivo puro requiere de varias etapas y es costoso La producción a gran escala requiere de una inversión elevada
Económicamente aceptables para su aplicación en la industria del petróleo: se pueden producir a partir de un gran número de materias primas, incluyendo residuos industriales.	
Diversidad estructural y especificidad: su estructura depende del tipo de microorganismo y de las condiciones de cultivo, entre otras; por lo que son específicos en su acción	
Estabilidad y efectividad: muchos de ellos mantienen estas propiedades en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad	

Elaborada con información de [24, 28, 39–42]

2.2. Ramnolípidos: biosíntesis y características

Los ramnolípidos son los glicolípidos más populares y mejor estudiados [14, 22, 43], en su estructura una (monoramnolípidos) o dos (diramnolípidos) moléculas de ramnosa están unidas a una o dos moléculas de ácido β -hidroxidecanoico [32, 44, 45]. Estos compuestos son sintetizados principalmente por *Pseudomonas spp.* [27, 32]. Es un grupo diverso en el cual se han descrito más de 60 congéneres [46]

La vía de biosíntesis de ramnolípidos, descrita por primera vez por Jarvis y Johnson en 1949[47], está entrecruzada con la formación de varios polisacáridos. La síntesis de novo de la mitad hidrofóbica ocurre mediante las clásicas sintetetasas de ácidos grasos de tipo II. La síntesis de las mitades de los ácidos grasos de lactonas N-acilo, homoserina lactona y 4-hidroxil-2-alquiquinolona (HAQ) están estrechamente vinculadas entre sí.

La biosíntesis de ramnolípidos se produce en tres etapas principales (**Figura 1**). En el primer paso, la enzima ramnosiltransferasa RhIA cataliza la síntesis de los ácidos 3-(3 hidroxialcanoiloxi) alcanoicos (HAA) mediante la esterificación de dos moléculas de 3-hidroxiacilo unidad a la proteína portado de acilo (ACP), provenientes de la síntesis *de novo* de ácidos grasos. La ramnosiltransferasa RhIB une una molécula de HAA con una dTDP-L-ramnosa proveniente de la glucosa-6-fosfato para dar lugar a un monoramnolípidos. La ramnosiltransferasa RhIC cataliza la condensación de una dTDP-L-ramnosa y un monoramnolípidos para formar diramnolípidos [48, 49].

Adicionalmente la síntesis de ramnolípidos está controlada por señales ambientales y el sistema *quorum sensing* (QS). Este sistema a su vez está controlado por autoinductores como las lactonas acil homoserinas y moléculas señal quinolona de

Pseudomonas (PQS) [48, 50]. La producción de PQS alcanza su máximo en la fase estacionaria [48].

Generalmente los ramnolípidos son sensibles a los cambios de pH debido a la presencia de ácidos libres en su estructura; la actividad superficial y la solubilidad son las propiedades más afectadas. De forma semejante a los tensioactivos sintéticos, los ramnolípidos pueden reducir la tensión superficial e interfacial, y actuar como agentes emulsionantes y dispersantes. Las soluciones acuosas de ramnolípidos tienen, por lo general, una tensión superficial de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, aunque se han informado valores de hasta $23 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ [45, 51–56]. Estos biotensioactivos tienen valores muy bajos de concentración micelar crítica (CMC), la que también depende de la estructura molecular y del pH [45]. Los valores informados en la literatura varían de 5 hasta $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [24, 51].

2.3. Selección de microorganismos productores de ramnolípidos

Desde los años 70 del pasado siglo se han desarrollado ensayos para la selección de cepas productoras de biotensioactivos. Los primeros métodos limitaban el trabajo a un número de muestras reducido. En la actualidad la automatización y miniaturización de algunos métodos ha posibilitado el desarrollo de análisis de alto rendimiento, sin embargo estos métodos no han introducido nuevos principios [57].

La clave para aislar nuevos microorganismos productores se basa en una estrategia eficiente de selección, que debe estar conformada por tres pasos: muestreo, aislamiento y caracterización. Teniendo en cuenta la ubicuidad de los microorganismos productores de tensioactivos y las funciones fisiológicas de estos compuestos descritas por Ron y Rosenberg [58], se podría muestrear en prácticamente cualquier

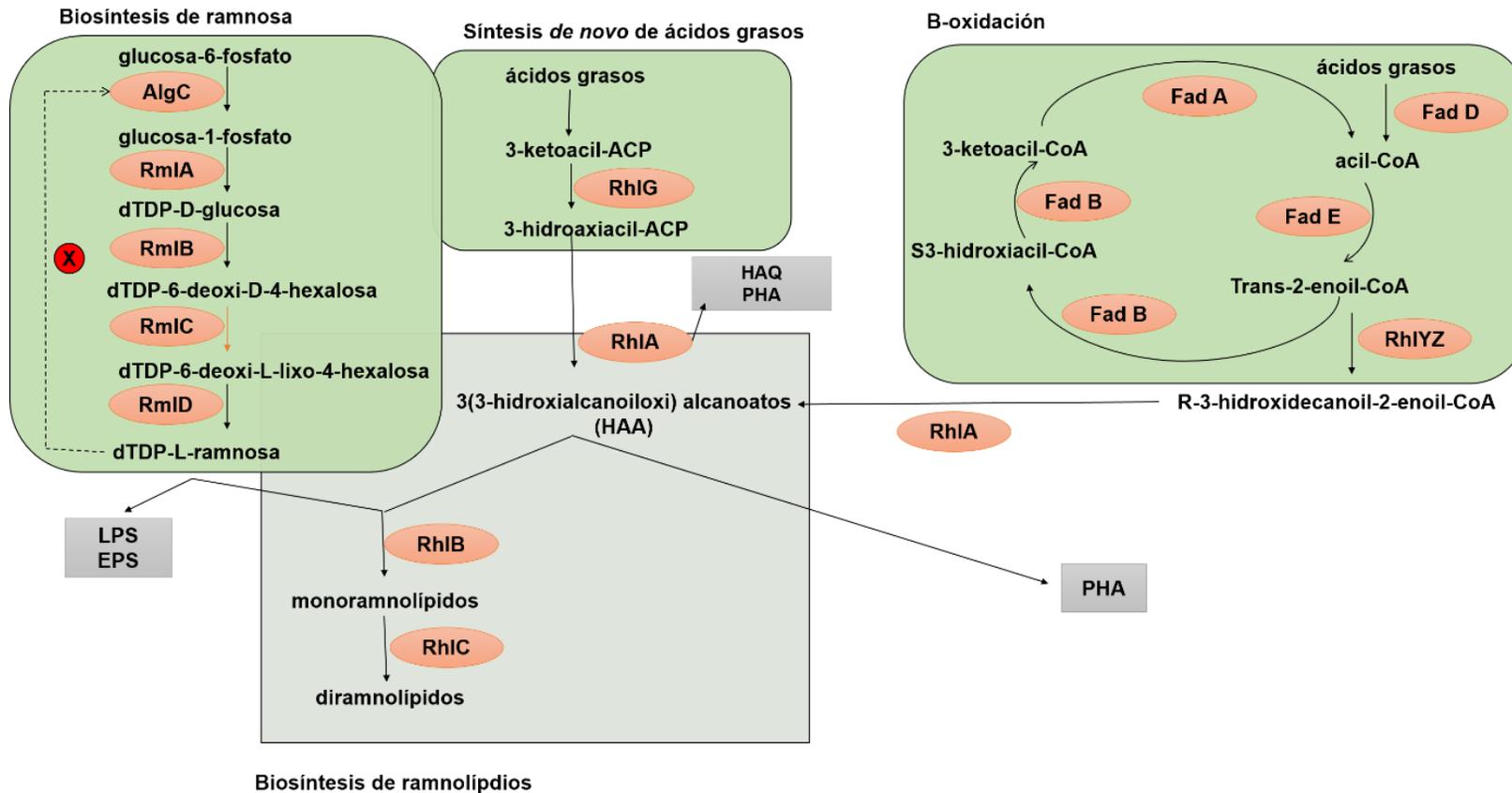


Figura 1. Vía de síntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa*.

El diagrama representa la secuencia de reacciones involucradas en el ensamblaje de los mono- y di-ramnolípidos, así como la ruta de biosíntesis de los precursores: L-ramnosa y ácidos grasos. La línea roja discontinua indica la inhibición alostérica de RmlA por dTPD-L-ramnosa, uno de los pasos limitantes dentro del proceso (Fuente: [48])

tipo de ecosistema, sin embargo, es más eficiente el proceso cuando se parte de ecosistemas contaminados con compuestos orgánicos hidrofóbicos o de ecosistemas acuáticos [43, 59–63].

En el aislamiento es recomendable emplear medios cuya fuente de carbono sea un compuesto hidrofóbico. Este método ha sido ampliamente probado, pero no garantiza que todos los microorganismos que se desarrollen sean productores, obteniéndose bajos porcentajes de positivos. Este resultado conduce al tercer paso de la estrategia: la caracterización. Teniendo en cuenta que los biotensioactivos constituyen un grupo de biomoléculas estructuralmente muy variado, los métodos utilizados se basan en los efectos físicos de los tensioactivos [57]. Estos métodos brindan fundamentalmente resultados cualitativos, los cuales resultan suficientes para una primera etapa de selección [40]. Se recomienda emplear una combinación de varios métodos para evitar falsos positivos [19]. La **Tabla 2** muestra un resumen de los métodos más empleados según la literatura consultada.

2.4. Producción de ramnolípidos a gran escala

En las últimas dos décadas se ha incrementado el número de publicaciones y de patentes relacionadas con la obtención y usos de los ramnolípidos [64], sin embargo existen pocos informes sobre su producción y comercialización a gran escala [65, 66]. En 2013 la producción de biotensioactivos fue de 344 mil toneladas y en 2016 las ventas superaron la cifra de 1,8 mil millones de dólares. Los estimados de 2018 fueron de 2,21 mil millones y 442 mil toneladas. La tasa anual de crecimiento en el periodo 2014-2020 fue de 4,3 % [3, 12, 27, 36]. En el 2013 el principal mercado fue el europeo, con un consumo de 178,9 mil toneladas (50 % del consumo global). Norteamérica fue

Tabla 2. Métodos de ensayos para la selección de microorganismos productores de biotensioactivos.

Técnica Analítica	Análisis		Tiempo
	Cualitativo	Cuantitativo	
Medida directa de la tensión superficial e interfacial	++	+	Minutos
Ensayo de ruptura de la gota	++	-	Minutos
Ensayo en Micro placa	++	-	Minutos
Ensayo de Penetración	++	-	Minutos
Ensayo de dispersión de petróleo	++	-	Minutos
Índice de emulsificación	+	-	Días
Solubilización de cristales de antraceno	+	-	Días
Adhesión bacteriana a hidrocarburos	+	-	Minutos
Cromatografía de interacción hidrofóbica	+	-	Horas
Réplica en placa con polietileno	+	-	Días
Ensayos con agregados de sal	+	-	Minutos
Ensayo en placas de Agar CTAB	+	-	Días
Hemólisis	+	-	Días

Análisis Cualitativo: ++, muy eficiente; +, eficiente

Análisis Cuantitativo (medida de la actividad superficial): +, sí; -, no

Elaborada a partir de varios autores [40, 67]

el segundo mayor consumidor ese año (más del 25 %) y el bloque Asia-Pacífico, aunque con un consumo bajo mostró tendencias al incremento en los años siguientes [12]. Se espera que para el 2023 la venta de biotensioactivos alcance los 2,6 mil millones, y que la venta de los ramnolípidos y soforolípidos crezca en un 8 %, para una producción en 2024 de 540 mil toneladas [68]. Otro estudio de mercado predice que la venta global de biotensioactivos en el 2022 excederá la cifra de 5,52 mil millones, con una tasa compuesta de crecimiento anual de 5,6 % de 2017 a 2022 [3].

Sin embargo, uno de los principales obstáculos para ampliar el uso de los biotensioactivos en la industria es su alto costo de producción. Mientras el precio promedio de los tensioactivos sintéticos es de uno a cuatro dólares por kilogramo, el precio promedio de los soforolípidos (los más rentables hasta la fecha) es 34 por kg. El precio de los ramnolípidos en el mercado, dependiendo del grado de pureza y de la manufactura, varía de \$1,50 a \$ 1500 el gramo [5].

El alto precio de los biotensioactivos se debe a varios factores: bajos rendimientos, tiempos largos de producción, alto costo de los procesos de recuperación y purificación y el costo energético requerido para la esterilización, el mantenimiento de las cepas [3, 27, 36].

En busca de una solución a esta problemática se han propuesto varias estrategias, incluyendo el uso de materias primas más económicas (ej., residuales industriales), el desarrollo de procesos con mayor costo/beneficio (optimización de la producción y del procesamiento/purificación) y el diseño de cepas súper productoras [20, 27, 36, 64].

2.4.1. Estrategias para incrementar el rendimiento de ramnolípidos

Existen dos campos de estudio para obtener ramnolípidos a bajo costo: mediante selección o modificación genética de cepas superproductoras y las estrategias de fermentación [44, 69, 70]. En cuanto a las estrategias de fermentación (**Figura 2**), se han establecido algunos diseños en las últimas décadas para lograr que los biotensioactivos sean productos económicamente comercializables [36]. La metodología de superficie de respuesta y los métodos estadísticos se han aplicado en la optimización de la composición de los medios de cultivo para la producción de los biotensioactivos; así como la coproducción con otros metabolitos económicamente importantes [3].

Las estrategias de cultivo descritas hasta el momento para producir ramnolípidos incluyen estudios en erlenmeyers agitados, cultivos discontinuo y discontinuo alimentados, continuos.

El cultivo bajo condiciones limitantes de nitrógeno y fósforo ha sido la variante que ha predominado [36]. En todos los casos se requiere de la realización de estudios cinéticos una vez que se obtenga una cepa promisoría [69].

En la literatura se pueden encontrar referencias de investigaciones empleando sustratos poco solubles como los residuos de la refinación del aceite de oliva, de soya, de girasol y residual de fritura. Otros autores han optado por fuentes de carbono con mayor solubilidad, como el suero láctico, el licor de remojo de maíz, residuos de la caña de azúcar, melaza de soya y glicerol [6, 16, 71–73]. Se considera que con sustratos hidrofílicos la productividad es más baja [65]. El empleo de glicerol para elevar la productividad se ha vuelto atractivo teniendo en cuenta el incremento de la

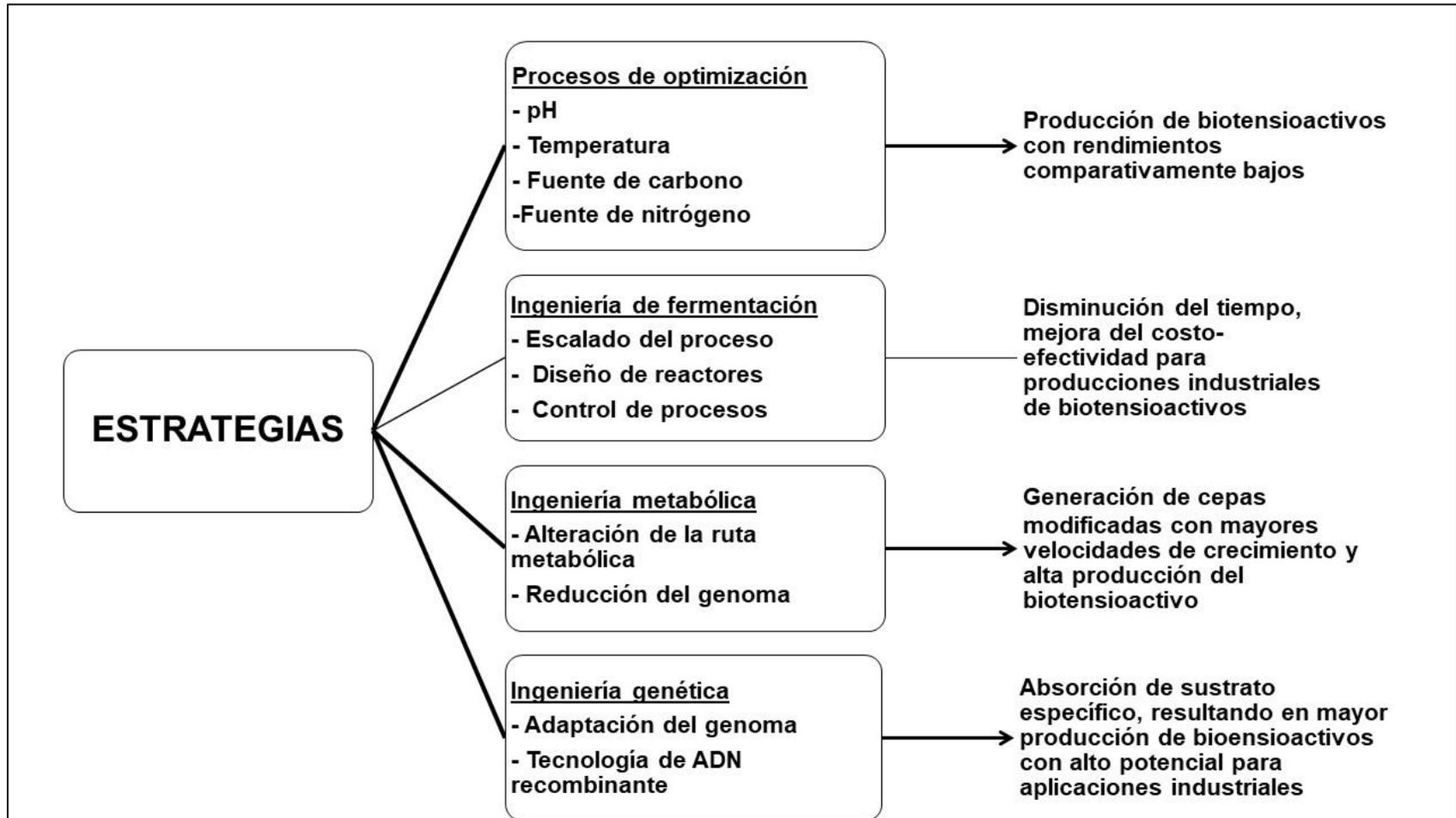


Figura 2. Estrategias desarrolladas para incrementar la producción de biotensioactivos.

Modificada de Gaur y colaboradores [74] con información de Dhanya [17]

producción de biodiesel. La producción de una tonelada de biodiesel genera aproximadamente 100 kg de glicerol con un precio que varía de \$ 0,04 a 0,33 por kilogramo, la industria europea del biodiesel genera aproximadamente 600 mil toneladas por año, con una tendencia a incrementarse [35].

Varios autores han informado que la mayoría de las estrategias de producción actuales emplean métodos tradicionales basados en experimentos simples, donde se evalúa un solo factor a la vez para mejorar la producción [38, 66]. Estas estrategias convencionales generan un gran volumen de trabajo experimental, consumen mucho tiempo y pueden conducir a resultados poco fiables y a falsas conclusiones. En la última década ha crecido la tendencia a emplear el diseño de experimento para optimizar la producción [66]. Los diseños estadísticos más empleados son la metodología de superficie de respuesta (diseño de compuesto central y Box-Behnken) y diseños factoriales (diseño factorial de dos niveles, Plackett-Burman y Taguchi). En la optimización los investigadores generalmente evalúan diferentes factores nutricionales y físico-químicos que afectan la producción. Los factores nutricionales más estudiados son las fuentes de carbono y nitrógeno, sus concentraciones y tasa de relación; mientras los físico-químicos incluyen la temperatura, agitación, concentración de oxígeno y pH [36, 70, 75, 76].

No se deben generalizar los resultados informados de cepas, factores ambientales y diseños que muestra la literatura; ya que el origen de las cepas, las diferentes marcas comerciales de medios de cultivo y reactivos, y las condiciones físico-químicas, introducen variaciones que hacen que cada estudio sea único.

En paralelo, investigaciones más recientes se enfocan en estrategias de cultivo discontinuo, discontinuo-alimentado, continuo y combinaciones de estos, para mejorar el rendimiento. Noh y colaboradores demostraron en 2014 que el cultivo discontinuo alimentado era el más eficiente, al mantener estable la velocidad específica de crecimiento con la que se obtenía la mayor productividad [77]. Otros estudios posteriores en los cuales se emplearon estrategias similares mejoraron el rendimiento, aun cuando en las fases finales la concentración de biotensioactivo disminuyó, posiblemente por la acumulación de metabolitos tóxicos y/o el agotamiento de nutrientes. He y colaboradores propusieron y desarrollaron en erlenmeyers una estrategia que combina ciclos de cultivo discontinuo-alimentado [44].

2.4.2. Factores que influyen en la producción de ramnolípidos

La actividad superficial y emulsionante de los biotensioactivos no solo depende de los microorganismos productores sino también de las condiciones de cultivo. La naturaleza, concentración y relación de las fuentes de carbono y nitrógeno; la presencia de minerales, reguladores metabólicos (inhibidores e inductores), la salinidad, el pH, la agitación y aereación, influyen en la cantidad y tipo de moléculas producidas [24, 28, 50].

- Fuente de carbono: la naturaleza del sustrato influye en la calidad y rendimiento de la producción [24, 28]. Se ha empleado una gran diversidad de fuentes de carbono en la producción: diésel, glucosa, glicerol, acetato de sodio, sacarosa [78], así como disímiles residuos industriales [39].
- Fuente de nitrógeno: este es el segundo elemento de mayor importancia en la producción de biotensioactivos [16], y en el control del pH [79]. Bajas concentraciones

de nitrógeno aumentan la producción de biotensioactivos [16, 80], mientras que las altas concentraciones inducen la síntesis de materia celular e impide la terminación del producto. La fuente de nitrógeno puede ser orgánica o inorgánica [16]. El nitrato de sodio es más eficiente que el sulfato de amonio y que la urea en la producción de ramnolípidos [80].

- pH: La síntesis de biotensioactivos decrece sino se controla el pH durante todo el proceso de fermentación [81], valores cercanos al neutro son más efectivos. Diversos estudios muestran un rango eficiente de 5,5 a 7,8 [16]. El pH neutro además de aumentar la eficiencia en la producción de biotensioactivo, incrementa la emulsificación [79]. Especies de *Pseudomonas* disminuyen su capacidad a pH básico [80].
- Temperatura: la mayoría de los biotensioactivos informados han sido producidos en un rango de (25 a 40) °C [81]: *Pseudomonas aeruginosa*, 37 °C; *Pseudomonas* sp., 35 °C; *Pseudomonas putida*, (30 a 40) °C [80].
- Agitación y aereación: ambas son de gran importancia por su influencia en la transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la fase acuosa [28, 82], por lo que los cultivos agitados tienen mejores rendimientos que los estáticos. Generalmente el aumento de la velocidad de agitación disminuye los niveles de producción de biotensioactivos en cultivos bacterianos, mientras que en levaduras sí tienen un efecto positivo [81].

2.5. Aplicaciones de los ramnolípidos en la industria petrolera

Los biotensioactivos son potencialmente útiles en la industria petrolera. Todas las operaciones, incluyendo la exploración-producción, refinación, transportación,

almacenamiento, tratamiento de aguas residuales y respuesta ante derrames accidentales; pueden ser mejoradas u optimizadas aplicando algún tipo de biotensioactivo [12].

2.5.1. Biorremediación de ecosistemas contaminados con hidrocarburos

La biorremediación es una de las tecnologías de saneamiento de ecosistemas contaminados, basada en la capacidad natural de los organismos (fundamentalmente microorganismos y plantas), de transformar parcialmente los contaminantes en compuestos menos tóxicos, o completamente en dióxido de carbono y agua. Los procesos se clasifican en bioestimulación y bioaumentación [83].

Si bien la biorremediación es una tecnología efectiva y ecoamigable cuando el volumen de área contaminada es muy grande, el tiempo y los costos la hacen inviable. Por lo que el empleo de los biotensioactivos (comerciales o extracto de fermentación) emerge como una opción segura que permite incrementar la eficiencia de la biorremediación debido a su capacidad de mejorar la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos, facilitar la asimilación por las células microbianas y acelerar el proceso de degradación [16, 84]. La bioestimulación es una de las estrategias de biorremediación más utilizadas, cuando se aplican biotensioactivos, la eficiencia de biodegradación oscila entre el 50 y el 97 % [85].

La estimulación de la interacción microorganismo-hidrocarburo y la asimilación final del sustrato incluyen dos procesos principales: i) la pseudo solubilización y la emulsificación de productos químicos complejos en monómeros simples para la absorción celular; y ii) provoca cambios en la membrana que incrementan la hidrofobicidad y facilitan la asociación de sustratos hidrofóbicos con las células

bacterianas, seguido de la oxidación terminal / subterminal a través de las oxigenasas unidas a la membrana [24, 39, 42].

El efecto de los biotensioactivos en la biodegradación difiere en el modo de acción y depende de las propiedades de estos. Las aplicaciones se basan en los efectos de los biotensioactivos sobre la actividad metabólica de los microorganismos o en las propiedades fisicoquímicas inherentes de los biotensioactivos. El conocimiento de la naturaleza química y física del área contaminada es necesario para aplicar los biotensioactivos con éxito en la biorremediación del petróleo. Para garantizar la comercialización de los biotensioactivos, estos también deben ser adecuados en términos de la naturaleza física y química de los sitios contaminados [42].

Se ha demostrado que los ramnolípidos ejercen un excelente efecto potenciando la biodegradación de hidrocarburos por microorganismos. Los ramnolípidos mejoran la degradación al solubilizar o emulsionar los hidrocarburos, al aumentar la asimilación interfacial de hidrocarburos por las bacterias degradadoras, o mejorando la actividad enzimática del suelo. Además, los ramnolípidos tienen la capacidad de debilitar la adsorción bacteriana y mejorar el transporte hacia o a lo largo de los sitios de remediación, que es de vital importancia para el éxito del método de bioaumentación [30]. La **Figura 3** muestra las interacciones entre los ramnolípidos, hidrocarburos, células microbianas y suelo durante el proceso de biorremediación.

La biorremediación exitosa, en particular la bioaumentación, depende de la efectividad del movimiento de los microorganismos a distancias considerables y de la distribución adecuada de estos en toda el área contaminada. Sin embargo, el suelo tiene una gran capacidad de adsorción y potencial de filtrado para las células bacterianas, lo que

puede reducir significativamente la concentración de células bacterianas suspendidas a medida que se transportan [86]. Los ramnolípidos han sido utilizado ampliamente para modificar las propiedades superficiales de las células bacterianas y de las partículas del suelo para debilitar la unión bacteriana y mejorar el transporte de los microorganismos en el suelo [61, 87, 88]. Además, los ramnolípidos compiten por los sitios de adsorción, con lo que mejoran la movilidad bacteriana, al bloquear la deposición celular [30].

En diferentes estudios se ha informado que la adición de ramnolípidos acelera el proceso de biodegradación de hexadecano, octadecano, n-parafinas y otras mezclas de hidrocarburos, y promueve la biorremediación de lodos y/o suelos petrolizados [89–92]. Diversos biotensioactivos se han usado en ensayos de remoción de productos derivados del petróleo de suelo y agua contaminados (**Tabla 3**).

2.5.1.1. Toxicidad y biodegradabilidad de los ramnolípidos en el proceso de biorremediación

Los compuestos con actividad superficial pueden representar una contaminación por sí mismos cuando se introducen en el medio ambiente. Uno de los mecanismos más importantes a través del cual los tensioactivos provocan toxicidad, es la alteración de la membrana celular de los microorganismos presentes en ese ecosistema por la interacción con los componentes lipídicos y la reacción de los tensioactivos con las proteínas. Es por esto que cuando se diseñe aplicar tensioactivos al medio ambiente deben realizarse ensayos de toxicidad de los mismos [93].

El uso de biotensioactivos en procesos de biorremediación es más aceptado que el de tensioactivos químicos, debido a su menor toxicidad y mayor biodegradabilidad (**Tabla 1**). La toxicidad de algunos biotensioactivos durante el proceso de

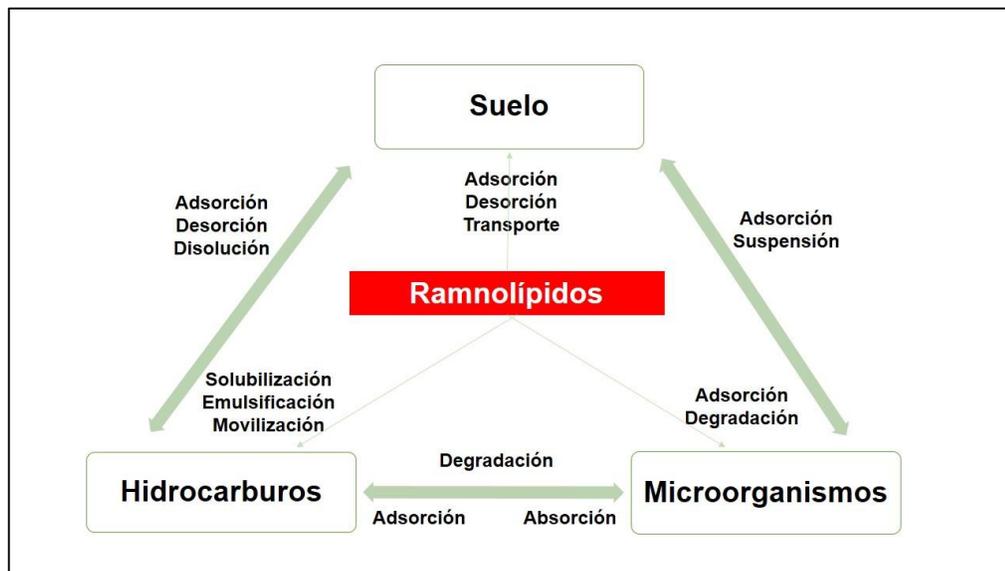


Figura 3. Interacciones entre los ramnolípidos, hidrocarburos, células microbianas y suelos durante la biorremediación.

Modificado a partir de Liu y colaboradores [30]

Tabla 3. Remoción de hidrocarburos del petróleo empleando ramnolípidos.

Matriz	Compuesto	Microorganismo productor	Referencia
Líquida	Benzo (a) pireno	<i>P. aeruginosa</i> BT-1	[94]
	Petróleo crudo	<i>Agrobacterium fabrum</i> SLAJ731	[95]
	Petróleo crudo Casablanca	<i>P. aeruginosa</i> AT10	[89]
	Diésel	<i>B. amyloliquefaciens</i> An6	[96]
	Aceite usado de motor	<i>Pseudomonas</i> sp. S1WB	[97]
		<i>B. subtilis</i> CN2	[98]
	Naftaleno, fenantreno y pireno	<i>Bacillus</i> Lz-2	[99]
	Lodo petrolizado	Consortio de 4 bacterias	[100]
		<i>Ochrobactrum intermedium</i> CN3	[101]
	Sólida	Hidrocarburos poliaromáticos	<i>B. cereus</i> SPL-4
Aceite usado de motor		<i>P. aeruginosa</i> NAPH6	[103]
Diésel		<i>B. subtilis</i> SPB1	[92]
n-alcanos e hidrocarburos aromáticos		<i>P. aeruginosa</i> DN1 y <i>B. subtilis</i> QHQ110	[83]
Sedimentos contaminados		<i>P. aeruginosa</i> ORA9	[104]

biorremediación puede estar asociada a la solubilización y/o emulsificación de hidrocarburos que resulten tóxicos a la biota [105].

El efecto negativo en la biorremediación más descrito es el que se provoca cuando el biotensioactivo provee a los microorganismos de una fuente de carbono de más fácil degradación como alternativa a los contaminantes [30]. Durante el proceso de biodegradación del biotensioactivo se pueden formar intermediarios más persistentes. Esto puede considerarse como un efecto positivo o negativo tomando en consideración la concentración del residual de surfactante no deseado después del tratamiento de biodegradación y el costo asociado con el reemplazo del surfactante degradado [83].

2.5.2. Remoción de vanadio

Los metales pesados son contaminantes persistentes en el suelo. Algunos como cromo, cadmio, mercurio y plomo pueden afectar la salud humana a través de la cadena alimentaria o por exposición directa a suelos y aguas contaminadas.

El vanadio es clasificado como contaminante peligroso [9]. Es biodisponible, su acumulación puede ser dañina para las raíces de las plantas y constituye un riesgo potencial de cáncer humano [106]. Su toxicidad es comparable a la del mercurio, plomo y arsénico [8]. Las investigaciones relacionadas con el vanadio han ganado interés debido a dos razones: primero, es un elemento traza elemental para el crecimiento de plantas, mamíferos insulina mimético y humanos, y segundo, este metal está siendo liberado en grandes cantidades al ambiente por la combustión del petróleo crudo y otras actividades humanas [8, 106, 107].

El desarrollo de la industria petrolera constituye una fuente de aporte de vanadio al medio ambiente. El petróleo crudo contiene elementos metálicos como cadmio, níquel,

zinc, manganeso, vanadio, cobre, cromo, plomo, arsénico y mercurio [108]. Dependiendo del origen del petróleo la concentración de estos puede superar los 100 y 1000 ppm [109]. Generalmente los petróleos crudos del área del Caribe y México contienen altas concentraciones de vanadio [110].

En los procesos de hidrodesulfurización y craqueo catalítico en la refinación de petróleo crudo, se utilizan catalizadores que se degradan debido a la deposición de azufre e hidrocarburos, además, de la adhesión de metales con hierro, níquel, cobre y vanadio, contenidos en los crudos. Estos materiales se adhieren a la superficie del catalizador inhibiendo su función por saturación y por tanto haciendo que pierdan su eficiencia [111]. Estos residuos son desechados sin tratamiento posterior. La combustión del fuel oil genera cenizas volátiles y escoria con altas concentraciones de vanadio [109].

Los metales no son biodegradables, se transforman de una especie química a otra, lo que implica cambios en la movilidad y toxicidad. Los ramnolípidos pueden ser usados, al igual que otras tecnologías de biorremediación, de forma combinada para la remoción de compuestos orgánicos hidrofóbicos y metales pesados [16]. Con mayor frecuencia los ramnolípidos son utilizados en la remoción de metales divalentes como cadmio y plomo (**Tabla 4**) con resultados satisfactorios (% de remoción > 70 %) [112–115]. Algunos estudios también incluyen a otros metales pesados como el cobre, zinc, calcio, cromo, níquel y manganeso [116, 117].

Los metales pesados están adsorbidos principalmente a la superficie del suelo en forma de iones o de precipitados. A diferencia de los compuestos orgánicos, los

metales son removidos por la formación de complejos biotensioactivo-metal e intercambio iónico (**Figura 4**) [16, 118].

Los biotensioactivos aniónicos, como los ramnolípidos, crean complejos no-iónicos con los metales a través de enlaces iónicos, estos enlaces son más fuertes que los que se establecen entre el metal y el suelo, por lo que complejo metal-biotensioactivo es separado del suelo debido a una reducción en la tensión interfacial. Los biotensioactivos catiónicos pueden reemplazar iones metálicos con cargas similares mediante el intercambio iónico (competición por superficie cargada negativamente). Las micelas se pueden usar para remover el metal del suelo [16, 118].

La recuperación de vanadio en procesos de lixiviación de suelos, sedimentos o catalizadores impregnados con este metal, podría ser el primer paso para reincorporarlo a la industria en los disimiles usos que posee. Por sus propiedades anticorrosivas, el vanadio se emplea en aleaciones con acero para fabricar instrumentos de cirugía, piezas mecánicas, partes de navíos, aviones y otros; además como recubrimiento en áreas sometidas a la intemperie o sal marina [119]. También se aplica como revestimiento de cristales y vidrios por su capacidad de disminuir el paso de la radiación infrarroja. En la industria nuclear, es usual que el vanadio sea empleado como componente de reactores. Otro uso habitual es como componente de catalizadores para producir ácido sulfúrico, anhídrido maleico y cerámica [120].

Tabla 4. Remoción de metales con ramnolípidos.

Metal	Ramnolípidos (concentración)	Remoción (%)
Cadmio	80 ppm	53
	5 Mm	92
	40 ppm	95
	Espuma de ramnolípidos	73,2
Plomo	80 ppm	62
	0,1 %	88
	280 mg.L ⁻¹	59
Bario	80 ppm	28
Níquel	80 ppm	56
	Espuma de ramnolípidos	68,1
	280 mg.L ⁻¹	60
Zinc	80 ppm	20
	12 %	19,5
	0,5 %	18
Estroncio	80 ppm	7
Cobre	12 %	25
	0,5 %	65
	280 mg.L ⁻¹	62

Elaborado a partir de varios autores [51, 104, 121, 122]

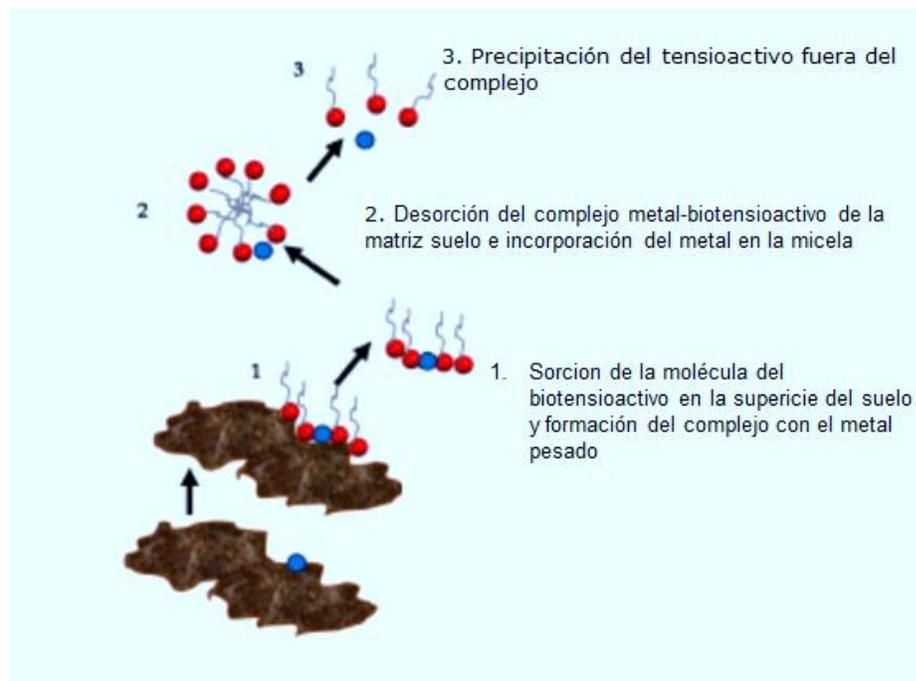


Figura 4. Mecanismos de remoción de metales pesados en el suelo empleando biotensioactivos.

Modificado a partir de Santos y colaboradores [16]

2.5.3. Recuperación mejorada de petróleo con microorganismos

Las tecnologías clásicas de producción de crudo: recuperación primaria y secundaria, solo recuperan de un 30-65 % del crudo disponible en los yacimientos [12, 33, 34, 123]. A medida que se agotan los reservorios de crudo ligero se espera que disminuya esta eficiencia, por lo que se desarrollan tecnologías terciarias de recuperación conocidas como recuperación mejorada/asistida de crudo (EOR/IOR por sus siglas en inglés). Una de las tecnologías de EOR/IOR que ha creado expectativas es la recuperación mejorada de crudo con microorganismos (MEOR) [2, 34].

La aplicación de las técnicas de MEOR se basa en el empleo de microorganismos y/o sus metabolitos (biopolímeros, gases, ácidos, solventes, enzimas y compuestos con actividad superficial) [2, 123], con el objetivo de reducir las tensiones de las interfases entre el petróleo, la superficie sólida del material rocoso y la fase acuosa al interior de los poros. Al disminuir estas fuerzas mejora la fluidez de los hidrocarburos a través de los poros de la roca, promoviendo la recuperación del crudo residual.

Esta tecnología presenta varias ventajas que la hacen atractiva [33]:

- i) Los productos naturales son inocuos y menos agresivos al medio ambiente
- ii) Los procesos microbianos no requieren de gran cantidad de energía térmica.
- iii) El costo de la producción microbiana es económico si se emplea desechos industriales como materias primas.
- iv) Los productos y la actividad microbiana pueden estimularse dentro de los reservorios mediante la adición de nutrientes.
- v) Se puede aplicar tanto en reservorios de crudo ligero como en los de crudo pesado.

La tecnología MEOR tiene dos estrategias de aplicación principales: *in situ* y *ex situ* [26]. En las estrategias MEOR *in situ*, las bacterias (autóctonas o seleccionadas) y los nutrientes se inyectan en el reservorio a través del pozo de inyección, seguido de la fase de cierre de meses. En esta fase, las bacterias producen una serie de metabolitos que contribuyen a la recuperación del crudo.

Desde un punto de vista económico, la estrategia MEOR *in situ* tiene ventajas significativas, aunque es necesario seleccionar y/o diseñar cepas que puedan adaptarse al entorno especial del yacimiento y producir biotensioactivos y otros metabolitos altamente productivos. En términos de las estrategias, el costo de MEOR *in situ* es mucho más bajo que *ex situ*, pero el efecto no es lo suficientemente significativo, principalmente porque el ambiente del yacimiento no es el óptimo para el crecimiento y el metabolismo microbiano [26, 124].

En las estrategias MEOR *ex situ*, los metabolitos microbianos se producen en biorreactores y se inyectan en el reservorio. En estas la producción de sus productos es mayor que la de *in situ*, y la operación de campo es semejante a la de aplicada en la recuperación mejorada con productos químicos (CEOR, por sus siglas en inglés), pero requiere establecer por separado la producción y purificación, lo que resulta en un mayor costo.

La estrategia MEOR *ex situ* es la más prometedora aplicada a escala de campo, su ciclo operativo es corto; se puede utilizar como sustituto de polímeros y tensioactivos químicos en CEOR; tiene mayor tasa de éxito y mejor adaptabilidad a las condiciones del yacimiento. [124]. No obstante, las pruebas de campo y las aplicaciones MEOR actuales todavía están dominadas por estrategias *in situ* [34].

2.5.3.1. Técnicas de MEOR empleando biotensioactivos

Los biotensioactivos aportan varias ventajas al proceso de MEOR, estos mejoran el desplazamiento y movimiento del crudo a través de las rocas mediante tres procesos fundamentales: reducción de la tensión interfacial entre roca/crudo y crudo/agua de capa, modificación de la humectabilidad de los poros de la roca y emulsificación del crudo [33, 34] (**Figura 5**).

La aplicación de biotensioactivos se puede realizar de diferentes maneras: inyectando microorganismos potencialmente productores en los pozos de petróleo con o sin nutrientes adicionales; agregando los nutrientes a los pozos de petróleo para promover el crecimiento y la actividad de los microorganismos productores de tensioactivos autóctonos e incrementando la recuperación de petróleo. [26, 124]. La aplicación de MEOR *ex situ* mediado por biotensioactivo es una de las tecnologías de MEOR más estudiadas a escala de laboratorio (**Tabla 5**) y potentes que se puede aplicar a escala de campo, sin embargo, no hay información real disponible para datos de economía de costos para aplicaciones a escala de campo completo, ya que la única información disponible se encuentra en investigaciones a escala de laboratorio [26].

En estudios previos se demostró que los ramnolípidos también se pueden emplear como agentes de sacrificio aplicados de conjunto con tensioactivos, su preferencia en la absorción a la arena impregnada de crudo deja libre al tensioactivo en su función de desplazamiento de crudo. En presencia de ramnolípidos la adsorción a la arena del tensioactivo sulfonato de alquilbenceno se redujo a 25-30 %, incrementando la recuperación de crudo en 7 % [33].

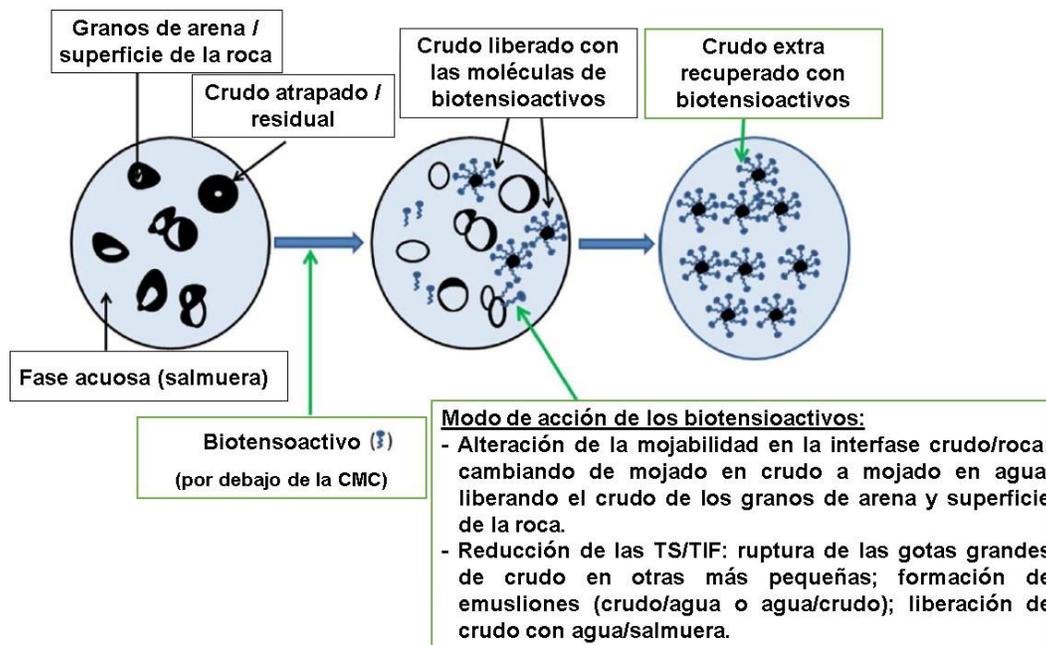


Figura 5. Diferentes mecanismos de actuación de los biotensioactivos en la recuperación de crudo mejorada con microorganismos.

Modificado de Geetha y colaboradores [26]

Tabla 5. Resultados de recuperación residual de crudo a escala de laboratorio empleando biotensioactivos.

Bacteria / biotensioactivo	AOR (%)
<i>Alcaligenes sp.</i>	9,2
<i>Bacillus licheniformis</i> *	22,7
<i>Enterobacter cloacae</i>	10,8
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	11,54
<i>Bacillus strain</i>	30-34
<i>Bacillus subtilis</i>	7,2- 9,6
<i>Bacillus subtilis</i> / surfactin	17-31
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / ramnolípidos	8,82
<i>Bacillus licheniformis</i>	13,7
<i>Bacillus licheniformis</i> (con iones Ca)	14-41
<i>Candida tropicalis</i>	39,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
<i>Bacillus licheniformis</i>	5,4
<i>Pseudomonas sp.</i>	20
<i>Acintobacter calcoaceticus</i>	40-67
<i>Enterobacter cloacae</i>	39-59
<i>Bacillus subtilis</i> /surfactin	1,7-5
<i>Bacillus subtilis</i> / surfactin	19,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / ramnolípidos	15,5

Modificado de Sakthipriya y colaboradores [2]

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Selección primaria de cepas productoras de biotensioactivos

El proceso de selección primaria se realizó a partir de 23 cepas de la colección del Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación del Petróleo (CEINPET) (**Tabla 6**). Las cepas fueron aisladas previamente de ecosistemas contaminados con hidrocarburos [125, 126] y encontraban conservadas en viales con medio semisólido (Caldo Corazón) a 4 °C. Se tomó una fracción de cada uno de los viales, se inoculó en 30 mL de Caldo Triptona Soya (CTS) y se incubó con agitación recíprocante a 30 °C durante 24 h. Posteriormente se le realizó una tinción de Gram para comprobar la pureza del cultivo.

Se tomaron alícuotas de 5 mL de los cultivos de las cepas en CTS a las 24 h, se lavaron dos veces con solución Ringer (en 100 mL de agua destilada: 0,85 g de NaCl, 0,04 g de KCl y 0,34 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) y se resuspendieron en esta solución hasta alcanzar un valor de absorbancia de 0,02 (Espectrofotómetro UV-Visible Genesys 10S, $\lambda = 540$). Se inocularon 5 mL de la solución preparada para cada cepa individualmente en erlenmeyers de 250 mL conteniendo 100 mL de medio de cultivo mínimo mineral (MMM) suplementado con glicerol (4 % m/v). La composición del MMM fue ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): NaNO_3 : 4,5; K_2HPO_4 : 1,33; KH_2PO_4 : 0,6675; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5; KCl: 0,1; CaCl_2 : 0,0073; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,0073; extracto de levadura: 0,1 y 0,05 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de solución de elementos traza (B: 0,026 %; Cu: 0,05 %; Mn: 0,05 %; Mo: 0,006 %, Z: 0,07 %). El pH del medio se ajustó a siete. Se incubaron con agitación orbital a 130 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ y 30 °C por 72 h, cada cultivo se ejecutó por triplicado, como control se empleó el medio sin inocular. Posteriormente los cultivos se centrifugaron a 5000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 15 min

Tabla 6. Origen de las cepas de la colección del CEINPET empleadas en el proceso de selección.

No	Código	Morfología celular / Tinción de Gram	Origen de la cepa
1	D1	Bacilos Gram positivo	Fondaje de tanque de diésel de Refinería Níco López
2	D6	Bacilos Gram negativos	
3	MMM I 1	Cocobacilos Gram positivos	Laguna de aguas oleosas de DTCC Matanzas
4	MMM I 2	Bacilos Gram positivo	
5	MMM NI	Bacilos Gram negativos	
6	Y2- F1FL	Bacilo Gram negativo	Mezcla de agua y sedimentos de la ensenada de Angostura, Bahía de Nipe, Holguín
7	Y6-F1BTN	Bacilo Gram positivo	
8	Y8-F9S	Bacilo Gram negativo	
9	Y9-F10S	Bacilo Gram negativo	
10	Y3-B1A	Bacilo Gram negativo	Mezcla de agua y sedimentos de la ensenada de Bacunayagua, Matanzas
11	Y7-B2A	Bacilo Gram negativo	
12	Y10-B10	Bacilo Gram negativo	
13	Y5-084	Bacilo Gram positivo	Muestra de petróleo crudo
14	338	Bacilos Gram positivos	Separador mecánico Circular de Refinería Níco López
15	339	Cocobacilos Gram positivos	
16	340	Bacilos Gram positivos	
17	341	Bacilos Gram positivos	
18	342	Cocos Gram negativos	
19	344	Cocobacilos Gram positivos	Separador mecánico Sur de Refinería Níco López
20	345	Bacilos Gram negativos	
21	349	Bacilos Gram negativos	Zanja del separador mecánico Norte de Refinería Níco López
22	350	Cocobacilos Gram positivos	
23	351	Bacilos Gram positivos	

(centrífuga Digicen 21, Ortoalresa) y se separó el sobrenadante del pellet. Para determinar la presencia de biotensoactivos se realizaron dos ensayos preliminares con el sobrenadante: índice de emulsificación (E, 24 y 72 h) y tensión superficial (TS) por el método del anillo de Du Noüy (Tensiómetro Krüss K9, Alemania); y se determinó, además, el índice de adhesión bacteriana a hidrocarburos (H) con las células.

3.2. Selección de cepas productoras de ramnolípidos

Las cepas seleccionadas después del primer proceso de discriminación (epígrafe 3.1) se cultivaron en erlenmeyers de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo MMM suplementado con glicerol (4 % m/v) y se incubaron en agitación orbital a 30°C y 130 r.min⁻¹ durante 72 h. Se realizaron diez sub-cultivos cada 72 h, estos se inocularon con 10 mL del cultivo anterior y se incubaron en iguales condiciones. El último cultivo de cada cepa se centrifugó a 5000 r.min⁻¹ durante 15 minutos (centrífuga Eppendorf 5804, Alemania) y se separó el sobrenadante del pellet. Se realizaron diluciones seriadas del sobrenadante libre de células, se midió la tensión superficial de cada dilución por el método del anillo de Du Noüy (Tensiómetro Krüss K9, Alemania) y se calculó la dilución micelar crítica (DMC). Además, se determinó la concentración de ramnosa por el método de Chandrasekaran y Bemillar [127] empleando una solución de ramnosa como patrón (Espectrofotómetro UV-Visible, Shimadzu UV-1700).

Para el análisis matemático de los resultados se empleó un método de clasificación numérica y se construyeron los dendrogramas correspondientes (la mediana y la distancia euclídeana cuadrada)

3.3. Clasificación taxonómica de la cepa seleccionada

Se observaron las colonias a las 24 h de cultivo en agar triptona soya en microscopio estereoscópico (0,63 X), la morfología celular y respuesta a la tinción de Gram en microscopio óptico (OPTIKA modelo B-500 Ti). La identificación incluyó las pruebas catalasa, oxidasa, y el uso del Sistema API 20 NE.

Para la secuenciación del gen RNA 16s se realizó la extracción de ADN a cultivos de 24 horas a los que se les comprobó la pureza mediante tinción de Gram. Se empleó como extractor IntageneChelex (BIO-RAD). La amplificación se realizó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y se emplearon los iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT) [128]. La solución para la reacción de PCR se preparó para cada muestra con 23,5 µL de agua de PCR estéril y 0,25 µL de cada iniciador; la mezcla se adicionó a un kit comercial liofilizado que contenía Buffer 10X, nucleótidos, MgCl₂ y ADN polimerasa (GE Healthcare, Reino Unido). La amplificación del gen se realizó empleando el programa 16s QUIM en un termociclador (Eppendorf mastercycler) [128]. Una vez concluido, se tomaron 5 µL del producto y se mezclaron con 3 µL de agente limpiador (ExoSap), se procesaron en termociclador durante 15 min a 37 °C y otros 15 min a 80 °C. Se mezclaron 2 µL del ARN purificado, 3 µL de agua de PCR y 5 µL de los iniciadores empleados (1:20). La mezcla se procesó en Secuenciador Automático ABI Prism 3700 (Parque Científico Técnico de la Universidad de Barcelona). La calidad de la PCR se comprobó mediante electroforesis desarrollada en gel de agarosa al 1 % (corriente de 100 a 120 V durante 20 min), como colorante se aplicó 1µL de Nancy 520 y se reveló en el Image Master empleando el sistema S4BR.

La corrección de errores se realizó en el software BioEdit Sequence Alignment Editor. Para comparar las secuencias se consultaron las bases de datos BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov), el árbol filogenético se construyó con las cepas que mostraron 97 % de similitud mediante el Método *Neighbor Joining* usando las herramientas de la misma web.

Para la confirmación de la especie se realizaron las pruebas bioquímicas confirmativas descritas en la literatura correspondiente [129]: utilización de azúcares (D-arabinosa, L-arabinosa, D-manosa y maltosa) e hidrólisis de gelatina.

3.4. Purificación de los ramnolípidos

La cepa seleccionada se cultivó como se ha descrito en el epígrafe 3.2. El caldo de cultivo libre de células se deshidrató (liofilizador Telstar Cryodos, modelo español) y el sólido obtenido fue resuspendido en agua bidestilada. La suspensión obtenida se acidificó con HCl ($1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), hasta alcanzar $\text{pH}=2$ y se conservó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. El precipitado se recuperó por centrifugación ($10000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 20 min, Eppendorf 5804). El precipitado obtenido se dividió en dos partes, una de estas se lavó varias veces con agua acidificada y se ajustó el $\text{pH} = 6$ con NaOH ($1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) y a la otra parte se le realizó una extracción de compuestos orgánicos con 5 mL de cloroformo, este proceso se repitió 3 veces. El extracto orgánico obtenido se deshidrató por percolación con Na_2SO_4 anhidro y se concentró en evaporador rotatorio a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (R111 BÜCHI, Suiza).

3.5. Caracterización físico química y toxicológica de los ramnolípidos

A la suspensión preparada con el residuo de la liofilización (3.4) se le determinó la presencia de ramnolípidos mediante la concentración de ramnosa y la tensión superficial, se calcularon la DMC y la CMC (epígrafe 3.2.).

Los extractos orgánicos fueron analizados en cromatografía de capa fina en placas de sílica gel (G60 Merck). Los grupos funcionales se determinaron mediante Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR). La caracterización parcial de la estructura se realizó por espectrometría de masa con ionización por electro spray negativo (ESI-MS)

Para evaluar la toxicidad de los ramnolípidos se prepararon tres concentraciones diferentes a partir de caldo libre de células 0,5 CMC, 1 CMC y 2 CMC. La toxicidad se evaluó por dos métodos diferentes: con semillas de *Solanum lycopersicum* (tomate) y el crustáceo *Artemia salina*) [130].

3.6. Estrategia para incrementar la productividad volumétrica en la producción de ramnolípidos por la cepa seleccionada

3.6.1. Inóculo

Se tomaron asadas de la cepa seleccionada y conservada en medio agar triptona soya después de los 10 sub-cultivos referidos en el epígrafe 3.2, y se cultivaron en erlenmeyers de 500 mL conteniendo 100 mL de medio de cultivo MMM suplementado con glicerol (4 % m/v), se incubaron a 30°C en agitación orbital a 130 r.min⁻¹ durante 48 h. Este cultivo se consideró el inóculo.

3.6.2. Condiciones de cultivo

Los cultivos se desarrollaron en erlenmeyer de 3000 mL con 1000 mL del MMM descrito en el epígrafe 3.1 suplementado con glicerol (4 % m/v) como única fuente de carbono. La concentración de la biomasa inicial se preparó en función de cada diseño. El pH inicial se ajustó a siete. Los cultivos se realizaron por triplicados y se incubaron a 30 °C en agitación orbital a 130 r.min⁻¹ durante el tiempo requerido para cada ensayo. La toma de muestra para determinar crecimiento, producción de ramnolípidos, consumo de fuentes de carbono y nitrógeno; así como los rendimientos asociados, se realizaron según cada diseño.

3.6.3. Cinética de crecimiento y producción de ramnolípidos de la cepa seleccionada en erlenmeyers de 3 L de capacidad

Se realizó el cultivo según lo descrito en el epígrafe 3.6.2 durante 96 horas. Se tomaron muestras de 15 mL cada 12 h para determinar las concentraciones residuales de las fuentes de carbono (glicerol) y nitrógeno (nitrato y nitrito), el crecimiento de la biomasa, la producción de ramnolípidos y el pH. Se calcularon el rendimiento producto/biomasa (ecuación 1) para el proceso completo y la productividad volumétrica por intervalos (ecuación 2).

$$Y_{P/X} = \frac{dP}{dX} \quad 1 \text{ [131]}$$

$$PV = \frac{dP}{dt} \quad 2 \text{ [132]}$$

Donde $Y_{P/X}$ es rendimiento producto/biomasa; X: concentración de biomasa; P: concentración de producto de interés (ramnolípidos); PV: productividad volumétrica y t: tiempo.

3.6.4. Selección de la concentración inicial de biomasa e inductor para la producción de ramnolípidos

En la determinación de la concentración adecuada de inóculo e inductor para incrementar la productividad volumétrica, se empleó un diseño factorial multinivel con dos factores y tres niveles por cada uno (**Tabla 7**). Como inductor se empleó caldo libre de células de un cultivo de 96 h de la cepa seleccionada en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v) incubado a 30 °C en agitación orbital 130 r.min⁻¹. El cultivo se desarrolló en las condiciones descritas en el epígrafe 3.6.2 durante 72 h. Se tomaron muestras en diferentes intervalos de tiempo para determinar crecimiento microbiano y producción de ramnolípidos; se calculó la productividad volumétrica de ramnolípidos para el proceso completo, esta se consideró como variable de respuesta.

Tabla 7. Diseño de experimento factorial 3² para determinar a concentración inicial de biomasa y adición de inductor en MMM con glicerol (4 % m/v).

Factor	-1	0	1
Concentración inicial de biomasa (g.L ⁻¹).	1,0	2,0	3,0
Concentración de inductor (% v/v).	0,0	1,0	2,0

3.6.5. Determinación del tiempo de cultivo para alcanzar la máxima productividad volumétrica

Para determinar el periodo de tiempo en el cual se alcanzan el mayor valor de productividad volumétrica, se desarrolló un cultivo con las condiciones descritas en el epígrafe 3.6.2 y las concentraciones de inóculo e inductor calculadas en el epígrafe anterior. Se tomaron muestras cada 12 horas para determinar el crecimiento microbiano y producción de ramnolípidos, con estos valores se calculó la productividad volumétrica de ramnolípidos.

3.6.6. Evaluación del número de ciclos de cultivo secuencial discontinuo

Se empleó un diseño de un solo factor con cinco niveles para determinar el número de ciclos, se evaluó como variable de respuesta la productividad volumétrica de ramnolípidos. Para esto se realizó el cultivo según se describió en el epígrafe 3.6.2 con las condiciones de biomasa inicial e inductor determinadas en el epígrafe 3.6.4. El tiempo de duración del ciclo se determinó a partir de los resultados del epígrafe anterior (3.6.5).

Al finalizar cada ciclo se extrajeron 660 mL y se completó nuevamente el volumen de 1000 mL, restaurando las concentraciones iniciales del medio de cultivo. Se tomaron muestras al iniciarse el primer ciclo y al final de cada uno para determinar el crecimiento microbiano y la producción de ramnolípidos. Se calculó la productividad volumétrica de ramnolípidos por ciclo y del proceso completo; y la masa de biotensioactivo total producida (la sumatoria de la masa de ramnolípidos extraída al final de cada ciclo).

3.6.7. Evaluación del crecimiento y producción de ramnolípidos de la cepa seleccionada en reactor Biostat B-MO

Se empleó un diseño factorial mixto 2^3 (**Tabla 8**), y se evaluó como variable de respuesta la productividad volumétrica de ramnolípidos. Para esto los cultivos se realizaron en reactor Biostat B-MO Single (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Alemania) con 1000 mL de volumen efectivo de MMM con las concentraciones de biomasa inicial e inductor determinadas anteriormente (epígrafe 3.6.4.) Los cultivos se incubaron durante 72 h a 130 r.min^{-1} con un flujo de aire de 1 vvm, pH = 7 y 0,5 g de antiespumante Tego KS-53 (Evonik Corporation). En los cultivos donde se evaluó el

efecto de la inyección de oxígeno puro, este se suministró al 15 % del aire. Se tomaron muestras cada 24 h para determinar el consumo de las fuentes de carbono (glicerol) y nitrógeno (nitrato y nitrito), el crecimiento microbiano y la producción de ramnolípidos. Se calculó la productividad volumétrica de ramnolípidos al final de cada intervalo.

Tabla 8. Diseño del experimento para el estudio en reactor de la inyección de oxígeno y el tiempo de cultivo en MMM con glicerol (4 % m/v).

Factor	-1	0	1
Tiempo de cultivo (h)	24	48	72
Inyección de oxígeno	No	--	Si

3.6.8. Determinación del número de ciclos de cultivo en reactor

Para determinar cuántos ciclos de cultivo se requieren para elevar la productividad volumétrica de ramnolípidos en el reactor, se realizó un diseño de un solo factor categórico individual con cinco niveles. Para esto se realizaron los cultivos en reactor Biostat B-MO Single (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Alemania) con 1000 mL de volumen efectivo de MMM con las concentraciones de biomasa inicial, inductor, oxígeno y tiempo de ciclos determinados anteriormente (epígrafes 3.6.4 y 3.6.8), los cultivos se incubaron a 130 r.min⁻¹ de agitación con un flujo de aire de 1 vvm, pH 7 y 0,5 g de antiespumante Tego KS-53 (Evonik Corporation).

Al finalizar cada ciclo se extrajeron 700 mL y se completó nuevamente el volumen de 1000 mL, restaurando las concentraciones iniciales del medio de cultivo. Se tomaron muestras al iniciarse el primer ciclo y al final de cada uno para determinar la producción de biomasa y de biotensioactivo. Se calculó la productividad volumétrica de los ramnolípidos por intervalos y del proceso completo; y la masa de ramnolípidos total producida (la sumatoria de la masa de ramnolípidos extraída al final de cada ciclo).

3.7. Estudio de la estabilidad de las emulsiones formadas por los ramnolípidos

Para los estudios de estabilidad se preparó una solución madre de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ del crudo de ramnolípidos. Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.7.1. Actividad emulsificante con diferentes compuestos hidrofóbicos

Se prepararon emulsiones con la solución madre de ramnolípidos y diferentes hidrocarburos: diésel, queroseno y petróleo crudo. Las emulsiones se incubaron a $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.7.2. Efecto del pH, temperatura y salinidad en la actividad superficial

Para analizar el efecto del pH, se tomaron 20 mL de la solución madre y se les ajustó el pH a 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 unidades, utilizando soluciones de HCl y NaOH (1 mol.L^{-1}). Se preparó otra serie de soluciones a las que se le adicionó NaCl hasta obtener concentraciones de 2, 4, 6, 8, 10 y 20 % (m/v). Las soluciones se incubaron a 30°C durante 30 min y se midió la tensión superficial por el método de Du Noüy Ring (Tensiómetro K100, Krüss, Alemania).

De la solución madre se tomaron alícuotas de 20 mL y se incubaron a 4, 25, 30, 37 y 44 y $121 \text{ }^\circ\text{C}$. Después de 30 min de incubadas se dejaron en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente ($23\text{-}24 \text{ }^\circ\text{C}$), y se midió la tensión superficial.

3.7.3. Efecto del pH, temperatura y salinidad en la estabilidad de las emulsiones

La influencia del pH y la salinidad en la actividad emulsificante se estudió con soluciones preparadas en las mismas condiciones que se describieron en el epígrafe anterior. Las emulsiones se prepararon con queroseno y se incubaron a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Se

preparó otra serie de tubos con emulsiones de solución madre y queroseno, estos se incubaron a 4, 25, 30, 37 y 44 °C.

Además, se estudió el efecto de la esterilización con vapor en la actividad emulsificante, para lo que se esterilizaron 150 mL de la solución madre en autoclave (Presoclave III-80, España). Se prepararon series de tubos con emulsiones formadas con la solución madre esterilizada y queroseno, que se incubaron a 30 y 37 °C.

El índice de emulsificación en todos los casos se determinó a los 1, 7, 14, 30 y 60 días. Las emulsiones se consideraron estables cuando se retuvo el 50 % o más del volumen original después de 14 días.

3.8. Aplicaciones de los ramnolípidos producidos por la cepa seleccionada en la industria petrolera

3.8.1. Remoción de vanadio a escala de laboratorio

Con el ramnolípidos recuperado por precipitación ácida, se prepararon soluciones con concentraciones de 0,6; 0,8; 1,2 y 2,0 x CMC, como control se empleó agua desionizada. El pH de las soluciones se ajustó a ocho para evitar la precipitación del ramnolípidos y del vanadio. Se adicionaron 10 mL de las soluciones preparadas en erlenmeyers de 50 mL con 1 g de arena sintética previamente contaminada con una solución de vanadio (vanadato de sodio 1 g.mL⁻¹). Posteriormente se agitaron en incubadora orbital a 80 r.min⁻¹ durante 72 h. Todas las variantes se realizaron por triplicado.

Concluido el periodo de incubación, las soluciones se centrifugaron a 9000 r.min⁻¹ durante 15 minutos (Eppendorf 5804). Los sobrenadantes fueron filtrados y se ajustó

el pH < 2 con HNO₃ para la determinación de vanadio. La eficiencia de remoción se calculó mediante la ecuación 3.

$$E = \frac{C \times V}{m} \times 100\% \quad 3 \text{ [133].}$$

Donde E es eficiencia del lavado (%), C es la concentración del metal removida (mg.L⁻¹), V es el volumen (L) de sobrenadante filtrado y m es la masa inicial (mg) del metal en el sedimento

3.8.2. Biodegradación de hidrocarburos

La evaluación del efecto de los ramnolípidos como biostimulante de la degradación de hidrocarburos se realizó en tres escalas diferentes: laboratorio (medio líquido), microcosmos y parcelas (suelos). Además, se aplicó un cultivo mixto de bacterias para comparar el efecto de la bioestimulación con el de la bioaumentación.

3.8.2.1. Cultivo mixto

El cultivo mixto utilizado está constituido por cuatro cepas bacterianas de la colección del CEINPET aisladas y caracterizadas previamente como degradadoras de hidrocarburos: *Pseudomonas sp.* B10, *Alcaligenes sp.* F10S1, *Bacillus sp.* F1FLC y *Bacillus sp.* F10 [125]. Las cepas se cultivaron por separado en CTS con agitación orbital a 30 °C hasta la fase de crecimiento exponencial [134]. Los cultivos se centrifugaron a 5000 r.min⁻¹ durante 15 minutos (Digicen 21, Ortoalresa, España), se lavaron dos veces con solución Ringer y se resuspendieron en esta solución. En cada cultivo se adicionó la cantidad de inóculo necesaria para alcanzar una concentración inicial de 0,2 unidades de densidad óptica (UDO) (Espectrofotómetro UV-Visible Genesys 10S, λ = 540).

3.8.2.2. Diseño del ensayo

Laboratorio

El ensayo se realizó en erlenmeyers de 100 mL con 20 mL de MMM (descrito anteriormente, epígrafe 3.1) suplementado con crudo Mesa 30 (densidad a 20 °C: 0,9953 g.cm⁻³, contenido asfáltico: 11,66 % m/m, gravedad °API: 0,6) como única fuente de carbono (1 % m/v); los cultivos se incubaron a 130 r.min⁻¹ y 30 °C durante 28 días, adicionalmente se incubó como control abiótico el medio con crudo sin inocular. Se evaluaron dos tratamientos y todos se prepararon por triplicado:

- Tratamiento 1 (CM): adición del cultivo mixto (epígrafe 3.8.2.1), (5 % v/v, las cuatro cepas en igual proporción de volumen y concentración).
- Tratamiento 2 (CM+RL): adición de cultivo mixto (semejante a tratamiento 1) + ramnolípidos en una concentración final igual a la CMC.

La degradación de crudo se determinó a partir de la variación de los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) empleando la ecuación 4. La tasa de incremento de la degradación se calculó según la ecuación 5 propuesta por Mnif y colaboradores [90].

$$\% \text{ de degradación} = \frac{m(\text{control}) - m(\text{tratamiento})}{m(\text{control})} \times 100 \quad 4$$

$$\text{Incremento de la degradac.} = \frac{\% \text{ degradación con RL} - \% \text{ degradación sin RL}}{\% \text{ degradación con RL}} \times 100 \quad 5$$

Donde m es la masa y RL es ramnolípidos

Microcosmos

Se aplicaron tres tratamientos en microcosmos con suelo de jardín del CEINPET (La Habana, Cuba). En todos los casos se empleó 1 Kg de suelo y se contaminó con 5 % m/m de crudo Mesa 30:

- Tratamiento 1 (bioaumentación, BA): adición del cultivo mixto descrito en el epígrafe 3.8.2.1 (5 % v/m, las cuatro cepas en igual proporción de volumen y concentración).
- Tratamiento 2 (bioestimulación, BE): adición del crudo de ramnolípidos (5 % v/m).
- Tratamiento 3 (bioestimulación + bioaumentación, BE+BA): adición del cultivo mixto (5 % v/m) + ramnolípidos (5 % v/m).

Todos los microcosmos se prepararon por triplicado y se incubaron durante 30 días en condiciones de humedad relativa (70 - 75 %) y temperatura ambiente (26-30 °C). Los microcosmos se humectaron por intervalos de 2 o 3 días.

Para el monitoreo analítico del proceso de biodegradación se tomaron muestras de 10 g de suelo aproximadamente a los días 0 y 30, y se realizaron los siguientes ensayos químicos y microbiológicos: grasas y aceites [135], hidrocarburos totales del petróleo (HTP) [136], compuestos saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos [137, 138], nitrógeno total [139], fósforo total [136], conteo de microorganismos totales y degradadores de hidrocarburos [140]. Las tasas de degradación y de incremento de estas se calcularon empleando las ecuaciones 4 y 5, respectivamente, presentadas anteriormente. En el caso de la ecuación 4 se sustituyó la masa por la concentración.

Parcelas

El experimento se realizó durante 30 días en terrenos de la refinería Níco López (La Habana, Cuba). Cada parcela abarcó 500 m² de suelo contaminado con hidrocarburos.

Se emplearon dos tratamientos en el diseño:

- Tratamiento 1 (bioaumentación, BA): adición de 50 L del cultivo mixto ya descrito (las cuatro cepas en igual proporción de volumen y concentración).
- Tratamiento 2 (bioestimulación, BE): adición de 50 L de crudo de ramnolípidos.

La liberación del cultivo mixto en terrenos de la refinería Níco López, se realizó amparada en el permiso otorgado por el Centro de Seguridad Biológica [LH-17-P (38) 20]. Para el monitoreo analítico del proceso de biodegradación se tomaron muestras de 1000 g de suelo aproximadamente a los 0 y 30 días y se realizaron los mismos ensayos que en el proceso en microcosmos.

A los 30 días de aplicados los tratamientos en las parcelas, se tomaron muestras para realizar un ensayo toxicológico agudo con *Eisenia andrei* (lombriz de tierra) [141]. El ensayo se realizó durante 14 días y como efecto se empleó la mortalidad.

3.8.3. Recuperación de petróleo crudo en columnas empacadas

La recuperación en columnas se realizó según el método descrito por Gudiña y colaboradores [142]. En columnas de vidrio vertical ($V = 50 \text{ mL}$) empacadas con arena (previamente lavada con ácido y esterilizada). Se inyectó agua ($3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) hasta saturar la columna para determinar el poro volumen (pV ; mL); definido como el volumen de saturación (se midió volumétricamente). Se calculó la porosidad de la columna ($P = pV / V$; %). Posteriormente se inyectó crudo pesado de igual manera hasta desplazar el agua. Se midió volumétricamente el crudo retenido en la columna (OOIP, mL), (volumen de crudo requerido para desplazar el agua). Se calculó la saturación de crudo ($S_{oi} = \text{OOIP} / pV * 100$; %) y la saturación inicial de agua [$S_{wi} = (1 - \text{OOIP}/pV) * 100$; %].

Las columnas se almacenaron durante 24 h a $44 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente se aplicó otro flujo de agua ($3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) para remover el exceso de crudo no adherido. El crudo recuperado se midió volumétricamente y se denominó crudo recuperado después del

flujo de agua (Sorfw; mL). Se calculó el crudo de saturación de la columna
 $[Sor = (1 - Sorfw / OOIP) * 100; \%]$

A las columnas se les adicionaron 10 mL de solución de crudo de ramnolípidos: 0,1; 1; 2 y 2,5 %; y se almacenaron a 44 °C durante 28 días. Concluido el proceso se pasó otro flujo de agua (3 mL.min⁻¹), se midió volumétricamente el petróleo crudo recuperado (Sormf; mL) y se calculó el índice de recobrado adicional $[AOR = Sormf / (OOIP - Sorwf) * 100; \%]$. La **Figura 6** muestra un esquema general de la secuencia del ensayo. Se emplearon en el ensayo cuatro concentraciones diferentes de crudo de ramnolípidos. Como control se empleó agua bi-destilada.

3.9. Determinaciones analíticas

Índice de emulsificación (E): método descrito por Sharma y colaboradores [143].

Tensión superficial (TS): método del anillo de Du Noüy (Tensiómetro Krüss K9 y Krüss K100 Alemania) descrito por Vakili y colaboradores [144].

Índice de adhesión bacteriana a hidrocarburos (H) con las células: método descrito por Samykanno y colaboradores. [145].

Ramnosa: I método de Chandrasekaran y Bemillar [127] utilizando una solución de ramnosa como patrón (Espectrofotómetro UV-Visible, Shimadzu UV-1700).

Ramnolípidos: se calculó multiplicando la concentración de ramnosa por el factor 3,24; el cual representa la correlación ramnolípidos/ramnosa. Este factor se comprobó experimentalmente usando una curva de calibrado.

$RL = 3,24 * [ram]$ Coeficiente de Correlación = 0,9950 $R^2 = 99,0096 \%$

[ram]: concentración de ramnosa

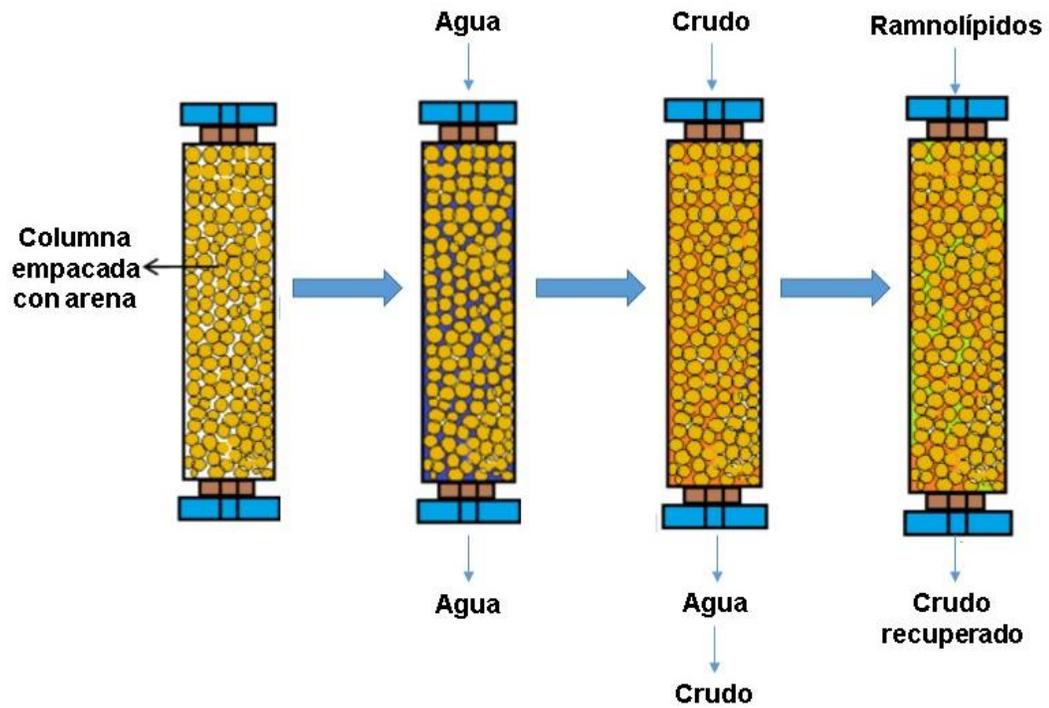


Figura 6. Preparación de las columnas empacadas con arena para la determinación del índice de recobro adicional.

Amarillo: arena; Azul: agua; Anaranjado: petróleo crudo; Verde: ramnolípido (sobrenadante en sus diferentes diluciones)

Cromatografía de capa fina: se realizó en placas de sílica gel (G60 Merck). Las placas se activaron previamente a 110 °C durante 30 minutos en estufa. Los cromatogramas fueron desarrollados en cloroformo/metanol/ácido acético (65:25:4 v/v) y visualizados con reactivo de Molish (α -naftol/H₂SO₄), ninhidrina (indan-1,2,3-triona), difenilamina, ácido fosfomolibdico y verde de bromocresol.

Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR): se empleó la técnica de película capilar con ventanas de NaCl. Para la lectura de los espectros se empleó un espectrómetro Pekin Elmer, modelo Frontier y el procesamiento de datos con el software Spectrum versión 10.4.4.449, Copyright 2015. Se siguió la metodología descrita por Bharali P y Kumar B [146] y Saimmai A y colaboradores [147].

Espectrometría de masa con electro spray negativo: Se empleó electro spray negativo con tres cargas diferentes: H⁺, Na⁺ y NH₄⁺ en espectrómetro de masa Maldi TOF/TOF 8085 (ABSci). Los datos espectrales fueron obtenidos en un barrido de masas de 50 a 1400 m/z a una energía de 175 V.

Cuantificación de biomasa:

Absorbancia (DO): Las determinaciones fueron realizadas en Espectrofotómetro UV-Visible Genesys 10S en cubetas de 1 mL, a una longitud de onda de 540 nm.

Masa seca gravimétrica (MSG): se centrifugaron alícuotas de 5 mL de cultivo a 10 000 r.min⁻¹ durante 10 minutos (centrífuga modelo alemán Eppendorf 5804), el pellet se lavó dos veces con solución Ringer estéril y se eliminó toda el agua excedente. Los viales eppendorf se secaron en estufa 90°C.

Proteínas: se determinó por el método de Lowry modificado (Kit suministrado por Thermo Scientific, número de catálogo 23240), según instrucciones del fabricante.

Se realizaron las curvas de calibración de Masa seca gravimétrica y proteínas vs Absorbancia mediante análisis de regresión simple, los coeficientes de correlación fueron de 0,999886 y 0,995396, respectivamente.

$$\text{MSG} = -0.0053 + 0.0998 \cdot \text{Absorbancia}$$

$$\text{Proteínas} = 0.0459 + 0.0797 \cdot \text{Absorbancia}$$

Cuantificación de carbono residual: el carbono residual, referido al contenido de glicerol se determinó por el método descrito por Kuhn y colaboradores [148].

Determinación del consumo de nitrógeno en medio de cultivo: se determinó la presencia de nitrito y nitrato mediante el Kit Quantofix (suministrado por Macherey-Nagel Referencia 913 13). Según instrucciones del fabricante.

Contenido de Vanadio: La determinación de vanadio se efectuó por la técnica de espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) en un instrumento Perkin Elmer Optima 3200RL en condiciones estándar. La calibración se realizó con cinco patrones preparados a partir de soluciones patrón certificados trazables al Instituto Internacional de Estándares y Tecnología (NIST) y las muestras analizadas fueron diluidas 1:10 mL con HNO₃ 1 %.

Determinación de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) en medio líquido:

Se le realizaron cinco extracciones seguidas con 7 mL de diclorometano de los cultivos. El extracto se deshidrató por percolación a través de Na₂SO₄ anhidro y se concentró en rota evaporador (R111 Büchi, Suiza) hasta un volumen final aproximado de 1 mL. Para realizar la limpieza (*clean up*) de los extractos, estos se disolvieron en diclorometano para un volumen final de 5 mL, de los cuales se tomó 1 mL y se pasó a través de una columna de alúmina activada (2 g). La muestra se arrastró con 10 mL

de diclorometano y los extractos se concentraron nuevamente a 1 mL para su análisis por cromatografía de gases.

La fracción resultante del *clean up* se inyectó en un Cromatógrafo de Gases Trace 2000 (Thermo Quest, Italia) acoplado a un detector de ionización de llama (GC-FID) equipado con una columna capilar DB-5 (J & W Scientific Products GmbH, Alemania) de 30 m x 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de tamaño de película. Como gas portador se usó hidrógeno de alta pureza (5.0, Abelló Linde) a una velocidad de flujo de 40 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$.

La temperatura del inyector se fijó a 280 °C manteniendo las válvulas cerradas 0,8 min. El programa térmico consistió en: 50 °C iniciales más tres rampas, la primera de 10 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ hasta 150 °C, la segunda a 6 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ hasta 250 °C y la tercera a 10 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ hasta 300 °C con una isoterma final de 5 min. La temperatura del detector se fijó a 310 °C. El flujo de helio (pureza 5,0, Abelló Linde) se fijó a 1.1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y el volumen de inyección fue de 1 μl .

3.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico de todos los ensayos se realizó empleando el software STATGRAPHICS Centurion XV, versión 15.2.05. La normalidad de los datos se comprobó mediante la prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov-Smirnov) y la varianza se verificó empleado la prueba C de Cochran. En los casos que procedía se realizó un ANOVA simple para comparar las medias. Para determinar las diferencias significativas entre las medias se empleó el test LSD de Fisher.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Selección primaria de cepas productoras de biotensioactivos

La capacidad de producir biotensioactivos de las cepas estudiadas se muestra en la **Tabla 9**. De las 23 cepas en estudio, diez mostraron valores de índices de emulsificación con queroseno a las 24 y 72 h (E_{24} y E_{72}), superiores a 50 %: D6, D1, Y3-B1A, Y10-B10, 341, 342, 344, 345, 349 y 350). Las cepas Y9-F10S, Y6-F1BTN y Y5-084 mostraron valores de E_{24} superiores a 50 %, sin embargo, a las 72 h el índice disminuyó a menos de 50 %.

De las diez cepas que mostraron índices de emulsificación superiores al 50 %, solo en cinco el índice de adhesión a hidrocarburos (H) fue superior al 50 % (D6, Y3-B1A, Y10-B10, 344 y 349). Otras tres cepas mostraron $H > 50$ % (Y2-F1FL, Y9-F10S y 338), pero sus índices de emulsificación fueron menores al 50 %. Cuatro cepas disminuyeron la tensión superficial a menos de $40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (D6, D1, Y3-B1A y 351).

En el dendrograma (**Figura 7**) se aprecian dos grupos: en el conjunto I se encuentran agrupadas 20 cepas con el control, estas presentaron poca actividad superficial o solamente la mostraron en parte de los ensayos realizados. En el grupo II se asociaron las cepas Y3-B1A, Y10-B10 y D6. Las cepas D6 y Y3-B1A mostraron los índices E_{24} , E_{72} , y H superiores al 50 % y disminuyeron la tensión superficial a menos de $40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, mientras que la cepa Y10-B10 mostró un comportamiento semejante, excepto en la disminución de la tensión superficial ($40,25 \pm 0,78 \text{ m N}\cdot\text{m}^{-1}$), no obstante, este valor está en el rango del límite empleado. Estas tres cepas se seleccionaron como mejores productoras de biotensioactivos para continuar el estudio en una segunda etapa de selección.

Tabla 9. Determinación de presencia de ramnolípidos mediante los índices E₂₄, E₇₂, H y la tensión superficial.

No	Aislado	E ₂₄ (%)	E ₇₂ (%)	H (%)	TS (mN.m ⁻¹)
0	Control	0,0 ^m ±0,0	0,0 ^m ±0,0	0,1 ^q ± 0,1	69,0 ^r ±0,1
1	D6	67,6 ^a ±1,8	67,6 ^a ±1,8	86,6 ^a ±2,8	30,9 ^a ±0,1
2	D1	58,8 ^{bc} ±1,5	56,6 ^{cd} ±1,5	37,2 ^g ± 2,0	39,4 ^c ±0,6
3	Y3-B1A	57,9 ^{bcd} ±0,9	57,9 ^{bc} ±0,9	69,9 ^b ±2,3	39,6 ^{cd} ±0,1
4	Y10-B10	62,7 ^{ab} ±3,1	62,7 ^{ab} ±3,1	57,7 ^d ±1,2	40,3 ^d ±0,8
5	Y8-F9S	45,0 ^{ghi} ±2,1	40,7 ^{hij} ±2,2	31,3 ^{hi} ±0,2	49,4 ^f ±0,6
6	Y2-F1FL	38,9 ^k ±2,1	38,9 ^{ij} ±2,1	52,6 ^e ±2,8	49,6 ^{fg} ±0,1
7	Y6-F1BTN	67,1 ^a ±2,8	6,2 ^l ±0,4	5,2 ^{mno} ±0,1	50,6 ^h ±0,1
8	Y9-F10S	51,4 ^{efg} ±0,9	44,2 ^{gh} ±3,6	66,3 ^c ±1,1	55,4 ⁱ ±0,4
9	Y7-B2A	49,4 ^{fgh} ±1,4	6,6 ^l ±0,3	7,8 ^m ±0,1	59,3 ^k ±0,8
10	MMM NI	42,2 ^{ijk} ±1,9	42,2 ^{ghij} ±1,9	3,4 ^{op} ±0,21	64,3 ^o ±0,1
11	Y5-084	55,1 ^{cde} ±0,5	46,9 ^{fg} ±0,9	4,9 ^{mno} ±0,3	61,4 ^m ±0,1
12	MMM I 1	8,5 ^l ±1,0	8,5 ^l ±1,0	1,2 ^{pq} ±0,3	65,8 ^p ±0,1
13	MMM I 2	0,0 ^m ±0,0	0,0 ^m ±0,0	3,5 ^{nop} ±0,1	68,6 ^r ±0,2
14	338	45,6 ^{def} ±2,8	37,0 ^{jk} ±2,7	69,4 ^{bc} ±0,1	40,7 ^d ±0,1
15	339	40,5 ^{bc} ±2,3	31,9 ^j ±2,9	33,5 ⁱ ±0,1	42,9 ^e ±0,4
16	340	47,2 ^{ghi} ±0,4	47,2 ^{fg} ±0,4	20,4 ^k ±1,1	51,7 ⁱ ±0,1
17	341	51,3 ^{efg} ±1,0	50,8 ^{ef} ±0,3	42,6 ^f ±0,9	58,9 ^k ±0,1
18	342	54,1 ^{cdef} ±5,1	54,1 ^{cde} ±5,1	6,3 ^{mn} ±0,1	50,2 ^{gh} ±0,0
19	344	56,8 ^{cde} ±3,8	55,6 ^{cde} ±3,3	67,9 ^b ±2,9	67,4 ^q ±0,1
20	345	55,4 ^{cde} ±5,0	55,35 ^{cde} ±5,0	28,9 ⁱ ±1,3	59,4 ^l ±0,1
21	349	53,0 ^{def} ±4,2	53,00 ^{cde} ±4,2	59,6 ^d ±2,4	63,2 ⁿ ±0,1
22	350	51,5 ^{efg} ±3,5	51,50 ^{def} ±3,5	24,4 ⁱ ±1,6	40,2 ^{cd} ±0,1
23	351	46,1 ^{ghij} ±5,0	43,70 ^{ghi} ±2,0	11,4 ^l ±0,6	37,9 ^b ±0,1

Se presenta el valor medio y la desviación estándar para n=3. Valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según el método LSD de Fisher, el análisis estadístico se realizó para cada ensayo por independiente.

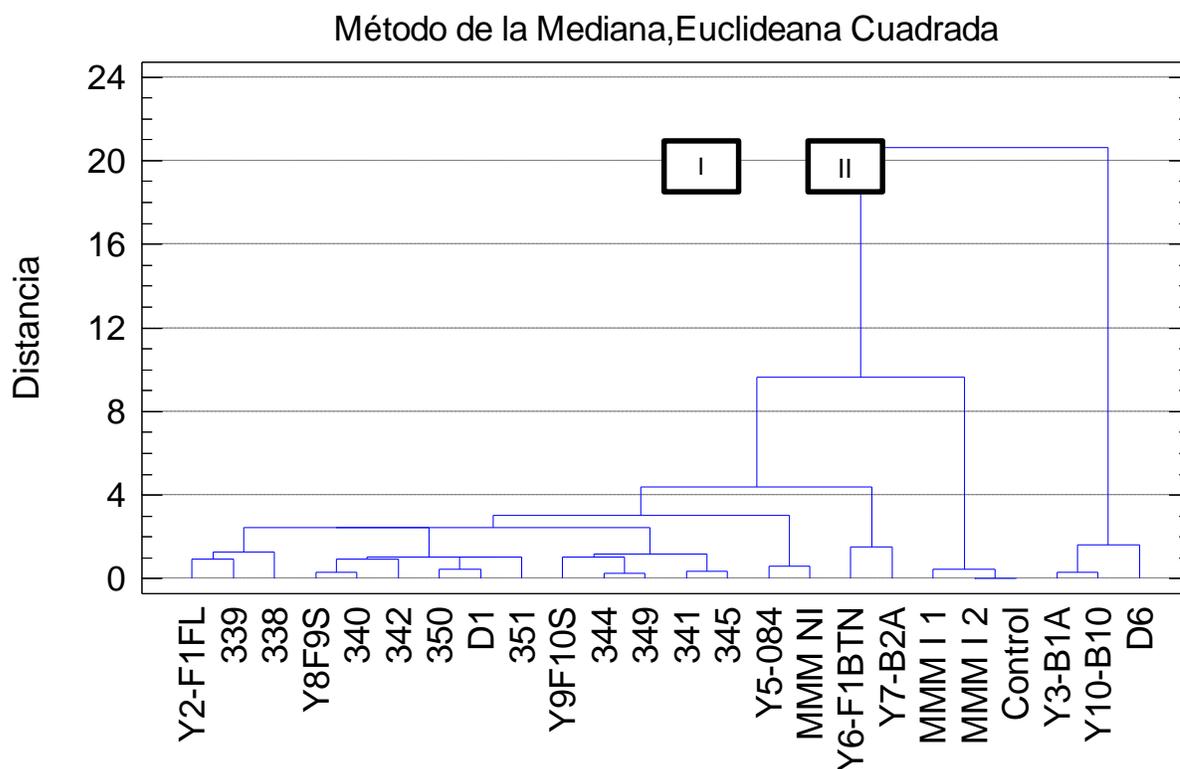


Figura 7. Agrupamiento de las cepas aisladas en función de la actividad superficial demostrada con los análisis E_{24} , E_{72} , H y tensión superficial.

4.2. Selección de cepas productoras de ramnolípidos

La variación de tensión superficial provocada por las diluciones del caldo de cultivo libre de células de las cepas Y3-B1A, Y10-B10 y D6 (Grupo II, **Figura 7**), se muestra en la **Figura 8**. El caldo libre de células de la cepa Y3-B1A mostró los valores más bajos de tensión superficial, $25,43 \pm 1,70 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, los cuales son significativamente diferente ($p < 0,05$) a los alcanzados por los caldos de las cepas Y10-B10 ($30,93 \pm 1,90 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) y D6 ($31,37 \pm 0,99 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$). La DMC del caldo de la cepa Y3-B1A fue de 2,70 %; mientras que los valores de las cepas fueron más altos: Y10-B10 (4,36 %) y D6 (5,05 %), (**Tabla 10**). La producción de ramnolípidos de la cepa Y3-B1A ($29,32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) fue significativamente superior a la de las otras dos cepas: Y10-B10 ($26,57 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y D6

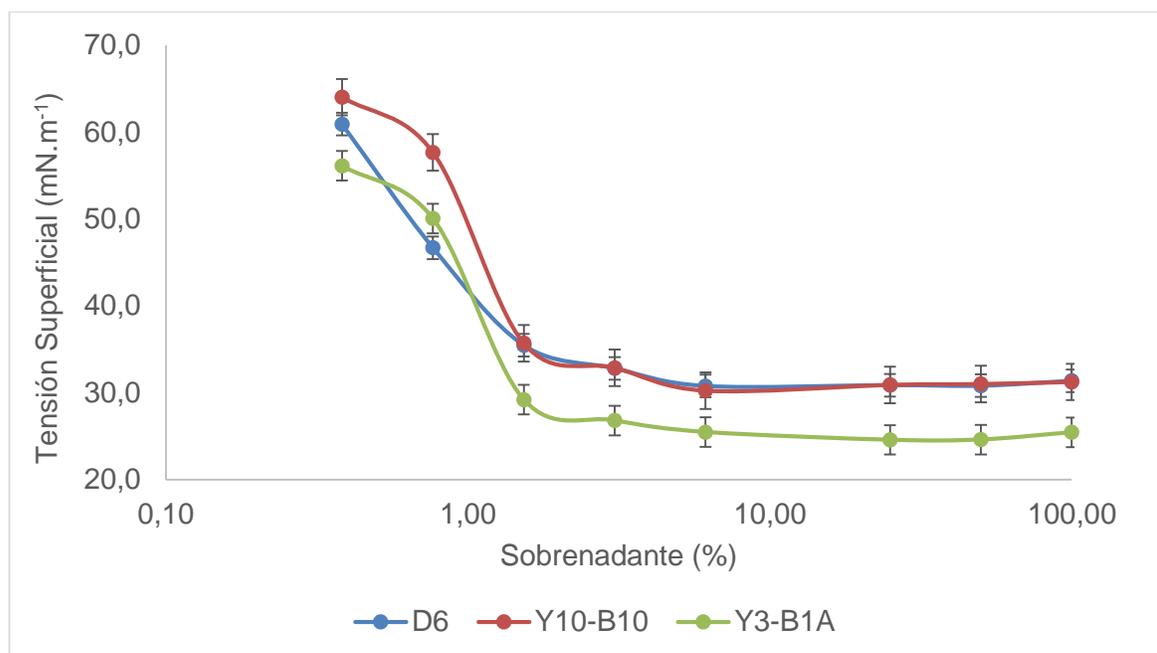


Figura 8. Variación de la tensión superficial en función de la concentración del caldo de cultivo libre de células de las cepas D6, Y3-B1A, Y10-B10.

Tabla 10. Determinación de presencia de ramnolípidos en los caldos de cultivo libres de células de las cepas seleccionadas: D6, Y3-B1A, Y10-B10.

Cepa	T S (mN.m ⁻¹)	DMC (% v/v)	Ramnolípidos (g.L ⁻¹)	CMC (g.L ⁻¹)
Y3-B1A	25,43 ^a ±1,70	2,70	29,32 ^a ±0,41	0,114
Y10-B10	30,93 ^b ±1,90	4,36	26,57 ^b ±0,35	0,168
D6	31,37 ^b ±0,99	5,05	21,12 ^c ±0,25	0,154

Se presenta el valor medio y la desviación estándar para n=3. Valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según el método LSD de Fisher, el análisis estadístico se realizó para cada ensayo por independiente.

(21,12 g.L⁻¹), ($p < 0,05$). La CMC, calculada en función de la concentración de ramnolípidos permitió determinar cuál cepa era más eficiente. Se seleccionó la cepa Y3-B1A, por ser la que produjo mayor cantidad de ramnolípidos y tuvo menores valores de CMC y DMC, por lo que se determinó que fue la más eficiente de las tres.

4.3. Clasificación taxonómica de la cepa Y3-B1A

La cepa seleccionada, Y3-B1A, es un bacilo Gram negativo móvil que crece en condiciones aeróbicas. Se observaron colonias redondeadas, verdes súper claras y brillantes (traslucidas), cremosas, convexas y con bordes enteros en medio agar triptona soya. La cepa fue positiva a las pruebas de catalasa y oxidasa.

El porcentaje de similitud de secuencia del gen ADNr 16S con respecto a otras secuencias relacionadas de la base de datos (GenBank) fue del 97,62 % con *Pseudomonas indica* NBRC 103045 (cepa tipo) y del 100 % con *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 (**Figura 9**). Con la secuenciación del gen ADNr 16S se determinó que la cepa pertenece al género *Pseudomonas*.

Para confirmar a cuál especie pertenece la cepa *Pseudomonas sp.* Y3-B1A, se realizó el ensayo API 20 NE (**Figura 10**, ID excelente, código 1 354 475) y cinco pruebas bioquímicas descritas en la literatura [149] (**Tabla 11**).

La descripción micro y macro morfológica, los resultados obtenidos de la secuenciación del gen ADNr 16S, la aplicación del kit API 20 NE, y los resultados de los ensayos bioquímicos realizados, permitieron clasificar taxonómicamente a la cepa Y3-B1A como miembro de la especie *Pseudomonas aeruginosa*.

La secuencia se depositó en el Banco de Genes del Centro Nacional de Información para Biotecnología, de Estados Unidos (NCBI) con el número MN044707.

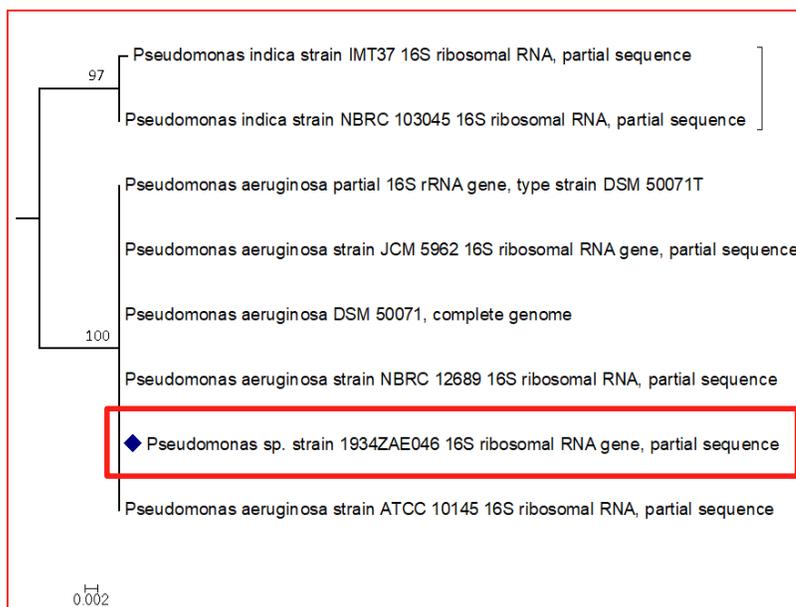


Figura 9. Árbol filogenético de la cepa Y3-B1A comparada con otras especies del género *Pseudomonas*. El árbol se generó por el método de *Neighbor Joining*.

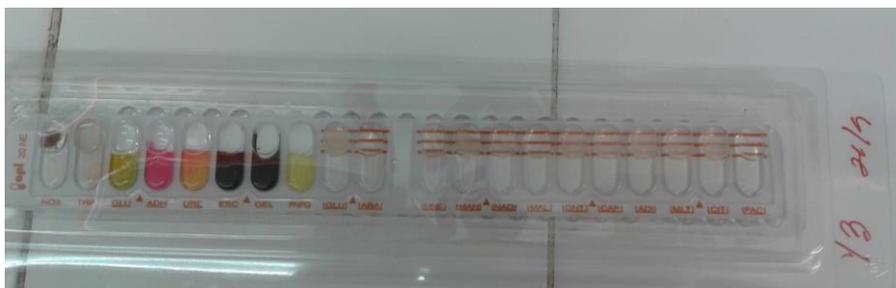


Figura 10. Aplicación del método API 20 NE en la clasificación de la cepa Y3-B1A.

Tabla 11. Resultados de las pruebas bioquímicas confirmatorias de la especie.

Ensayo	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. indica</i>	Y3-B1A
<u>Utilización de azúcares:</u>			
D-arabinosa	+	-	+
L-arabinosa	-	+	-
D-manosa	+	-	+
Maltosa	-	+	-
Hidrólisis de Gelatina	+	-	+

4.4. Caracterización físico química y toxicológica de los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A

La tensión superficial del extracto orgánico fue de $24,98 \pm 0,07$ mN.m⁻¹. La **Figura 11** muestra la variación de la TS en función de la concentración de los ramnolípidos. El valor de la CMC fue de 117,78 mg.L⁻¹. La cromatografía en capa fina mostró resultados positivos con verde bromocresol, reactivo de Molish y difenilamina, los resultados fueron similares a la mezcla de ramnolípidos utilizada como control.

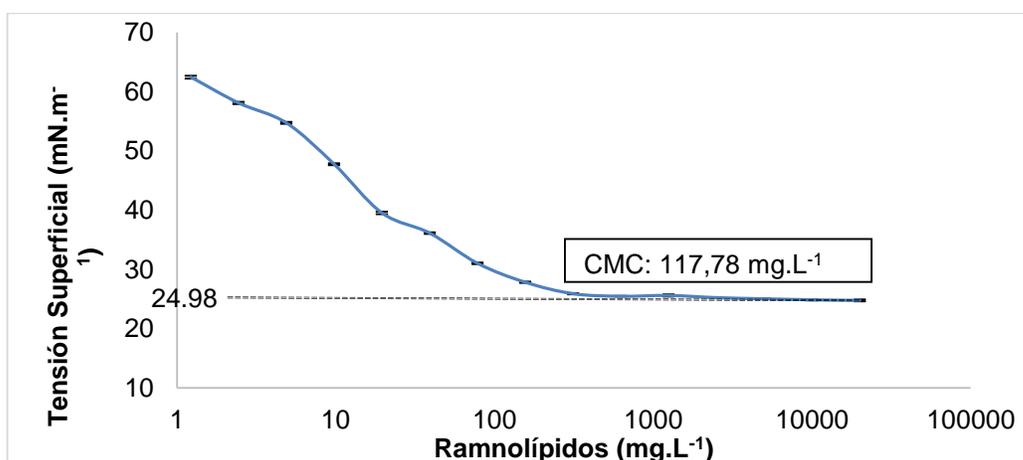


Figura 11. Variación de la tensión superficial en función de la concentración de los ramnolípidos purificados de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* Y3-B1A.

En la **Figura 12** se muestra el espectro infrarrojo con bandas intensas en 3368 cm⁻¹ correspondientes a la vibración de estiramiento OH asociada a la presencia de ácidos carboxílicos. En 2962, 2927 y 2888 cm⁻¹ se observan bandas que corresponden a la vibración de estiramiento CH (CH₂ y CH₃) características de compuestos alifáticos. En 1260 cm⁻¹ está la región de las bandas de estiramiento asimétrico de C-O-C. En la región de 900 a 1100 cm⁻¹ aparecen bandas C-O-C típicas de ramnosas. Las bandas que se encuentran por debajo de 800 cm⁻¹ se pueden asociar a vibraciones de doblajes CH fuera del plano de las moléculas [150]. Estos resultados indican la presencia de

moléculas de ramnosa y cadenas hidrocarbonadas, típicas de la estructura de los ramnolípidos.

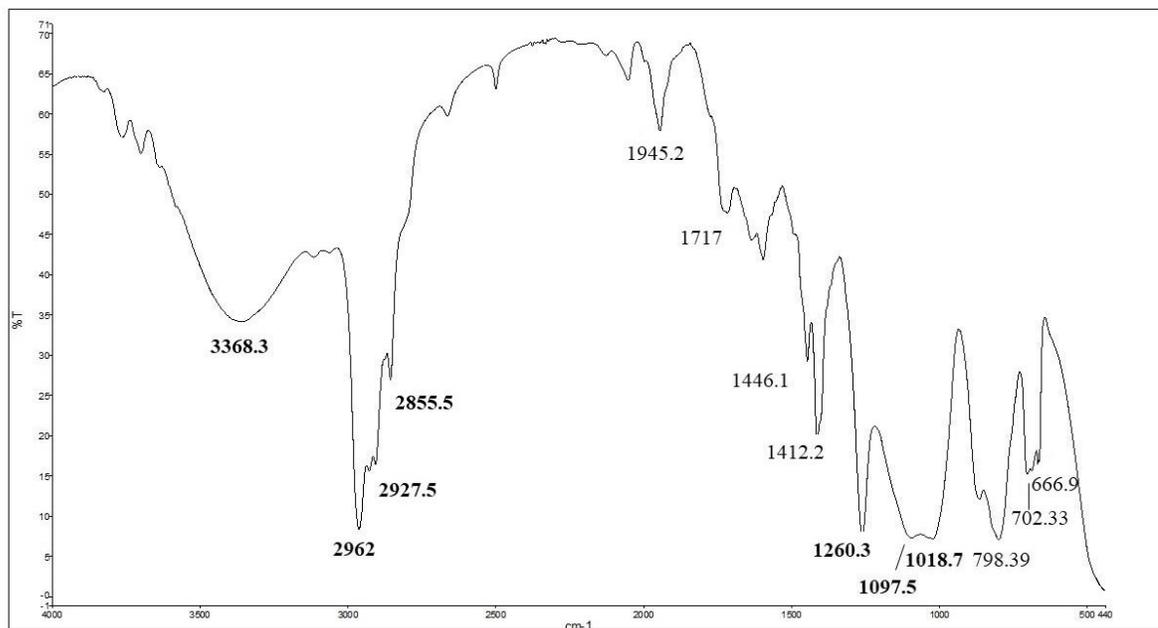


Figura 12. Espectro infrarrojo del biotensioactivo producido por la cepa *P. aeruginosa* Y3-B1A.

Como se puede apreciar en la **Tabla 12**, el extracto orgánico de *P. aeruginosa* Y3-B1A analizado mediante MALDI TOF MS contiene 14 mono- y di-ramnolípidos con 29 iones diferentes. Los iones predominantes fueron: 668,42 y 522,36 m/z que se corresponden con Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ y Rha-C₁₀-C₁₀, respectivamente.

En el ensayo toxicológico con *Artemia salina* se determinó una concentración letal media de 163,4 mg.L⁻¹ para un 95 % de confianza (**Tabla 13**). El índice de germinación de las semillas de *Solanum lycopersicum* aumentó de 46,7 a 65,0 % en correspondencia con la disminución de la concentración de ramnolípidos de 240 a 60 mg.L⁻¹. Se estimó una concentración de ramnolípidos de 190,6 mg.L⁻¹ para una germinación del 50 %, con un 95 % de confianza.

Tabla 12. Iones pseudomoleculares observados en los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A.

Símbolo o congénere	Masa [M]	[M + H]⁺	[M + NH₄]⁺ (m/z)	[M + Na]⁺
Rha-C ₈	302	303,21	320,24	325,20
Rha-C ₁₀	330	331,17	348,27	355,23
Rha-C ₁₂	358	359,28	376,30	381,26
Rha-C ₁₄	386	387		
Rha-C ₆ -C ₁₀ ;	448,58	450,34		
Rha-C ₈ - C ₈				
Rha-C ₈ - C ₁₀	474,59	476,35	494,33	499,29
Rha-C ₁₀ - C ₁₀	504,65	505,33	522,36	527,32
Rha-C ₁₂ - C ₁₂	560,76	562,27		
Rha-Rha-C ₁₂	508,60	510,30		
Rha-Rha-C ₁₄	536,66	537,34	553,33	
Rha-RhaC ₈ -C ₁₀	622,34		640,39	645,34
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	650,79	651,39	668,42	673,37
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂	678,73	680,47	696,45	701,40

Tabla 13. Evaluación toxicológica de los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A empleando nauplios de *Artemia salina* y semillas de *Solanum lycopersicum*.

Tratamientos	<i>Artemia salina</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
	Mortalidad (%)	Germinación (%)
Control	0,0	100
240 mg.L ⁻¹ (2 x CMC)	80,0	46,7
120 mg.L ⁻¹ (1x CMC)	26,7	56,7
60 mg.L ⁻¹ (0,5 x CMC)	0,0	65,0

4.5. Estrategia para incrementar la productividad volumétrica de los ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A

La estrategia para incrementar la productividad volumétrica (PV) de los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A se desarrolló en Erlenmeyer con agitación orbital y en reactor (1000 mL, volumen efectivo).

4.5.1. Cinética de crecimiento y producción de ramnolípidos en incubadora con agitación orbital

La **Figura 13** muestra la cinética de crecimiento y de producción de ramnolípidos de la cepa *P. aeruginosa* Y3-B1A. La fase exponencial de crecimiento se extendió hasta las 50 h (biomasa de 3,3 g.L⁻¹), coincidiendo con el agotamiento de la fuente de nitrógeno (disminución de 3,3 a 0,5 g.L⁻¹). La fase exponencial mostro un cambio en la velocidad de crecimiento en el periodo de 24 a 36 h aproximadamente, mostrando mayor velocidad en el segundo periodo. A las 50 h la cepa inició la fase estacionaria de crecimiento, obteniéndose 3,9 g.L⁻¹ de biomasa final.

Durante las primeras 36 h de cultivo, coincidiendo con la primera parte de la fase exponencial, la producción de ramnolípidos fue baja (3,8 g.L⁻¹). Posteriormente se apreció un incremento exponencial que se mantuvo hasta 80 h con una producción de 24,9 g.L⁻¹ de ramnolípidos. La disminución del glicerol en el medio se corresponde con el incremento de la población microbiana y de la concentración de ramnolípidos. El pH inicial del medio de cultivo se ajustó a siete, cuando la cepa alcanzó la fase estacionaria el valor era ocho y luego incrementó ligeramente a 8,5; se mantuvo en este valor el resto del tiempo de cultivo.

Los valores de PV calculados cada 24 se muestran en la **Tabla 14**. En el periodo de 48 a 72 h se produjo la mayor cantidad de ramnolípidos, la PV varió de 0,172 a 0,253 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, coincidiendo con la fase de aceleración negativa de crecimiento. La PV al concluir el cultivo (96 h) fue de 0,257 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, para una producción total de ramnolípidos de 24,86 g.L^{-1} y un rendimiento producto biomasa de 6,56.

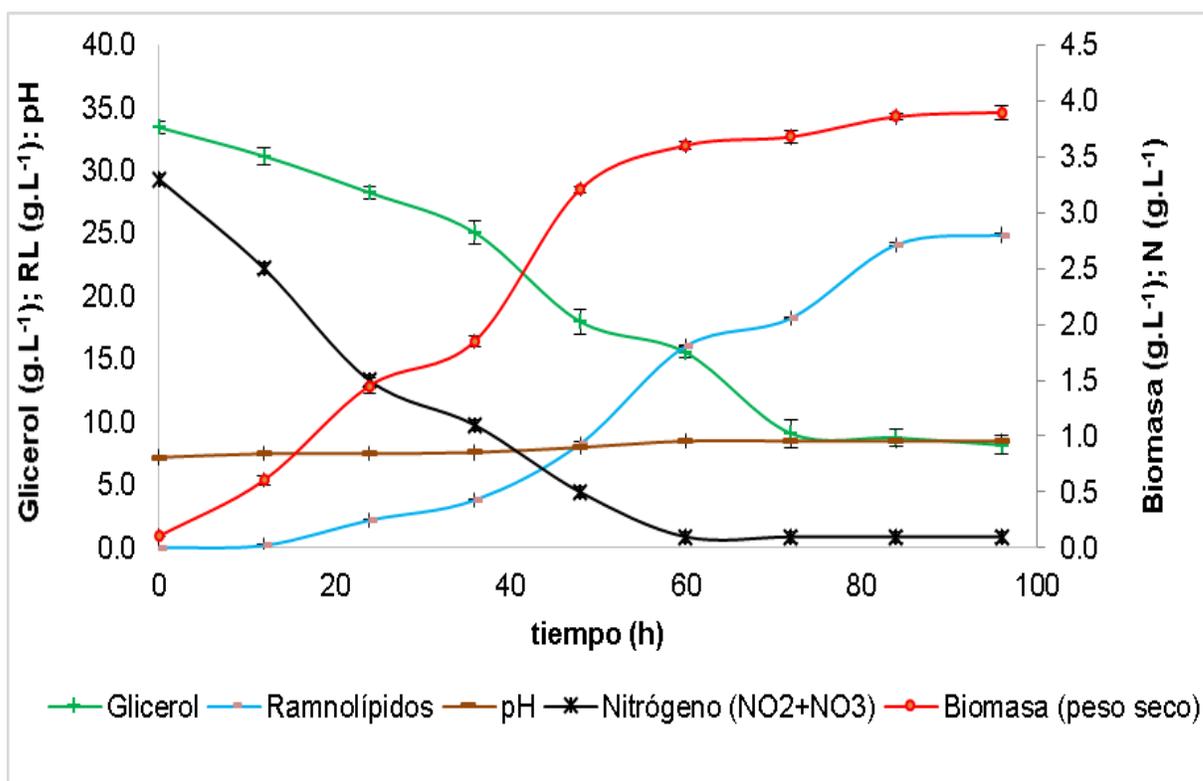


Figura 13. Perfil de crecimiento y de producción de ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol (4% m/v) incubado durante 96 h en agitación orbital a 130 r.min^{-1} y 30 °C.

Tabla 14. Productividad volumétrica calculada durante el crecimiento y la producción de ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v) incubado durante 96 h en agitación orbital a 130 r.min^{-1} y 30 °C.

	Tiempo (h)			
	24	48	72	96
PV ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	0,090 ^c ± 0,004	0,172 ^b ± 0,003	0,253 ^a ± 0,003	0,257 ^a ± 0,001

Se presenta el valor medio y la desviación estándar para n=3. Valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según el método LSD de Fisher.

4.5.2. Selección de la concentración de biomasa inicial e inductor para la producción de ramnolípidos

La concentración inicial de biomasa y la adición de sobrenadante con contenido de ramnolípidos como inductor influyen significativamente en la producción de ramnolípidos en cultivos agitados en zaranda orbital a 30 °C. La superficie de respuesta y su transformación canónica, muestran un óptimo local para la zona de estudio (**Figura 14 A y B**).

Las concentraciones de inóculo y de inductor influyeron positivamente sobre la PV (efectos principales, de primer orden). La interacción entre ambos factores no fue significativa. Los efectos cuadráticos tuvieron un resultado negativo. Esto indica que la concentración de ambos no se puede aumentar indefinidamente, pues en un punto dejará de ser positivo el efecto que provoca en la productividad volumétrica para tornarse negativo. Además, el factor cuadrático de la concentración de biomasa inicial es el efecto con mayor incidencia en el resultado (**Figura 14 C**).

Este resultado indica la existencia de un óptimo de biomasa inicial e inductor donde la productividad volumétrica se hace máxima. Para determinar ese punto se eliminaron los efectos no significativos, obteniéndose el siguiente modelo.

$$PV = 0,441222 + 0,0213333*[X_0] + 0,0221667*[Ind] - 0,107333*[X_0]^2 - 0,0348333*[Ind]^2$$

Donde $[X_0]$: concentración de biomasa inicial; $[Ind]$: concentración inicial de inductor

Mediante la utilización del análisis matemático se determinaron los valores óptimos de biomasa inicial e inductor para incrementar la productividad volumétrica, los cuales son 2,1 g.L⁻¹ y 1,25 %, respectivamente (**Tabla 15**). Estos valores se establecieron como parte de la estrategia de incremento de la productividad volumétrica.

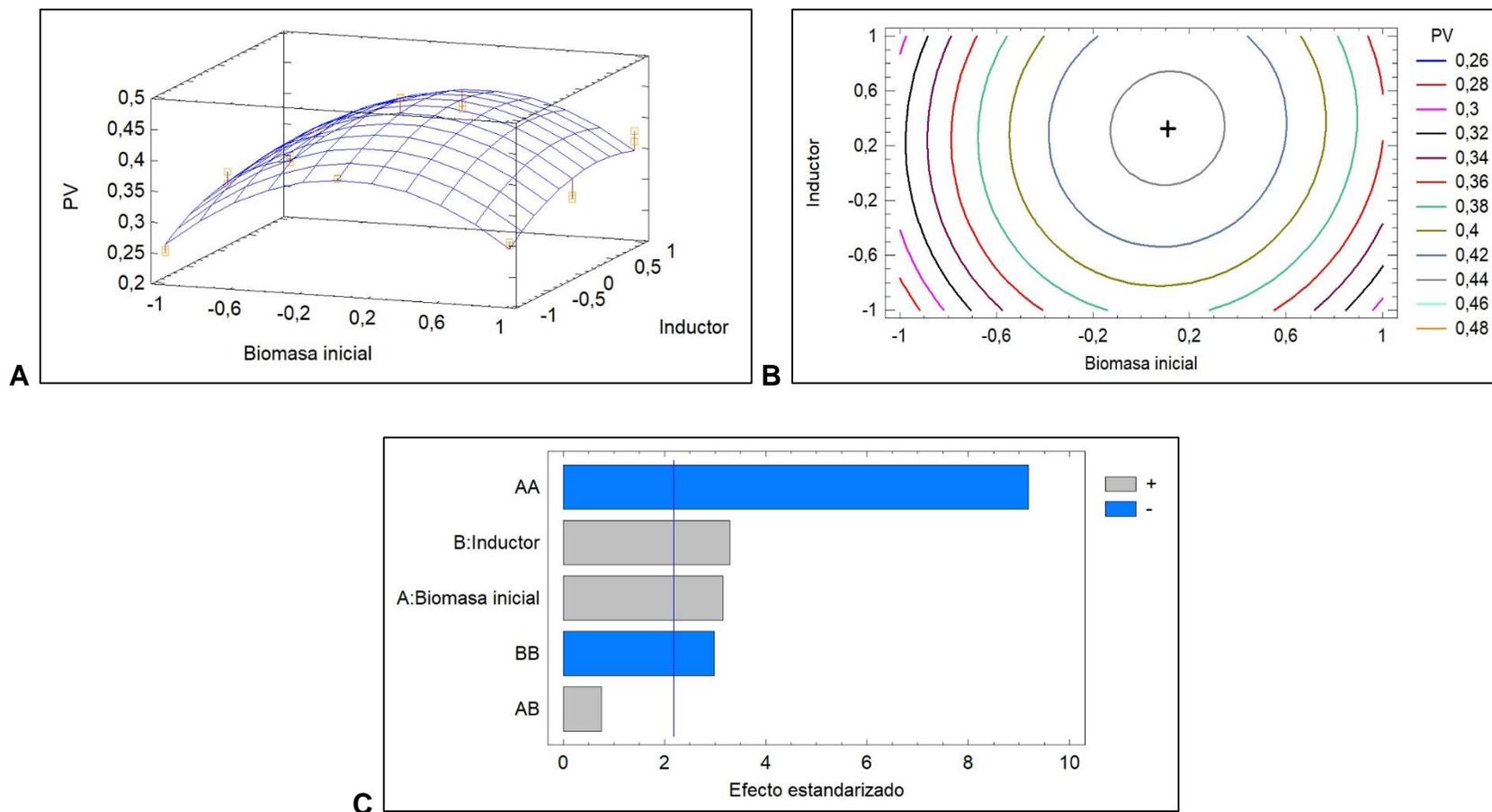


Figura 14. Análisis matemático de la optimización de los valores de biomasa inicial en inductor para incrementar la productividad volumétrica durante el crecimiento y producción de ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v) incubado durante 96 h en agitación orbital a 130 r.min⁻¹ y 30 °C.

A) Superficie de respuesta estimada en función de la concentración de biomasa inicial e inductor calculada. Los puntos representan el resultado primario experimental y las barras la distancia hasta la superficie de respuesta estimada. **B)** Transformación canónica de la superficie de respuesta del proceso de optimización. **C)** Diagrama de Pareto para el análisis de la significancia estadística de los factores para una probabilidad de 90 %.

Tabla 15. Concentraciones óptimas de biomasa inicial e inductor para incrementar la productividad volumétrica en el cultivo de *P. aeruginosa* Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v) incubado durante 96 h en agitación orbital a 130 r.min⁻¹ y 30 °C.

Factor	Bajo	Alto	Productividad volumétrica: 0.446 g.l ⁻¹ .h ⁻¹	
			(óptimo)	(factores)
[X ₀]	1,0 (-1)	3,0 (1)	0,108	2,1 g.L ⁻¹
[Ind]	0,0 (-1)	2,0 (1)	0,253	1,25 %

[X₀]: concentración de biomasa inicial; [Ind]: concentración inicial de inductor

4.5.3. Determinación del tiempo de cultivo óptimo en incubadora con agitación orbital

La **Figura 15** muestra el crecimiento y la producción de ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A con 1,25 % de inductor y biomasa inicial de 2,1 g.L⁻¹. La fase de crecimiento de aceleración positiva se manifestó en las primeras 10 h, después inició la fase de crecimiento exponencial que duró hasta 60 h. Entre las 36 y 48 h se manifestó un ligero cambio en la velocidad específica de crecimiento, menos marcado que el observado en el cultivo de cinética básica mostrado previamente (**Figura 13**).

La producción de ramnolípidos fue baja en el periodo de 0-24 h, posteriormente la producción aumentó de forma exponencial, con mayor velocidad de producción en el periodo 48-72 h. La productividad volumétrica fue calculada cada 12 h, los valores se muestran en la **Tabla 16**. Los mayores valores de productividad volumétrica se alcanzaron a las 60 y 72 h, y no existieron diferencias significativas entre estos, por lo que se seleccionó 60 h como el tiempo de cultivo para el diseño de la estrategia.

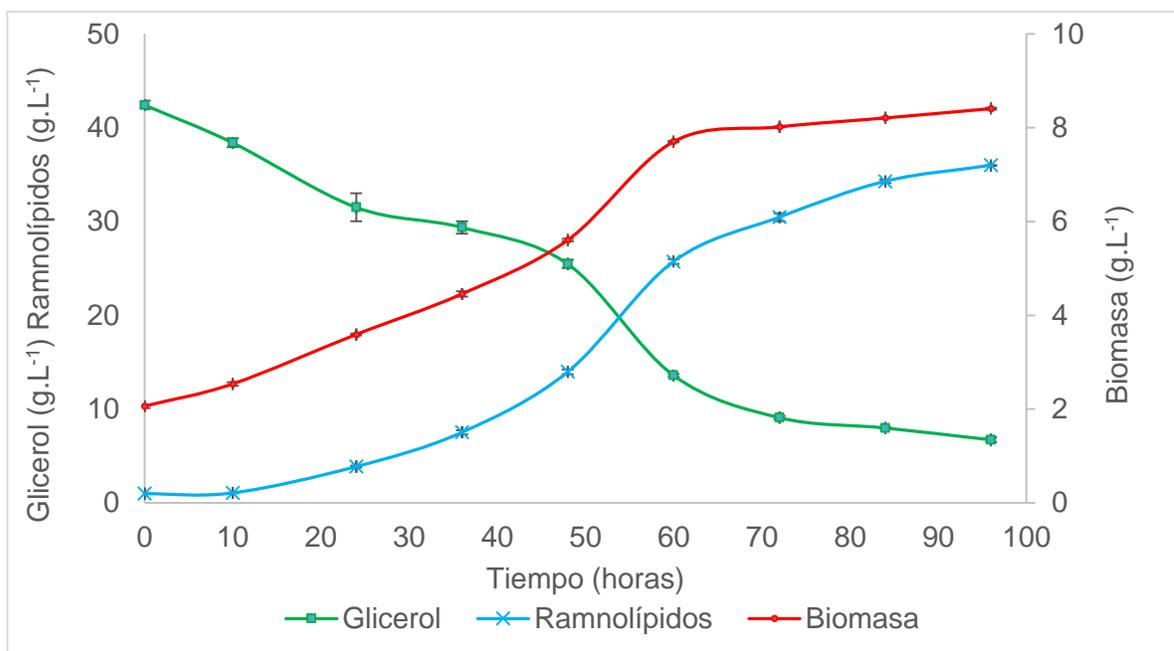


Figura 15. Cinética de crecimiento y de producción de ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol 4 %, utilizando una biomasa inicial de 2,1 g.L⁻¹ y el inductor a 1,25 %.

Tabla 16. Valores de productividad volumétrica calculados por intervalos de tiempo en el cultivo de *P. aeruginosa* Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol 4 %, biomasa inicial de 2,1 g.L⁻¹ e inductor al 1,25 %, incubado durante 96 h en agitación orbital a 130 r.min⁻¹ y 30 °C.

Tiempo (h)	Productividad volumétrica (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
10	0,009 ^g ±0,004
24	0,121 ^f ±0,005
36	0,182 ^e ±0,008
48	0,271 ^d ±0,007
60	0,413 ^c ±0,005
72	0,410 ^a ±0,007
84	0,396 ^b ±0,003
96	0,365 ^c ±0,001

Se presenta el valor medio y la desviación estándar para n=3. Valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según el método LSD de Fisher

4.5.4. Evaluación del número de ciclos para incrementar la productividad volumétrica en incubadora con agitación orbital

La producción de ramnolípidos y el crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* Y3-B1A durante el cultivo con concentración inicial de biomasa de 2,1 g.L⁻¹ e inductor de 1,25 % durante cinco ciclos se muestra en la **Figura 16**. La acumulación de biomasa y ramnolípidos aumentó en cada ciclo con respecto al anterior. No hubo diferencias significativas entre los valores de productividad volumétrica de los dos primeros ciclos (**Tabla 17**). El resto de los valores mostraron diferencias significativas entre ellos, en el cuarto ciclo se manifestó el mayor valor. Al concluir el cuarto ciclo se acumuló una producción de 145,44 g.L⁻¹ de ramnolípidos para una productividad volumétrica del proceso de 0,606 g.L⁻¹.h⁻¹.

La **Figura 17** resume la estrategia diseñada para incrementar la productividad volumétrica de ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A en cultivo agitado en erlenmeyers. La productividad volumétrica se incrementó en 2,34 veces al concluir el cuarto ciclo del cultivo con respecto a la cinética básica establecida como punto de partida (**Figura 18**).

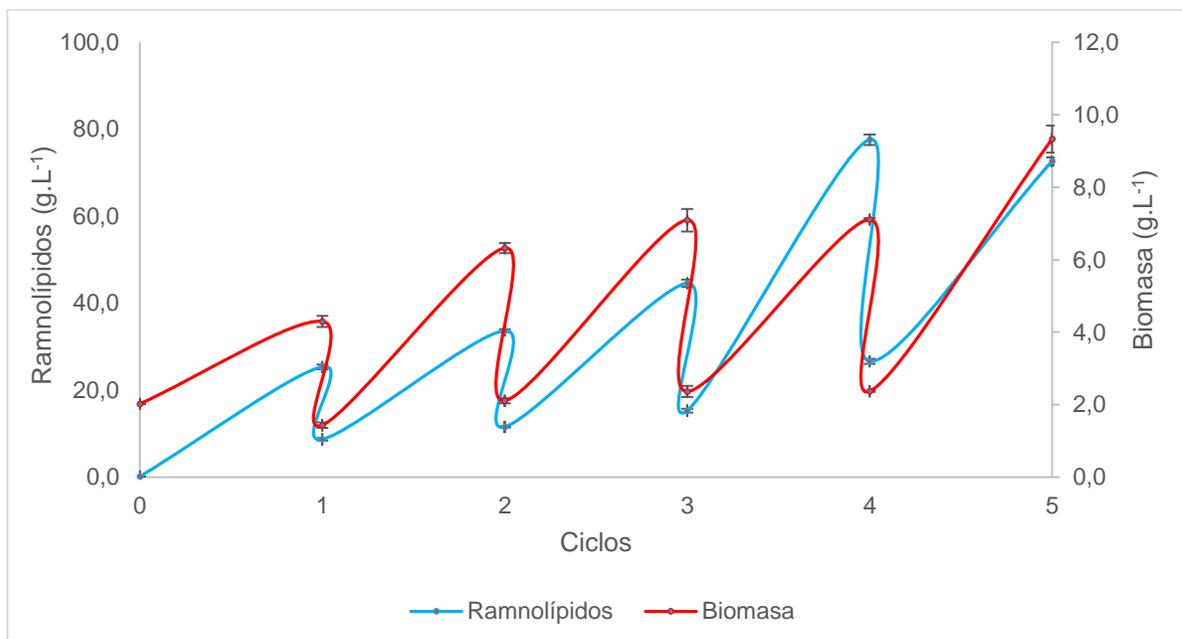


Figura 16. Cinética de crecimiento y de producción de ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v), biomasa inicial de 2,1 g.L⁻¹ e inductor 1,25 %, cinco ciclos de cultivo de 60 horas.

Tabla 17. Valores de productividad volumétrica en el proceso de crecimiento de *P. aeruginosa* Y3-B1A y de producción de ramnolípidos en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v), biomasa inicial de 2,1 g.L⁻¹ e inductor 1,25 %, cinco ciclos de cultivo de 60 horas.

No de ciclo	Productividad volumétrica (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
1	0,420 ^d ±0,003
2	0,416 ^d ±0,012
3	0,550 ^c ±0,011
4	1,038 ^a ±0,011
5	0,766 ^b ±0,006

Se presenta el valor medio y la desviación estándar para n=3. Valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según el método LSD de Fisher.

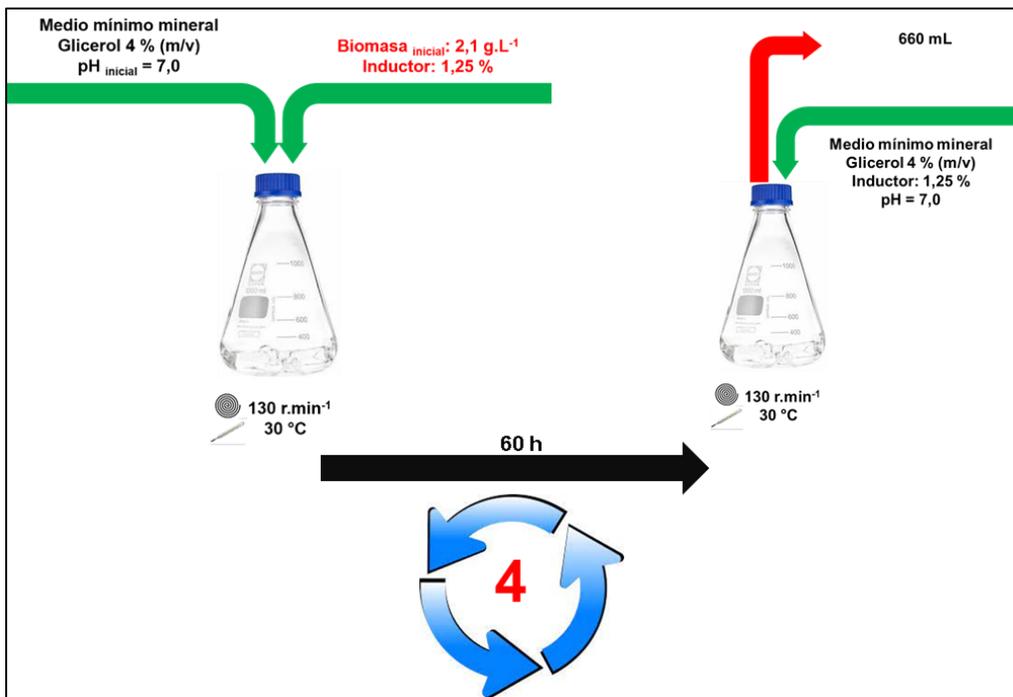


Figura 17. Estrategia diseñada para incrementar la productividad volumétrica de ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A en cultivo agitado en erlenmeyers.

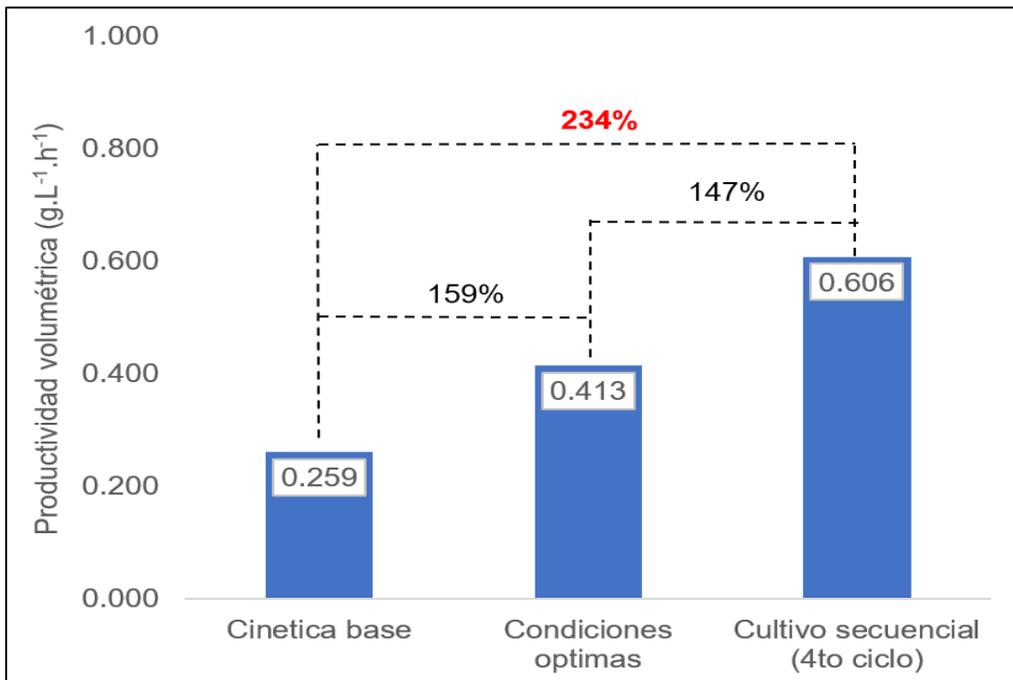


Figura 18. Incremento de productividad volumétrica de ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A durante el cultivo agitado en erlenmeyers.

4.5.5. Cinética de crecimiento y producción de ramnolípidos en reactor

P. aeruginosa Y3-B1A se cultivó en un reactor Biostat B-MO, con 1 L de volumen efectivo con las concentraciones de biomasa inicial e inductor previamente establecidas en los experimentos anteriores (2,1 g.L⁻¹ y 1,25 %, respectivamente). La inyección de aire enriquecido con oxígeno y el tiempo influyen en la producción de ramnolípidos (**Figura 19**). Se apreció que hasta las 40 h el crecimiento microbiano y la producción de ramnolípidos fueron semejantes en ambos casos (con y sin aire enriquecido con oxígeno).

Al igual que en los cultivos realizados en zaranda, en el periodo de 24 a 36 h la velocidad específica de crecimiento sufrió variaciones, aun cuando la cepa se mantuvo creciendo de forma exponencial. Después de las 40 h la producción de ramnolípidos fue exponencial con una mayor pendiente en el cultivo enriquecido con oxígeno puro. En este último la biomasa final fue 1,14 veces mayor que en el que no se inyectó oxígeno puro; mientras la productividad volumétrica creció 1,56 veces.

La superficie de respuesta obtenida, su transformación canónica y la significancia de cada efecto se muestran en la **Figura 20 A, B y C**, respectivamente. La inyección de oxígeno puro y el tiempo (factores principales de primer orden) influyen de forma significativa y positiva en la productividad volumétrica. En otro sentido, el efecto cuadrático del tiempo tiene un efecto negativo significativo (**Figura 20 C**). Este resultado indica la existencia de un óptimo tiempo donde la productividad volumétrica se hace máxima. Para determinar ese punto se planteó el siguiente modelo:

$$PV = 0,7985 + 0,256625*t + 0,11775*IO - 0,359375*t^2 + 0,069125*T*IO$$

Donde t es tiempo, IO: inyección de oxígeno puro

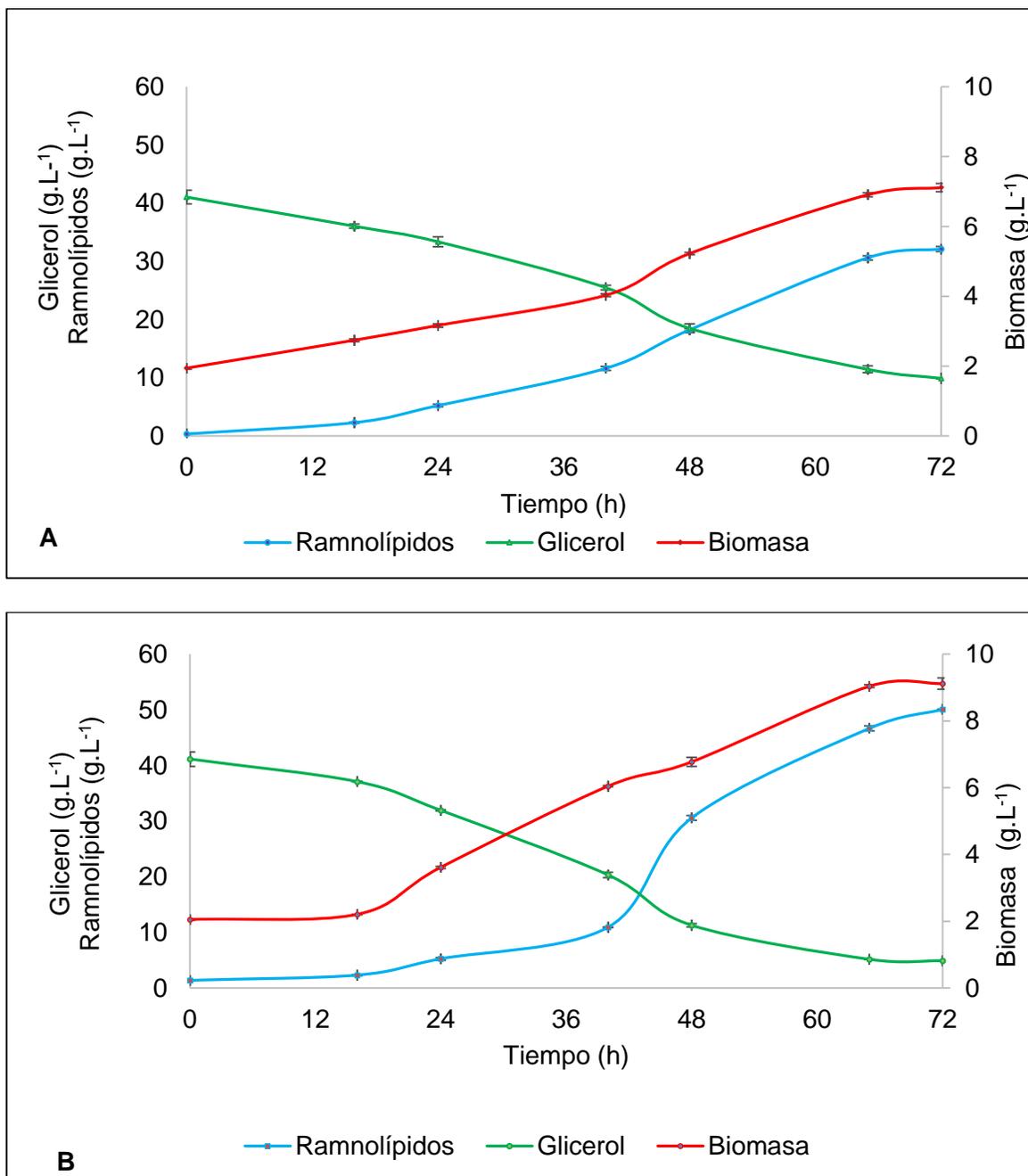


Figura 19. Cinética de crecimiento y de producción de ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v), biomasa inicial de 2,1 g.L⁻¹ e inductor 1,25 % y agitación de 130 r.min⁻¹ en reactor Biostat B-MO. A) con inyección de aire B) con inyección de aire enriquecido con O₂.

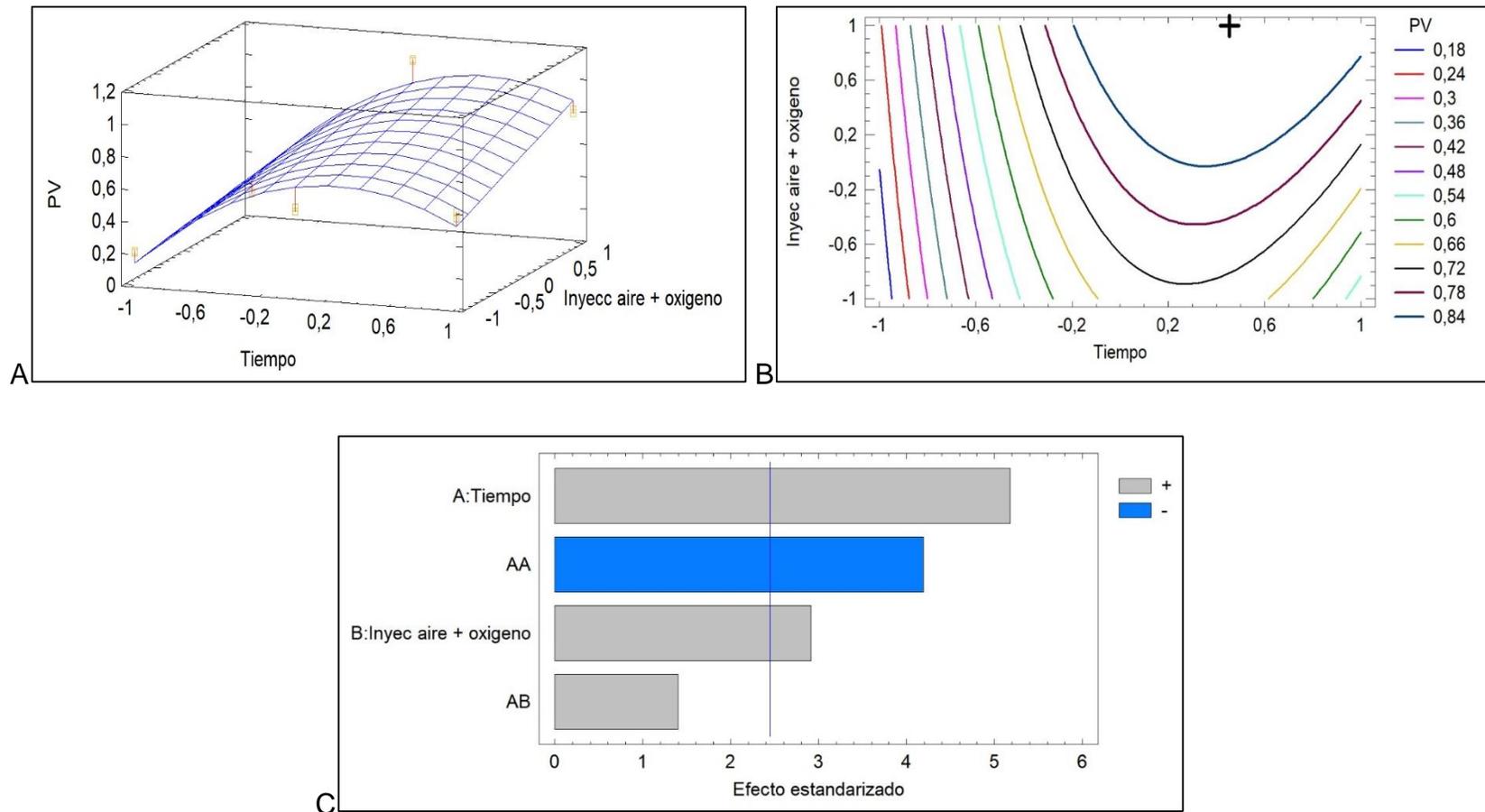


Figura 20. Análisis matemático de la optimización del tiempo y determinación del efecto de la inyección de oxígeno puro para incrementar la productividad volumétrica de ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v), biomasa inicial de 2,1 g.L⁻¹ e inductor 1,25 % y agitación de 130 r.min⁻¹ en reactor Biostat B-MO.
A) Superficie de respuesta estimada en función del tiempo calculado y el efecto de la inyección de oxígeno. Los puntos representan el resultado primario experimental y las barras la distancia hasta la superficie de respuesta estimada. **B)** Transformación canónica de la superficie de respuesta del proceso de optimización. **C)** Diagrama de Pareto para el análisis de la significancia estadística de los factores para una probabilidad de 90 %.

A partir de esta ecuación se obtuvieron las superficies de respuesta y de contorno (**Figura 20 A y B**, respectivamente). Se calculó el tiempo óptimo mediante la función de superficie de respuesta, para obtener el mayor valor de productividad volumétrica, el cual fue de 58,8 h (**Tabla 18**). El tiempo óptimo determinado en el estudio en erlenmeyers en incubadora con agitación orbital es similar. Se incluyó en la estrategia el tiempo de cultivo de 60 h, el cual se encuentra en el rango óptimo determinado (**Figura 20 B**).

Tabla 18. Valores óptimos de tiempo y empleo de oxígeno para incrementar la productividad volumétrica calculada durante el crecimiento y la producción de ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v), biomasa inicial de 2,1 g.L⁻¹ e inductor 1,25 % y agitación de 130 r.min⁻¹ en reactor Biostat B-MO.

Factor	Bajo	Alto	Productividad volumétrica: 0,654 g.L ⁻¹ .h ⁻¹	
			(óptimo calculado)	(concentración de factores)
Tiempo	24 (-1)	72 (1)	0,453	58,8
Inyección de aire + O ₂	No (-1)	Si (1)	1,0	Si

4.5.6. Determinación del número de ciclos para la producción de ramnolípidos en reactor

En la **Figura 21** se muestra el comportamiento del crecimiento y de la producción de ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A durante cinco ciclos de cultivo de 60 h en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v), inyección de aire enriquecido con oxígeno, biomasa inicial de 2,1 g.L⁻¹, inductor 1,25 % y agitación 130 r.min⁻¹ en reactor Biostat B-MO. La acumulación de biomasa y ramnolípidos incrementó de un ciclo a otro. La productividad volumétrica incrementó del primer al cuarto ciclo, con diferencias

significativas entre un ciclo y otro. (**Tabla 19**). En el cuarto ciclo la cepa produjo $64,72 \text{ g.L}^{-1}$ ($\text{PV} = 1,079 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). La concentración de ramnolípidos al finalizar el cuarto ciclo de cultivo fue de $180,78 \text{ g.L}^{-1}$ con una productividad volumétrica de $0,753 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Con la estrategia de producción diseñada y evaluada en el reactor Biostat M-O: $2,1 \text{ g.L}^{-1}$ de biomasa inicial, $1,25 \%$ de inductor, cuatro cultivos secuenciales discontinuos, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y 130 rpm^{-1} (**Figura 22**); se obtuvieron $180,78 \text{ g.L}^{-1}$ de ramnolípidos en 240 h. La **Figura 23** muestra el incremento en la productividad volumétrica en el reactor durante el proceso de diseño de la estrategia de cultivo, se puede apreciar que incrementó en 168% respecto al cultivo discontinuo con aire no enriquecido con oxígeno. Si se compara con la productividad volumétrica de partida en la cinética básica establecida en el cultivo agitado en erlenmeyers, el valor casi se triplicó (2,91 veces).

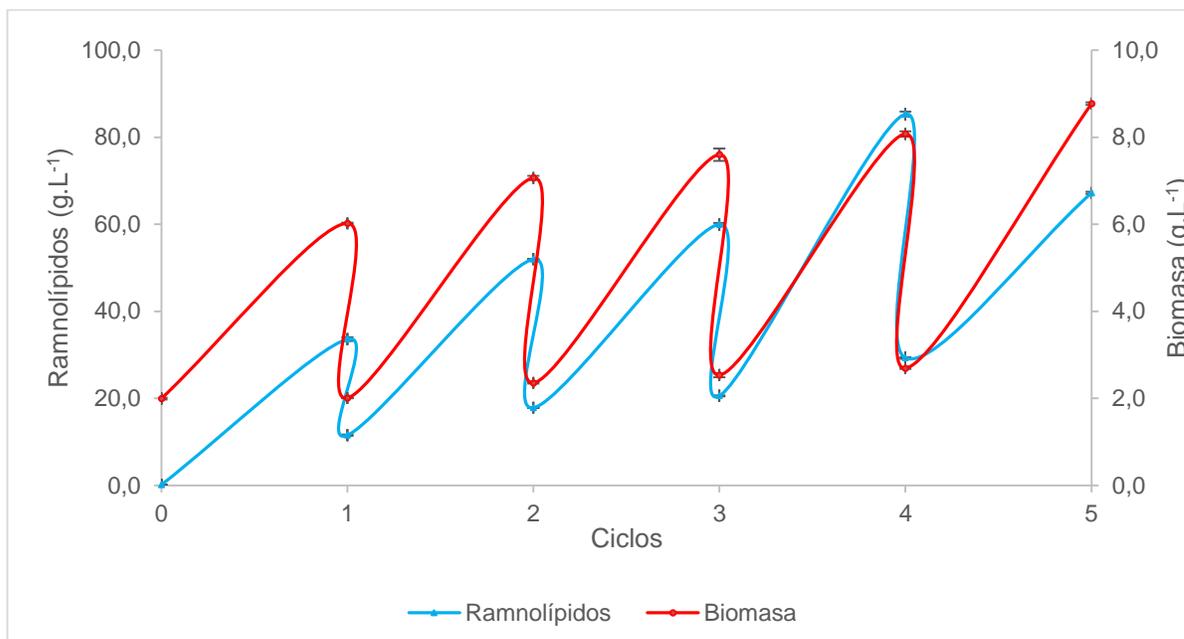


Figura 21. Cinética de crecimiento y producción de ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A durante 5 ciclos de cultivo en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v), inyección de aire enriquecido con oxígeno (15 %, 1 vvm) biomasa inicial de 2,1 g.L⁻¹ e inductor 1,25 %, 130 r.min⁻¹ en reactor Biostat B-MO.

Tabla 19. Influencia del número de ciclos de cultivo en la productividad volumétrica de *P. aeruginosa* Y3-B1A durante 5 ciclos de cultivo en MMM suplementado con glicerol (4 % m/v), inyección de aire enriquecido con oxígeno (15 %, 1 vvm) biomasa inicial de 2,1 g.L⁻¹ e inductor 1,25 %, 130 r.min⁻¹ en reactor Biostat B-MO.

Ciclo No.	Productividad volumétrica (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
1	0,558 ^e ±0,008
2	0,674 ^c ±0,004
3	0,702 ^b ±0,005
4	1,079 ^a ±0,007
5	0,632 ^d ±0,001

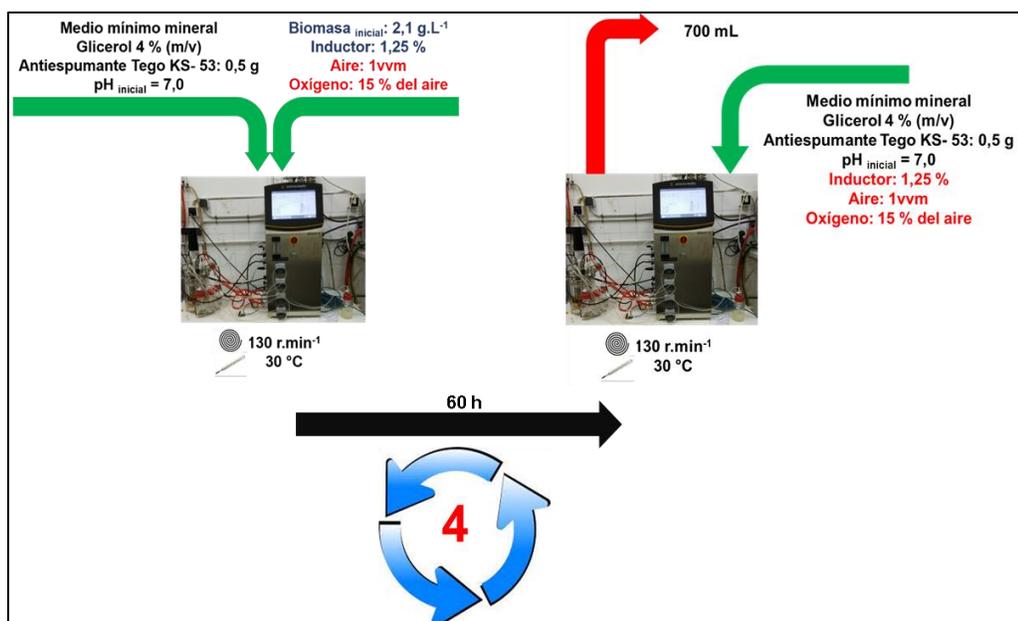


Figura 22. Estrategia diseñada para incrementar la productividad volumétrica de ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A en el reactor Biostat B-MO.

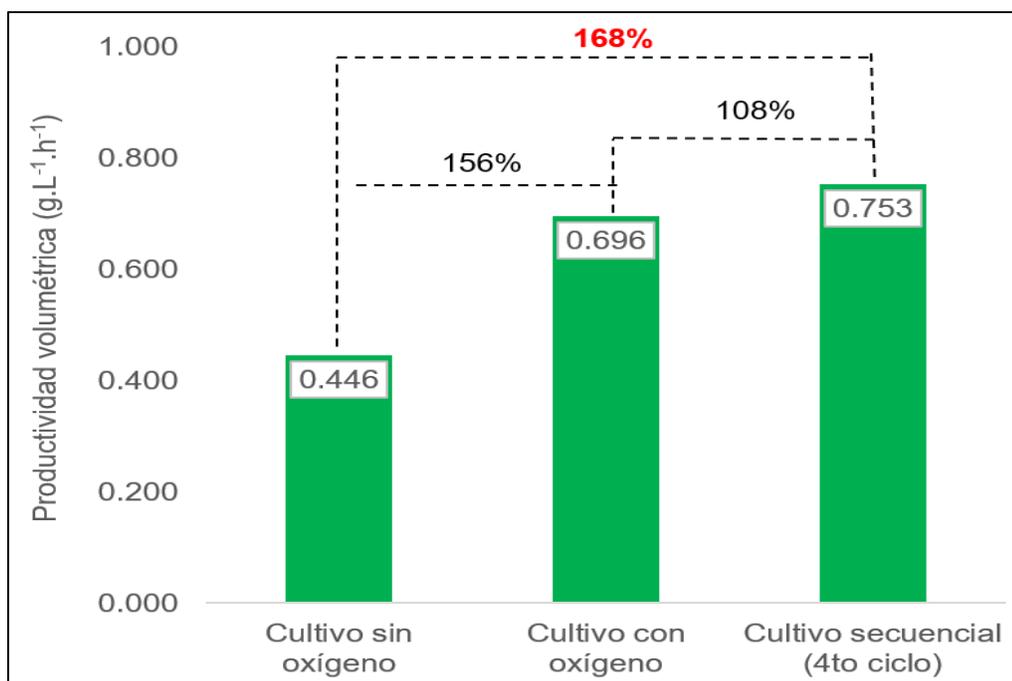


Figura 23. Incremento de la productividad volumétrica durante el diseño de la estrategia en el reactor Biostat B-MO.

4.6. Evaluación de la estabilidad (S) de los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A

La evaluación de la estabilidad de las emulsiones con los diferentes hidrocarburos se realizó a partir del comportamiento del índice de emulsificación en el tiempo (60 días).

4.6.1. Actividad emulsificante (E) con diferentes compuestos hidrofóbicos

En la **Figura 24** se presenta el comportamiento del índice de emulsificación durante los 60 días de evaluación de las emulsiones formadas por los ramnolípidos con petróleo crudo, queroseno y diésel.

A las 24 h todas las emulsiones formadas mostraron valores de $E > 60 \%$ sin diferencias significativas entre sus valores. La emulsión con queroseno fue la más estable (95,1 %) con $E = 60,56 \%$ (**Tabla 20**). A los 14 días la emulsión con petróleo crudo mostró en su índice un decrecimiento respecto al día 1, manteniendo la estabilidad (S) hasta el final del experimento, $E = 58,12 \%$, valor que no mostró diferencias significativas con la actividad emulsificante del queroseno. Con diésel no se observó estabilidad en el tiempo, mostrando una disminución significativa a los 14 días, con valor de $E = 16,18 \%$ y $S = 25,3 \%$.

4.6.2. Efecto de las condiciones ambientales (pH, temperatura y salinidad) en la actividad superficial y emulsificante

La **Figura 25** muestra la variación de los índices de emulsiones (E) durante 60 días en diferentes condiciones de pH, salinidad y temperatura, de la emulsión del crudo de ramnolípidos con queroseno.

La influencia del pH se evaluó en un rango de 4 a 10. En la **Figura 25 A** se puede apreciar que a las 24 h los valores de E estaban en el rango de 58,73 (pH = 4) a

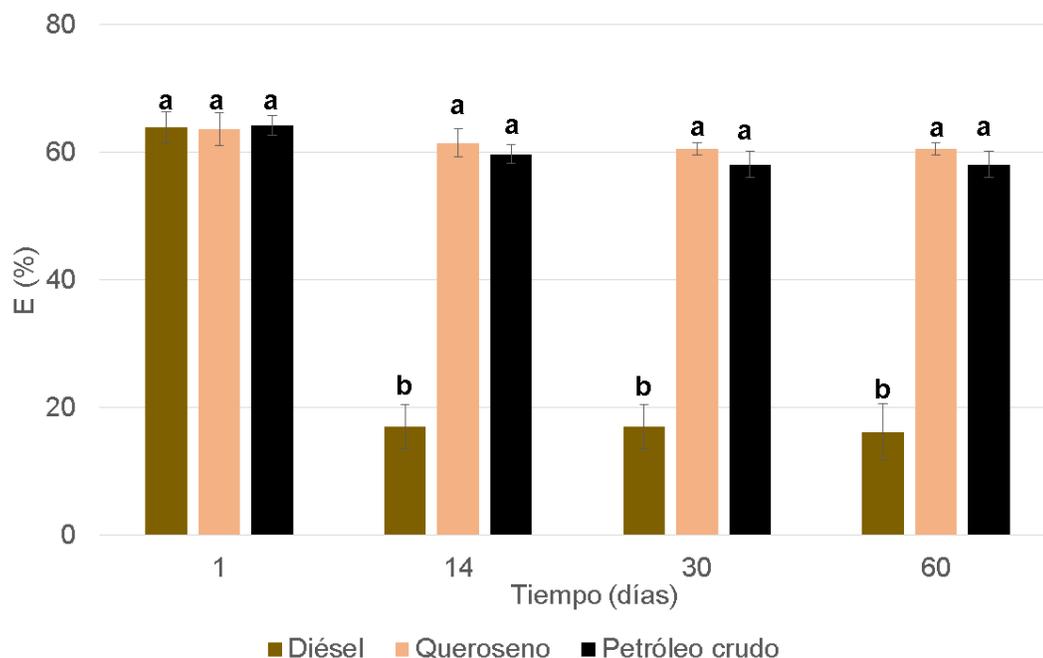


Figura 24. Comportamiento del índice de emulsificación de las emulsiones de ramnolípidos frente a cuatro compuestos hidrófobos de diferente estructura química: diésel, queroseno y petróleo crudo.

Las barras representan la desviación estándar para $n=3$. Valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según el método LSD de Fisher, para el mismo tiempo de incubación.

Tabla 20. Estabilidad de las emulsiones de los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A con diferentes hidrocarburos calculada a los 14 y 60 días de incubación.

Compuesto hidrofóbico	Estabilidad de la emulsión (%)	
	14 días	60 días
Diésel	26,6 ^{c*}	25,3 ^{c*}
Queroseno	96,6 ^{a*}	95,1 ^{a*}
Petróleo crudo	92,9 ^{b*}	90,4 ^{b*}

Se presenta el valor medio y la desviación estándar para $n=3$. Valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según el método LSD de Fisher. Valores de estabilidad con el mismo símbolo no mostraron diferencias significativas entre los 14 y 60 días para la misma condición.

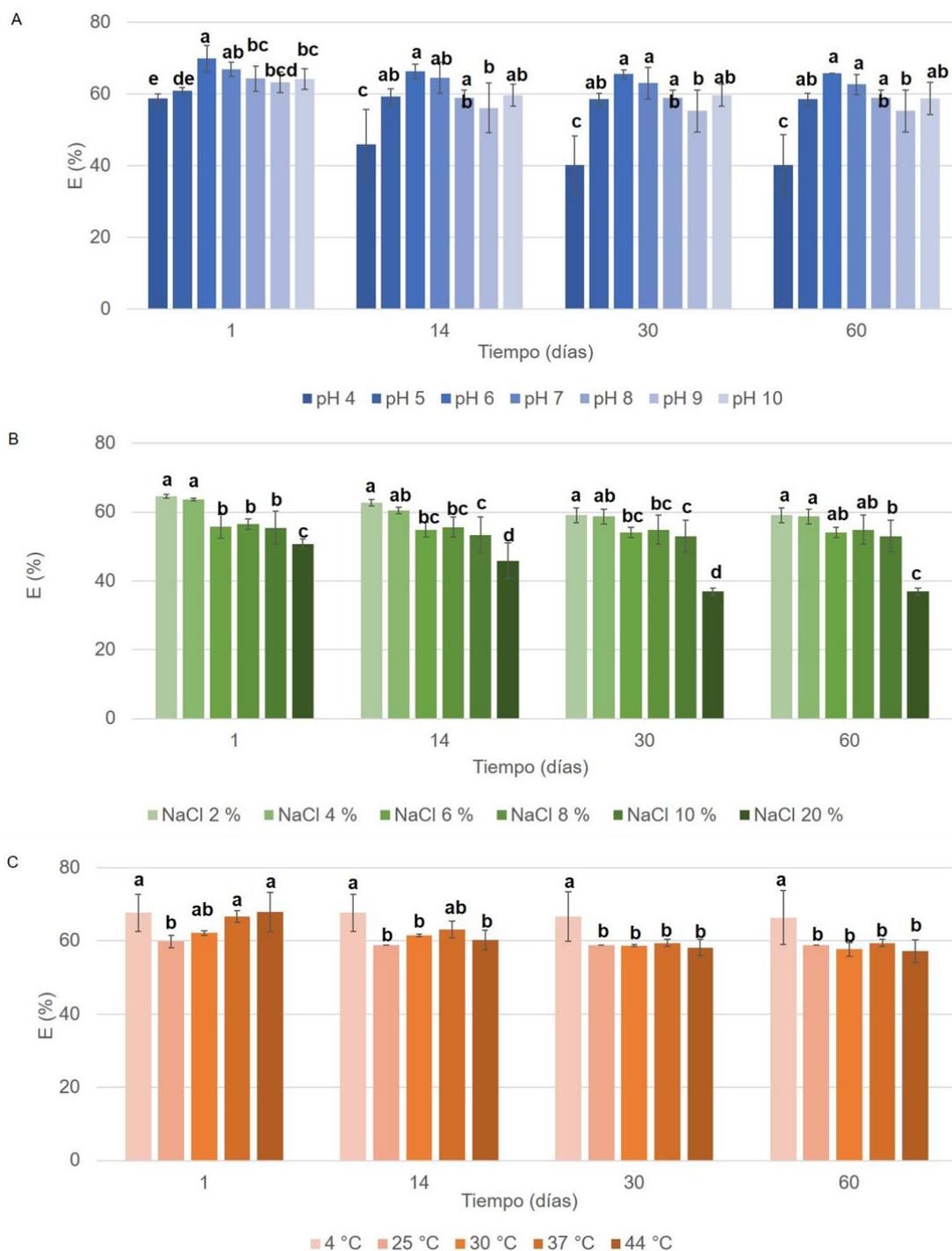


Figura 25. Evaluación de la influencia de A) pH, B) Salinidad, y C) Temperatura, en el índice de emulsificación de las emulsiones formadas por el ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A con queroseno.

Las barras representan la desviación estándar para n=3. Valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según el método LSD de Fisher para el mismo tiempo de incubación

69,94 % (pH = 6). Las emulsiones de pH = 5 a 10 mostraron valores de E > 55 % hasta el final del ensayo sin diferencias significativas ($p > 0,05$). A pH = 4 hubo una disminución significativa en el valor de E a los 14 días ($p = 0,01$), disminución que continuó hasta el 40 % a los 30 días, para mantenerse estable en ese valor hasta los 60 días.

Las emulsiones de pH 5 a 10 mostraron estabilidad, $S \geq 85$ % a los 14 y 60 días, sin diferencias significativas en este parámetro para cada valor de pH (**Tabla 21**). Las emulsiones de pH 5 a 7 fueron las de mayor estabilidad, no mostraron diferencias significativas entre ellas, pero sí con las demás emulsiones. A menor pH (pH = 4) la estabilidad fue menor de 80 % con diferencias significativas entre 14 y 60 días.

El comportamiento del índice emulsificante en función de la variabilidad de la salinidad (basado en el rango de concentración de NaCl de 2 a 20 %) se muestra en la **Figura 25 B**. Los valores de E a las 24 h decrecieron de 64,54 a 50,79 %, a medida que la concentración de NaCl incrementó, evidenciando tres grupos homogéneos ($p = 0,00$). En el primer grupo, con los mayores valores de E, están asociadas las emulsiones con 2 y 4 % de NaCl, en el segundo las de 6 a 10 % de salinidad, y en el tercero, la emulsión a 20 % de NaCl, con el menor valor de E. A partir de los 30 días, los valores de E de las emulsiones de 2 y 4 % de NaCl disminuyeron significativamente, aunque por encima del 55 %. A los 60 días no hubo diferencias significativas entre las emulsiones de 2 a 10 % NaCl (E = 59,11 a 53,04 %). Para la emulsión con una salinidad de 20 % de NaCl, E se redujo a 36,9 %.

La estabilidad (S) a los 14 días de las emulsiones con concentración de NaCl de 2 a 10 % fue superior a 95 % sin diferencias significativas entre los valores (**Tabla 21**). A

los 60 días, las emulsiones con concentración de NaCl de 6 a 10 % mostraron diferencias significativas de estabilidad con sus valores a los 14 días. Para todas las emulsiones, excepto las que tenían 20 % de NaCl, la estabilidad fue superior al 90 % a los 60 días.

También fue evaluado el comportamiento de la emulsificación (E) en función de la temperatura (4 a 44 ° C) durante 60 días (**Figura 25 C**). A las 24 h los valores de E estuvieron en el rango de 60 a 70 % sin diferencias significativas entre las emulsiones incubadas a las temperaturas 4, 30, 37 y 44 °C; mientras que a 25 °C la E = 59,8 %, con diferencias significativas respecto al resto ($p = 0,06$). A los 60 días, solo la emulsión incubada a 4 °C mantuvo valores de $E > 60$ %, mostrando diferencias significativas con el resto ($p = 0,07$), que, aunque menores no disminuyeron de 55 % de emulsificación.

La estabilidad de las emulsiones incubadas de 4 a 30 °C fue mayor de 98 % a los 14 días y no mostraron diferencias significativas entre sus valores (**Tabla 21**). La estabilidad a 37 °C para este mismo tiempo fue de 94,6 % mientras que a 44 °C la estabilidad fue de 88,7 %. A los 60 días todas las emulsiones, excepto las almacenadas a 4 y 25 °C mostraron diferencias significativas con respecto a sus valores a los 14 días. Por su parte a 30 °C, la estabilidad fue de 92 % y para el resto de las temperaturas se mantuvo en el rango de 80 a 90 %.

Tabla 21. Estabilidad de las emulsiones de los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A con queroseno en variadas condiciones ambientales, calculada a los 14 y 60 días.

Condición		Estabilidad de la emulsión (S)	
		14 días	60 días
pH	4	78,4 ^{d*}	68,4 ^{d◇}
	5	97,5 ^{a*}	96,1 ^{a*}
	6	95,0 ^{a*}	94,2 ^{a*}
	7	96,5 ^{a*}	93,7 ^{ab*}
	8	91,7 ^{b*}	91,7 ^{b*}
	9	88,6 ^{c*}	87,3 ^{c*}
	10	92,9 ^{b*}	91,6 ^{b*}
NaCl (%)	2	97,2 ^{a*}	91,6 ^{c◇}
	4	95,2 ^{a*}	92,3 ^{bc◇}
	6	98,4 ^{a*}	96,8 ^{a*}
	8	98,6 ^{a*}	97,2 ^{a*}
	10	96,2 ^{a*}	95,6 ^{ab*}
	20	90,3 ^{b*}	72,7 ^{d◇}
T (°C)	4	100,0 ^{a*}	98,1 ^{a*}
	25	98,4 ^{ab*}	98,4 ^{a*}
	30	99,1 ^{a*}	92,9 ^{b◇}
	37	94,6 ^{b*}	89,1 ^{c◇}
	44	88,7 ^{c*}	84,1 ^{d*}

Se presenta el valor medio y la desviación estándar para n=3. Valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según el método LSD de Fisher. Valores de estabilidad con el mismo símbolo no mostraron diferencias significativas entre los 14 y 60 días para la misma condición.

Las condiciones ambientales evaluadas (pH, salinidad y temperatura) no afectaron el comportamiento de la tensión superficial. Los valores se comportaron en el rango de 26,81 a 29,60 mN.m⁻¹ sin diferencias significativas.

4.6.3. Influencia de la esterilización en la estabilidad de la emulsión

La tensión superficial del crudo de ramnolípidos posterior al proceso de esterilización fue de 29,06 mN.m⁻¹, este valor no fue significativamente diferente al medido en las temperaturas evaluadas, ($p < 0,05$). La estabilidad de las emulsiones formadas con el crudo de ramnolípidos estéril se estudió a temperaturas de almacenamiento de 30 y 37 °C durante 14 y 60 días.

La **Figura 26** muestra la actividad emulsificante del crudo de ramnolípidos estéril y sin esterilizar, con queroseno y almacenada a 30 y 37 °C. A las 24 h los valores del índice de emulsificación fueron 73,4 y 70,3 % a 30 y 37 °C, respectivamente. Estos valores no mostraron diferencias significativas entre ellos ($p = 0,48$). Ambos valores de estabilidad fueron mayores de 92 % y mostraron diferencias significativas entre los 14 y 60 días (**Tabla 22**). La estabilidad de la emulsión de los ramnolípidos esterilizados y almacenados posteriormente a 37 °C no varió significativamente entre los 14 y 60 días; este comportamiento es semejante al de la emulsión con ramnolípidos no esterilizados y almacenados a la misma temperatura.

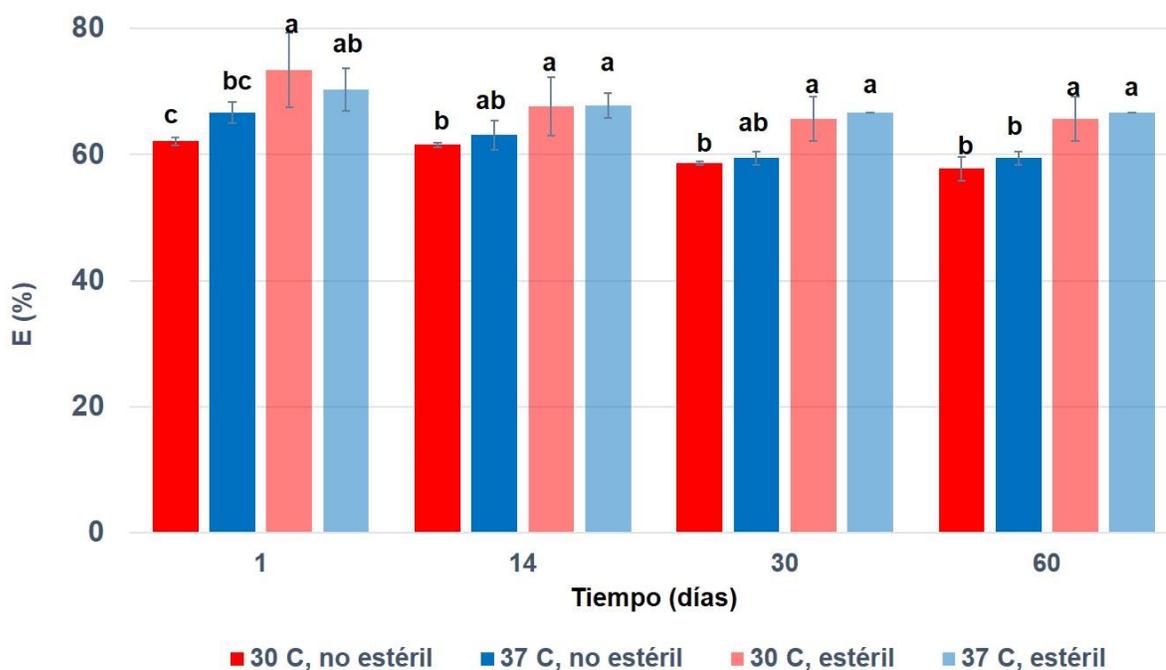


Figura 26. Estabilidad de las emulsiones de los ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A, esterilizado con calor húmedo (121°C, 15 min).

Las barras representan la desviación estándar para n=3. Se presenta el valor medio. Valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según el método LSD de Fisher para el mismo tiempo de incubación

Tabla 22. Estabilidad de las emulsiones de del crudo de ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A y previamente esterilizado con queroseno, calculada a los 14 y 60 días.

Condición	Estabilidad de la emulsión (S)		
	(%)		
	14 días	60 días	
Crudo de ramnolípidos esterilizado (121 °C, 15 min) y almacenado a	30°C	92,2 ^{b*}	89,4 ^{b◇}
	37°C	96,4 ^{a*}	94,8 ^{a*}

Se presenta el valor medio y la desviación estándar para n=3. Valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según el método LSD de Fisher. Valores de estabilidad con el mismo símbolo no mostraron diferencias significativas entre los 14 y 60 días para la misma condición.

4.7. Aplicaciones del crudo de ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A en la industria petrolera

4.7.1. Remoción de vanadio

De acuerdo con los resultados mostrados en la **Tabla 23**, todos los valores de eficiencia de remoción fueron superiores al 50 %, duplicando los resultados obtenidos con el control (sin adición de ramnolípidos). Los mayores valores se obtuvieron a concentraciones superiores a la CMC, alcanzando el máximo de 85,52 % con una concentración de ramnolípidos equivalente a 2,0 x CMC (240 mg.L⁻¹). Este valor tuvo diferencias significativas con los obtenidos al resto de las concentraciones.

Tabla 23. Eficiencia de la remoción de vanadio de los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A.

Ramnolípidos		Eficiencia de remoción de Vanadio (%)
CMC	mg.L ⁻¹	
0 (control)	0	21,41 ^d ±0,90
0,6	72,00	61,69 ^c ±3,74
0,8	96,00	56,45 ^c ±6,57
1,2	144,00	76,43 ^b ±2,59
1,6	192,00	74,76 ^b ±5,51
2,0	240,00	85,52^a±4,31

Se presenta el valor medio y la desviación estándar para n=3. Valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según el método LSD de Fisher.

4.7.2. Degradación de crudo

La evaluación de la degradación de crudo empleando ramnolípidos como bioestimulador se realizó a tres escalas diferentes: laboratorio (medio líquido), microcosmos (suelos) y campo (parcelas de suelo). Se aplicó la bioaumentación con microorganismos como control de comparación de la efectividad del proceso.

4.7.2.1. Laboratorio

A partir de los cromatogramas (**Figura 27**) obtenidos a los 28 días se determinaron los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) y se calculó el porcentaje de degradación. Se observó variación de intensidad de los diferentes picos en los tratamientos aplicados respecto al control abiótico. Los resultados mostrados en la **Tabla 24** confirman que la adición de ramnolípidos incrementa la biodegradación de hidrocarburos. En ausencia de ramnolípidos (CM) la degradación fue solo de 29,9 %, mientras que con la adición de estos (CM+RL) se alcanzó un valor de 78,0 %. Este representa un incremento del 61,7 % de la degradación. (**Tabla 24**).

4.7.2.2. Microcosmos

Como puede apreciarse en la **Figura 28**, a los 30 días de tratamiento se observó crecimiento de la población de microorganismos totales. Al concluir el ensayo la población degradadora se incrementó en los tres tratamientos: bioaumentación (BA), bioestimulación con ramnolípidos (BE) y la combinación de los dos (BA+BE), siendo más evidente el incremento en la bioestimulación ($9,7 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ de suelo) y la bioaumentación ($2,0 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ de suelo). La población microbiana degradadora de hidrocarburos representó más del 90 % de la población heterótrofa cultivable.

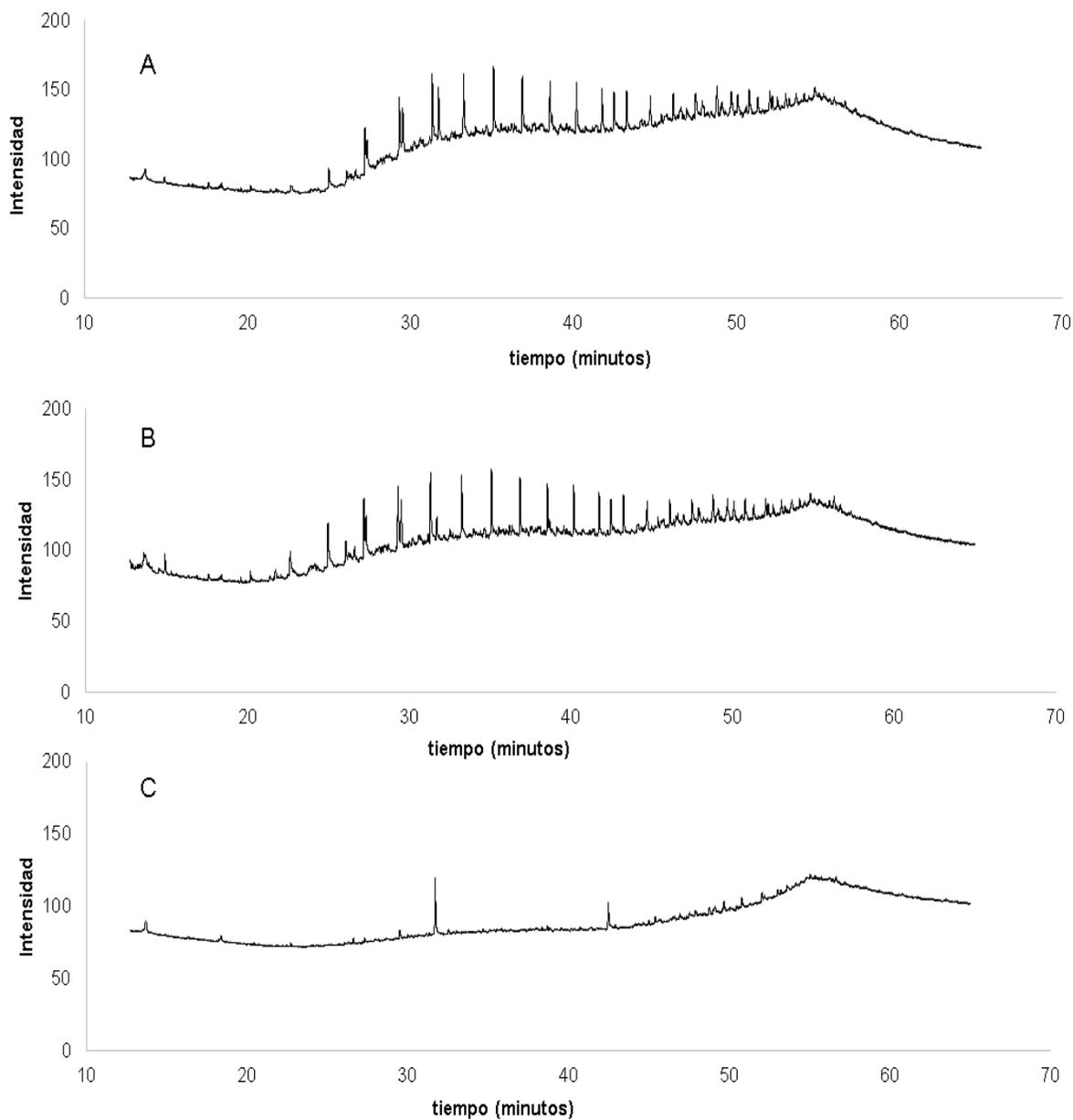


Figura 27. Biodegradación de hidrocarburos utilizando ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A a los 28 días de cultivo: (A) control, (B) cultivo mixto (CM), (C) cultivo mixto + ramnolípidos (CM+RL).

Tabla 24. Efecto de la adición de los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A en la biodegradación de crudo. Las células se cultivaron en MMM suplementado con crudo (1 % m/v).

Condición de cultivo	Biodegradación (%)	Incremento de la biodegradación (%)
Cultivo mixto (CM)	29,9 ^b ± 7,0	--
Cultivo mixto + RL (CM+RL)	78,0 ^a ± 7,5	61,7 ± 3,9

Se presenta el valor medio y la desviación estándar para n=3. Valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según el método LSD de Fisher.

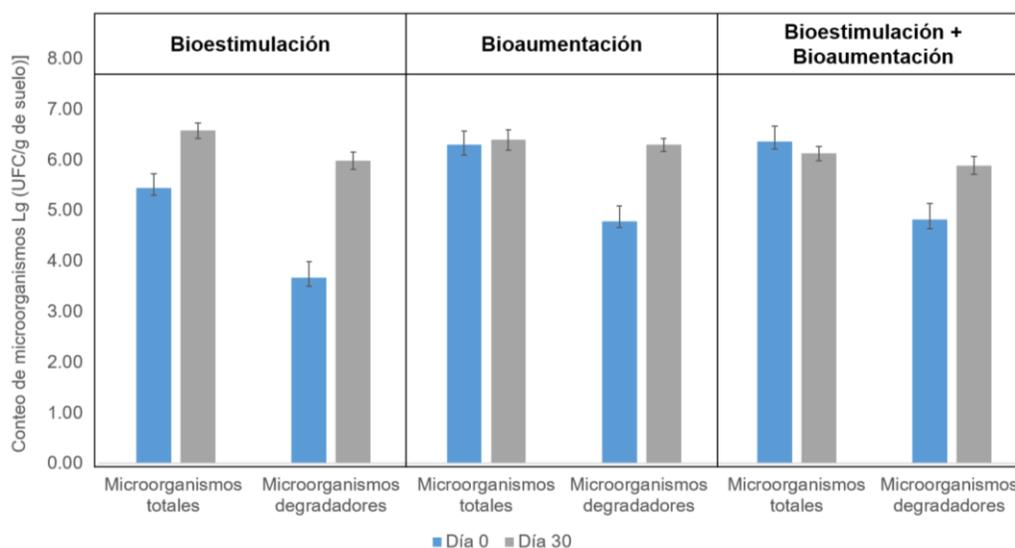


Figura 28. Conteo de microorganismos en el proceso de biorremediación en microcosmos.

Las barras representan la desviación estándar calculada para n = 3.

El consumo de nitrógeno y fósforo estuvo en correspondencia con el crecimiento (**Tabla 25**). El mayor el consumo de estos nutrientes se observó en la bioestimulación: N > 90 % y P > 55 %, siendo este tratamiento el que mayor incremento de población mostró. En el caso de la BA y la combinación de los tratamientos (BA+BE), los consumos de estos nutrientes esenciales no superaron el 80 y 50 % respectivamente para nitrógeno y fósforo.

El porcentaje de degradación se calculó a partir de los valores de HTP, grasas y aceites (GA) y de las fracciones de hidrocarburos (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos) determinados a los 0 y 30 días (**Tabla 26**). Los porcentajes de degradación de GA, resinas y asfaltenos fueron inferiores al 20 % sin diferencias significativas entre los tres tratamientos, excepto para los asfaltenos. No obstante, con la aplicación de ramnolípidos (BE) se obtuvieron los mayores valores los porcentajes de degradación de HTP (55,2 %), saturados (35,2 %) y aromáticos (73,7 %), siendo significativamente diferente este resultado respecto a los otros dos tratamientos aplicados (BA y BA+BE). Considerando los resultados de biodegradación obtenidos con la bioestimulación con ramnolípidos (BE), se calcularon las tasas de incremento de la degradación para HTP y las fracciones de saturados y aromáticos respecto a los otros dos tratamientos (BA y BA+BE). En la **Tabla 27** se observa que las tasas de incremento de la degradación con BE están entre 36 y 53 %.

Tabla 25. Contenido de nitrógeno y fósforo del suelo en el ensayo de microcosmos durante la biodegradación de hidrocarburos.

Tratamiento	Nitrógeno (mg.kg ⁻¹)		Fósforo (mg.kg ⁻¹)	
	Día 0	Día 30	Día 0	Día 30
Bioestimulación	24,52 ± 0,07	1,83 ± 0,03	7,10 ± 0,50	3,08 ± 0,19
Bioaumentación	24,52 ± 0,07	6,82 ± 0,07	7,10 ± 0,50	3,86 ± 0,40
Bioestimulación + bioaumentación	24,52 ± 0,07	5,21 ± 0,06	7,10 ± 0,50	4,30 ± 0,62

Tabla 26. Biodegradación de hidrocarburos en microcosmos a los 30 días de tratamiento.

Tratamiento	HTP	G y A	Saturados	Aromáticos	Resinas	Asfaltenos
	Biodegradación (%)					
Bioestimulación	55,2 ^a ± 1,5	3,3 ^a ± 0,3	35,2 ^a ± 2,2	73,7 ^a ± 3,3	5,8 ^a ± 1,1	1,54 ^b ± 1,7
Bioaumentación	30,3 ^b ± 0,1	4,4 ^a ± 0,1	16,5 ^b ± 0,3	43,1 ^c ± 1,2	7,2 ^a ± 1,6	18,0 ^a ± 3,5
Bioestimulación + bioaumentación	33,9 ^b ± 0,3	4,1 ^a ± 0,1	19,5 ^b ± 1,4	47,1 ^b ± 1,9	1,4 ^a ± 0,9	1,2 ^b ± 1,8

Se presenta el valor medio y la desviación estándar para n=3. Valores que no comparten letra son significativamente diferentes (p < 0,05), según el método LSD de Fisher. HTP: hidrocarburos totales del petróleo; GA: grasas y aceites

Tabla 27. Influencia de los ramnolípidos en la biodegradación de hidrocarburos en microcosmos.

Tratamiento	Tasa de incremento de la degradación respecto a la bioaumentación (%)			Tasa de incremento de la degradación respecto a la bioestimulación + bioaumentación (%)		
	HTP	Saturados	Aromáticos	HTP	Saturados	Aromáticos
Bioestimulación	45,2 ± 1,7	53,3 ± 7,9	41,6 ± 1,3	38,7 ± 0,1	44,7 ± 0,1	36,1 ± 0,2

HTP: hidrocarburos totales del petróleo

4.7.2.3. Parcelas

Para evaluar la efectividad de la bioestimulación a través de la adición de ramnolípidos a escala de campo se determinó el crecimiento microbiano (**Figura 29**), los contenidos de nitrógeno y fósforo del suelo (**Tabla 28**) y los porcentajes de degradación de hidrocarburos (**Tabla 29**). También se evaluó la toxicidad de la introducción de ramnolípidos y microorganismos exógenos (cultivo mixto CM) en el ecosistema impactado.

A los 30 días, de aplicada la bioaumentación, se mantuvo el equilibrio en el crecimiento de la población total (igual orden decimal), mientras que en las parcelas con bioestimulación (BE) sí hubo incremento de esta población (un orden decimal). En ambos tratamientos aumentó la población degradadora, y se estimó que esta representaba del 80 al 87,5 % de la población cultivable.

El consumo de nitrógeno fue similar (55 %) en las parcelas con los dos tratamientos. En las parcelas donde se aplicó la bioaumentación se consumió el 15 % del fósforo inicial, consumo que es superior a las parcelas con bioestimulación (**Tabla 28**).

La **Tabla 29** muestra los porcentajes de degradación de hidrocarburos. Los porcentajes de biodegradación aplicando ramnolípidos fueron más bajos que los obtenidos en los microcosmos, a excepción de las grasas y aceites (37,1 %).

El comportamiento de la degradación de la fracción saturada del crudo tanto con bioaumentación como con bioestimulación a escala de campo no mostró cambios significativos. La aplicación de ramnolípidos (BE) favoreció los mayores porcentajes de degradación de HTP (36,7 %) y aromáticos (63,7 %) y en el caso de las fracciones resinas y asfaltenos, los porcentajes de biodegradación por bioestimulación fueron

más bajas que con bioaumentación, no superando el 30 %. El incremento en la degradación de GA fue de 86,51 %, mientras que para HTP y aromáticos fue de valores cercanos al 34 % (**Tabla 30**).

Las técnicas de biorremediación utilizadas, bioestimulación con ramnolípidos (BE) y bioaumentación con el cultivo mixto (BA) no causaron efectos tóxicos al suelo ya que la tasa de mortalidad de las lombrices para la BE y BA fue de 5 y 15 %, respectivamente; mientras que el de tiempo cero fue de 70 % (**Tabla 31**).

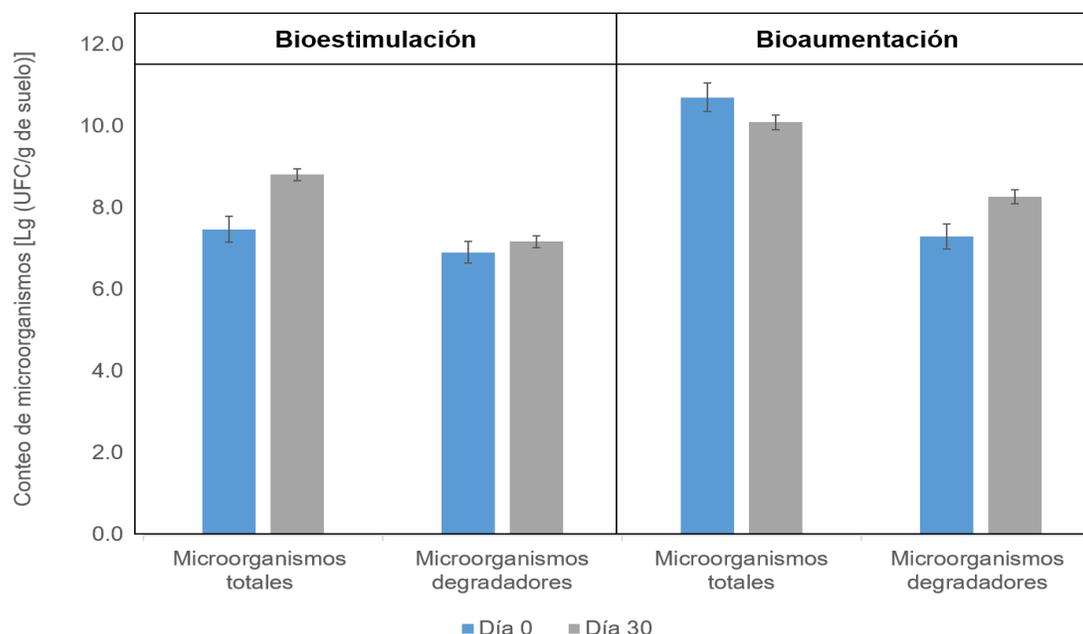


Figura 29. Conteo de microorganismos en el proceso de biorremediación en parcelas. Las barras representan la desviación estándar calculada para tres repeticiones

Tabla 28. Contenido de nitrógeno y fósforo del suelo de las parcelas durante la biodegradación de hidrocarburos.

Tratamiento	Nitrógeno (mg.kg ⁻¹)		Fósforo (mg.kg ⁻¹)	
	Día 0	Día 30	Día 0	Día 30
Bioestimulación	1,56 ± 0,10	0,66 ± 0,07	5,23 ± 0,07	4,84 ± 0,18
Bioaumentación	2,96 ± 0,12	1,34 ± 0,08	6,30 ± 0,12	5,35 ± 0,23

Tabla 29. Biodegradación de hidrocarburos en parcelas a los 30 días de tratamiento.

Tratamiento	HTP	Grasas y aceites	Saturados	Aromáticos	Resinas	Asfaltenos
Bioestimulación	36,7 ^a ± 3,3	37,1 ^a ± 3,3	0,1 ^a ± 0,1	63,7 ^a ± 5,3	28,3 ^b ± 1,5	22,7 ^b ± 7,5
Bioaumentación	24,2 ^b ± 2,2	5,1 ^b ± 2,2	1,1 ^a ± 8,6	41,7 ^b ± 2,7	56,0 ^a ± 1,6	48,5 ^a ± 4,6

Se presenta el valor medio y la desviación estándar para n=3. Valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según el método LSD de Fisher. HTP: hidrocarburos totales del petróleo.

Tabla 30. Influencia de los ramnolípidos en la biodegradación de hidrocarburos en parcelas.

Tratamiento	Tasa de incremento de la degradación respecto a la bioaumentación (%)		
	HTP	Grasas y aceites	Aromáticos
Bioestimulación	33,4 ± 6,80	86,5 ± 4,8	34,2 ± 6,9

HTP: hidrocarburos totales del petróleo

Tabla 31. Ensayo toxicológico con *Eisenia andrei* de las parcelas tratadas por bioestimulación y bioaumentación.

Tratamientos	<i>Eisenia andrei</i>		
	Organismos		Mortalidad (%)
	expuestos	muestrados	
Control del ensayo	60	0	0
BE (t = 0 d)	60	42	70
BE (t = 30 d)	60	3	5
BA (t = 0 d)	60	45	75
BA (t = 30 d)	60	9	15

BE: bioestimulación; BA: bioaumentación

4.7.3. Recuperación mejorada de petróleo crudo en columnas

Para determinar la influencia de los ramnolípidos de *P. aueruginosa* Y3-B1A, en el índice de recobro de crudo residual se empleó sobrenadante libre de células de un cultivo de 72 h. La tensión superficial fue de $28,0 \pm 0,7$ mN.m⁻¹ y DMC = 2,0 %.

El valor del índice de recobro adicional (AOR) para todos los tratamientos a los 28 días estuvo en el rango de 6,8 % a 21,0 %, mientras que en el control (libre de ramnolípidos) fue de 1,3 % (**Tabla 32**). El análisis estadístico de los datos experimentales permitió determinar que existían diferencias significativas entre los tratamientos y el control. Al incrementar la concentración de ramnolípidos se incrementa la tasa de recobrado, aunque no hubo diferencias significativas al emplear soluciones al 2,0 y 2,5 % de ramnolípidos (**Figura 30**).

Tabla 32. Parámetros de la recuperación de petróleo crudo en columnas empacadas con arena empleando ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A.

Parámetros	Control	Ramnolípidos (%)			
		0,1	1,0	2,0	2,5
OOIP (mL)	12,4±0,4	12,3±0,4	11,9±0,6	11,8±0,3	11,9±0,2
Soi (%)	63,7±4,4	64,6±2,9	61,0±0,7	60,5±0,7	65,8±1,1
OOIP-Sorwf (mL)	8,6±0,1	6,2±0,8	5,4±0,4	5,3±0,5	5,0±0,1
Sor (%)	69,6±1,3	50,7±5,1	45,3±5,7	44,6±5,3	42,3±0,6
Sormf (mL)	0,1±0,0	0,4±0,1	0,7±0,1	1,0±0,0	1,1±0,1
AOR (%)	1,3^d±0,3	6,8^c±1,7	12,8^b±1,3	19,2^a±2,0	21,0^a±1,3

OOIP, crudo retenido inicialmente; **Soi**, saturación inicial de crudo; **Sorwf**, crudo recuperado después del flujo de agua; **Sor**, saturación de crudo residual; **Sormf**, crudo residual después del flujo de ramnolípidos; **AOR**, recuperación adicional de crudo.

Se presenta el valor medio y la desviación estándar para n=3. Valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según el método LSD de Fisher.

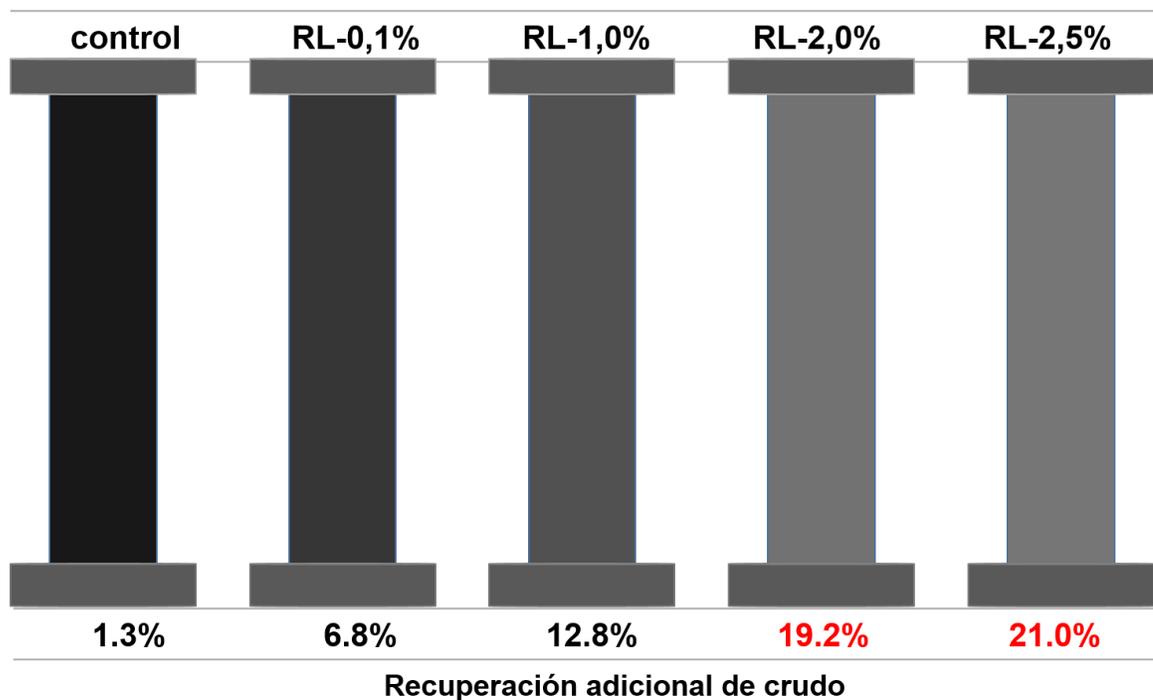


Figura 30. Índice de recuperación adicional de petróleo crudo a los 28 días en columnas empleando ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Selección y clasificación taxonómica de una cepa productora de ramnolípidos

En la era de la industrialización global, la exploración de los recursos naturales ha servido como fuente de experimentación para la ciencia y las tecnologías avanzadas, incrementándose la manufactura de productos con alto valor agregado en el mercado, entre estos los biotensioactivos [16].

En la búsqueda de nuevos biotensioactivos el objetivo principal es encontrar productos con elevada actividad superficial e interfacial, capacidad emulsionante, solubilidad y actividad superficial en un amplio rango de temperatura y pH. Además de estas propiedades físico-químicas, los biotensioactivos deben ser económicamente competitivos. Por lo que otro objetivo importante en el proceso de selección, es aislar nuevas cepas productoras con elevados rendimientos. Debido al gran número de cepas que deben aislarse y caracterizarse en un proceso de selección, emplear una estrategia eficiente es la clave del éxito. Una estrategia completa consta de cuatro pasos: aislamiento, selección identificación de cepas y caracterización de biotensioactivos [67].

En este trabajo se realizó la selección de bacterias productoras de biotensioactivos a partir de 23 cepas de la colección del CEINPET. Estas fueron aisladas previamente de ecosistemas terrestres, marinos y dulceacuícolas contaminados con hidrocarburos del petróleo y tienen la capacidad de crecer con crudo como única fuente de carbono. Los microorganismos productores de biotensioactivos pueden aislarse de diferentes muestras ambientales, tales como suelo, agua y materiales residuales, etc. [67]. Sin

embargo, Bodour y Miller-Maier [151] demostraron que en suelos contaminados con hidrocarburos existe mayor probabilidad de encontrar cepas productoras de biotensioactivo, con respecto a suelos no contaminados. Otros autores han expuesto que en los ecosistemas marinos la probabilidad de aislar mayor diversidad de cepas productoras de biotensioactivos es amplia debido a las condiciones extremas de salinidad, alcalinidad y temperatura [152, 153].

En esta investigación la capacidad de producción de biotensioactivos de las cepas en el proceso de selección, se evaluó empleando dos métodos de detección indirecta: índice de emulsificación (24 y 72 horas) y de adhesión bacteriana a hidrocarburos, y otro directo; la tensión superficial. Para formar emulsiones entre dos compuestos inmiscibles es necesario la presencia de agentes con actividad superficial, por tanto, la formación de emulsiones estables entre hidrocarburos, compuestos derivados del petróleo o aceites vegetales y cultivos microbianos, es una evidencia de la presencia de biotensioactivos. Las células que se adhieren a los compuestos hidrofóbicos son removidas de la fase acuosa, la disminución en la turbidez de esta fase se correlaciona con las células hidrofóbicas. La tensión superficial se debe a que las fuerzas que afectan a cada molécula son diferentes en el seno del líquido y en la superficie, su disminución hace posible la emulsión o solubilización de compuestos que habitualmente no manifiestan este comportamiento.

Los métodos de clasificación numérica permiten analizar todos los ensayos simultáneamente. La aplicación de estos métodos condujo a la selección de tres cepas Y3-B1A, Y10-B10 y D6 (13 % del total). Considerando que generalmente el por ciento de aciertos es bajo [67] este es un por ciento de acierto elevado.. Saravanan y

Vijayakumar seleccionaron el 4,1 % de las cepas aisladas de muestras de suelo contaminado con crudo [154]; mientras Vandana seleccionó solo el 10 % de los aislados de suelo contaminado de un área de bombeo de crudo [155]. El origen de las cepas (sitios contaminados) combinado con cultivos enriquecidos y técnicas clásicas de detección de biotensioactivos (E y TS), utilizados en la investigación, es una buena estrategia para seleccionar cepas productoras.

Shahaliyan y colaboradores aislaron cepas productoras de biotensioactivos de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* a partir de muestras de sedimentos marinos contaminados con hidrocarburos empleando las técnicas de hemólisis en agar sangre, ruptura de la gota, desplazamiento de crudo e índice de emulsificación [156]. Aislamientos de especies de estos mismos géneros obtuvieron Mahalingan y colaboradores a partir de muestras de suelo contaminadas con diésel, empleando las mismas técnicas, e incorporando la tensión superficial [157]. En otra investigación los autores seleccionaron la cepa *P. aeruginosa* NTBU-01 de una muestra de suelo contaminado con petróleo crudo, utilizando como criterio la capacidad de disminución de la tensión superficial [56]. Chen y colaboradores aislaron la cepa *P. aeruginosa* ZS1, estos autores incluyeron en los métodos de selección la determinación de la presencia de ramnolípidos, basados en reacciones específicas de estas estructuras químicas [55].

En la selección de la cepa más eficiente en la producción de biotensioactivo se emplearon las determinaciones de la tensión superficial, DMC, CMC y concentración de ramnolípidos en el caldo de cultivo libre de células. La CMC que es la concentración mínima de un tensioactivo a partir de la cual se forman micelas espontáneamente en

una disolución, es un parámetro característico de cada molécula y es utilizada para medir la eficiencia del mismo. Por lo general los miembros del género *Pseudomonas* producen glicolípidos del tipo ramnolípidos [97, 158–161].

Se seleccionó la cepa Y3-B1A que produjo el biotensioactivo más eficaz y eficiente. La secuenciación y comparación de su gen RNA 16 S permitió clasificarla como miembros del género *Pseudomonas*. Las pruebas fisiológicas y bioquímicas confirmaron la especie *Pseudomonas aeruginosa*. Esta es una especie ampliamente descrita como productora de ramnolípidos [55, 56, 87, 162, 163]

5.2. Caracterización físico química y toxicológica de los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A

La dilución micelar crítica (DMC) del caldo de cultivo libre de células fue de 2,7 % v/v; el extracto orgánico redujo la tensión superficial a 24,98 mN.m⁻¹ y presentó valores de CMC de 117,78 mg.L⁻¹. Los valores de CMC de ramnolípidos informados para cepas del género *Pseudomonas* varían desde 5 hasta 200 mg.L⁻¹ [51]. La eficiencia de los ramnolípidos producido por *P. aeruginosa* Y3-B1A es superior a la de los producidos por *Pseudomonas sp.* ZS1 [55] y *P. aeruginosa* ADMT1 [54], inferior a la obtenida por la cepa *Pseudomonas sp.* DAUPE 614 (13,9 mg.L⁻¹) y comparable a la informada de otros aislados: 110-120 mg.L⁻¹ [56, 164]. Sin embargo, su eficacia es mayor al de estas cepas que informaron valores de la TS > 25 mN.m⁻¹ [51–56].

Los análisis químicos revelaron en el espectro infrarrojo las bandas características de ramnolípidos descritas previamente en la literatura [56, 161, 165, 166].

Los espectros de masa obtenidos por cromatografía ESI-MS mostraron 29 picos con 14 homólogos. Los ramnolípidos son un grupo diverso de moléculas con más de 60

congéneres informados. Usualmente presentan una o dos ramnosas, aunque existen informes de tres o más. Por otra parte, el número de átomos de carbono de los ácidos grasos varía entre seis y 24, las cadenas carbonadas de los ramnolípidos producidos por la cepa *P. aeruginosa* Y3-B1A varían entre ocho y 14. Los valores más frecuentes en la literatura están entre ocho y diez átomos [46]. Generalmente predominan los ramnolípidos Rha-C10-C10 y Rha-Rha-C10-C10 [55, 162, 167, 168], comportamiento similar al obtenido en esta investigación.

La composición de los ramnolípidos y el predominio de un tipo particular de congéneres depende de varios factores: la fuente de carbono, las condiciones de cultivo [162], la edad del cultivo y lo más importante, el tipo de cepa [51, 146]. Los métodos de aislamiento y purificación de los ramnolípidos también inciden notablemente en la estructura [51].

Uno de los métodos más utilizados para cuantificar la concentración de ramnolípidos es la determinación de ramnosa con posterior corrección mediante un factor experimental. En la literatura los valores informados de este factor varían y es recomendable no aplicarlos sin comprobarlos experimentalmente. Esta variabilidad se debe a la relación mono-/di-ramnolípidos que se establece en la mezcla y a la longitud de las cadenas carbonadas. A mayor concentración de mono-ramnolípidos, mayor será el valor del coeficiente.

En esta investigación se usó como factor de correlación ramnosa / ramnolípidos: 3,24. Este coeficiente es ligeramente inferior al 3,4 determinado por Bharali y Kuma, para una mezcla de predominio de mono-ramnolípidos [146]. Sin embargo, usualmente los valores utilizados están en el rango de 2,0 a 3,0. Pereira y colaboradores usaron 2,23

para una mezcla con proporciones semejantes de mono/ di-ramnolípidos (49,6 / 50,38) con cadenas carbonada de ocho a 12 átomos [169]. Abalos estableció el factor 3 para una composición en la que predominan los di-ramnolípidos [164]; Chen y colaboradores utilizaron este mismo factor, sin comprobación experimental, para una mezcla mono/di: 40/60 [55]. La composición de los ramnolípidos, también depende la fuente de carbono, por lo que Sodagari estableció dos coeficientes: 2,22 y 2,73, en función de la fuente de carbono que empleara para producirlos [132].

Los resultados de los estudios ecotoxicológicos realizados al crudo de ramnolípidos con los modelos *Solanum lycopersicum* y *Artemia salina* demostraron su baja toxicidad. Todos los valores de concentración letal media estuvieron en el rango de 100-1000 mg.L⁻¹, los que se consideran seguros de acuerdo a lo establecido por Meyer y colaboradores [170]. Otros autores han informado resultados semejantes utilizando los mismos modelos biológicos [22, 87, 171], además de semillas de *Latuca sativa* (lechuga) y células de mamíferos [87].

La baja o ausencia de toxicidad de los biotensioactivos, generalmente se atribuye a sus estructuras poliméricas, lo que concede una polaridad inferior a la de los tensoactivos sintéticos y conduce a la formación de micelas con menor carga electrostática, incrementando así la compatibilidad con las membranas biológicas [171]. Al igual que en estudios precedentes, los ramnolípidos producidos por un patógeno oportunista no afectaron los niveles de toxicidad de la muestra [22]; lo cual los hace más atractivos para estrategias de biorremediación por bioestimulación por la aplicación directa del crudo [17, 30, 172, 173].

5.3. Estrategia de incremento de la productividad volumétrica de los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A

Obtener ramnolípidos con alto rendimiento es un reto, varios factores influyen en el crecimiento microbiano y el metabolismo durante el cultivo de producción. La búsqueda de combinaciones ideales de sustratos para definir los medios de cultivo que faciliten la difusión intracelular y la producción de compuestos de interés ha sido sujeto de numerosas investigaciones [5, 14, 16]. Los estudios cinéticos pueden influir en la disminución de los costos. El empleo de fuentes residuales en la producción disminuye considerablemente el costo de producción. Esto es particularmente rentable para aplicaciones ambientales o industriales, en las que el empleo del producto crudo sea igualmente efectivo [3, 36], como es el caso de los ramnolípidos obtenidos en este trabajo.

Se utilizó el glicerol como fuente de carbono, este es un residual de la producción de biodiesel y otros oleoquímicos, cuya producción se ha incrementado en las últimas décadas [174]. Este es un sustrato ampliamente utilizado en la obtención de ramnolípidos [69, 115, 175, 176], considerado barato y eficiente para estos fines [25, 132].

Definido el glicerol como fuente de carbono, se estableció la cinética básica de crecimiento y de producción de ramnolípidos de la cepa *P. aeruginosa* Y3-B1A. La fase de adaptación no se apreció (**Figura 13**), esto es consecuencia de haber utilizado como inóculo células que se estuvieron cultivando por más de 30 días en condiciones similares. A las 35-38 h de incubación se observó un cambio de pendiente en las curvas de consumo de sustrato, crecimiento y formación de ramnolípidos que sugiere

un crecimiento diauxico, sin embargo no existen evidencias de la acumulación de un metabolito intermediario que se pueda utilizar como fuente de carbono [177]. Este fenómeno se ha observado en otros perfiles cinéticos previamente publicados en los que se usó glicerol como sustrato para producir ramnolípidos, no obstante, los autores no explicaron este comportamiento [113, 175, 178, 179].

La causa de la variación en el consumo de glicerol y como consecuencia en el crecimiento microbiano y producción de ramnolípidos en la fase exponencial de crecimiento, no fue evaluada experimentalmente. Estudios recientes del metabolismo del glicerol en especies del género *Pseudomonas* apuntan a la no homogeneidad en el tiempo de respuesta metabólica de la población, por lo que en el cultivo con esta fuente de carbono se aprecia la existencia de más de una subpoblación bacteriana. Estos cultivos se caracterizan por la presencia de una fracción latente de células bacterianas que coexisten con una subpoblación metabólicamente activa, a diferencia de los cultivos en presencia de glucosa, en los que se manifiesta una población única, uniforme y metabólicamente activa [177, 180]. En presencia de glicerol se ha demostrado que se produce un aumento estocástico de células individuales capaces de metabolizar el sustrato en medio de una mayoría de bacterias que no responden al mismo, seguido por la eventual toma de control de toda la población. [177].

En 96 h la cepa produjo $24,67 \text{ g.L}^{-1}$ ($\text{PV} = 0,257 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), siendo este es uno de los mayores valores de producción informados empleando el glicerol como fuente de carbono (**Tabla 33**). Es posible obtener concentraciones mayores de ramnolípidos empleando otros aceites o ácidos grasos, por ejemplo: aceite de girasol: 39 g.L^{-1} [181], aceite de canola frito: $40,5 \text{ g.L}^{-1}$ [6] y aceite de colza: 45 g.L^{-1} [182]. Sin embargo, la

presencia de ácidos grasos residuales en el caldo de cultivo final tiene desventajas: primero, la recuperación y purificación de los ramnolípidos es más compleja y; segundo, si el propósito del caldo fermentado es de aplicación ambiental, los ácidos grasos pueden incrementar la concentración de compuestos orgánicos insolubles en los suelos o aguas a tratar [175]. El empleo del glicerol evita estos problemas.

Se calcularon los valores de productividad volumétrica por rangos de tiempo para establecer el punto de partida. En la cinética, además, se estableció que la producción de ramnolípidos se incrementa en la segunda mitad de la fase exponencial y durante la aceleración negativa, considerándose un metabolito secundario producido parcialmente asociado al crecimiento. Zhu y colaboradores refirieron que la producción es parcialmente asociada al crecimiento [50].

Existe discrepancia entre los investigadores acerca de la clasificación de la producción de ramnolípidos en función de la vía de fermentación. Algunos autores consideran que son un producto asociado al crecimiento, ya que muestran una relación paralela entre el crecimiento y la producción de ramnolípidos [183]. Otros consideran que los ramnolípidos son metabolitos secundarios producidos bajo condiciones de crecimiento limitadas por nutrientes (nitrógeno y fósforo) y puede afectarse por las condiciones ambientales [178]. También se ha planteado que su producción coincide con el inicio de la fase estacionaria [184–186] y se sobre producen en esta [88, 132, 181].

Tabla 33. Producción de ramnolípidos por cepas de *P. aeruginosa* empleando glicerol como fuente de carbono.

Cepa	Método de producción	de	RL (g.L ⁻¹)	PV (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Método de determinación de ramnolípidos	de	Referencia
<i>UFPEDA 614</i>	cultivo agitado en erlenmeyers		15,9 12,0	0,095 * 0,125 *	Ramnosa. Factor: 3,2		de Santana y cols., 2015 [175]
<i>A11</i>	cultivo anaeróbico		4,4	0,037	Ramnosa		Singh y cols., 2013 [174]
<i>2B</i>	cultivo agitado en erlenmeyers		4,14	nc	Azúcares totales		Aparna y cols., 2012; [187]
<i>ATCC 53752</i>	cultivo discontinuo alimentado		4,12	0,057 *	Ramnosa		Avili y cols., 2012 [188]
<i>SQ6</i>	cultivo anaeróbico		1,61	nc	Dispersión de petróleo correlacionado con la concentración de ramnosa		Zhao y cols., 2015; [53]
<i>SG</i>	cultivo anaeróbico		0,63	0,003 *	Ramnosa		Zhao y cols., 2016 [189]
<i>ZS1</i>	cultivo agitado en erlenmeyers		30,0	nc	Ramnosa / Dispersión de crudo. Factor: 3		Cheng y cols., 2017; [55]
<i>PA1</i>	cultivo agitado en erlenmeyers		7,26	0,061	Ramnosa. Factor: 2,23		Pacheco y cols., 2012; [190]
	cultivo agitado en erlenmeyers		1,9	0,048 *	Ramnosa. Factor:3,4		Cherif y cols., 2015; [178]
<i>PB 25</i>	cultivo agitado en erlenmeyers		2,47	0,082	Ramnosa		Giraldo y cols., 2014 [113]
Y3-B1A	cultivo agitado en erlenmeyers		24,67	0,257	Ramnosa. Factor:3,24		Esta investigación

* calculada a partir de la información aportada en la publicación; nc insuficiente información para hacer el cálculo

El diseño factorial 3^2 permitió determinar que la concentración inicial de biomasa y la adición de inductor tienen un efecto positivo en el incremento de la productividad volumétrica. Se calcularon las concentraciones óptimas en ambos casos: $2,1 \text{ g.L}^{-1}$ y $1,25 \%$, respectivamente.

Como inductor se empleó caldo fermentado de la fase estacionaria libre de células [cultivo de *P. aeruginosa* Y3-B1A en MMM con glicerol (4% m/v), a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, incubado a 130 r.min^{-1} durante 72 h]. La adición de $1,25 \%$ de caldo fermentado con contenido de autoinductores endógenos al inicio del cultivo con una biomasa inicial de $2,1 \text{ g.L}^{-1}$ incrementó $1,7$ veces la productividad volumétrica (de $0,259$ a $0,446 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Dos Santos y colaboradores lograron un incremento de dos veces la productividad volumétrica (de $0,027$ a $0,054 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) adicionando 20% de inductor de semejante naturaleza en la producción de ramnolípidos por *P. aeruginosa* PA1 [50]. Aunque el incremento es similar requirieron 16 veces la concentración de inductor respecto a la utilizada en esta investigación.

El análisis mostrado en la **Figura 14** permite observar que la concentración del inductor influye significativamente en la producción de ramnolípidos, es decir que el inductor adicionado contribuye al incremento de la síntesis de la enzima ramnosiltransferasa (**Figura 1**). Durante la fase estacionaria de crecimiento de *Pseudomonas*, se produce una mezcla de lactonas de homoserinas aciladas y señales de quinolona de *Pseudomonas*, que son conocidas como autoinductoras. Estas moléculas forman parte del sistema *quorum sensing*, el cual es un sistema de comunicación bacteriana célula a célula, que incluye la biosíntesis, secreción y detección de moléculas señales autoinductores. Se conoce que estos son responsables de la inducción de la síntesis

de ramnolípidos [45, 48, 190]. La presencia de estas enzimas desde el inicio del cultivo disminuye el tiempo de inicio de síntesis de ramnolípidos.

El efecto de la concentración de biomasa inicial o volumen del inóculo en la producción de ramnolípidos ha sido poco estudiado. En este estudio se comprobó que la biomasa inicial de *P. aeruginosa* Y3-B1A influye en la producción y que su incremento debe ser controlado porque tiene un efecto negativo, como ha sido observado previamente [43, 143, 163].

Otro elemento evaluado en la estrategia de fermentación, fue el tiempo de cultivo. Empleando las concentraciones de biomasa ($2,1 \text{ g.L}^{-1}$) e inductor (1,25 %), se estableció el menor tiempo requerido para alcanzar la máxima de productividad volumétrica.

No existieron diferencias significativas en los valores de productividad volumétrica a 60 y 72 h (tiempo al que se determinaron los valores máximos: $0,413$ y $0,410 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente). Se seleccionó 60 h para los cultivos secuenciales discontinuos. Otros autores también han referido este tiempo para alcanzar una mayor productividad: *P. aeruginosa* produjo más ramnolípidos en el periodo de 40 a 60 h [178], *P. aeruginosa* PAO1 fue más productiva entre 40 y 70 h [181, 191], mientras que *P. cepacia* CCT6659 alcanzó su máxima productividad en la fase estacionaria entre 48 y 60 h [192].

Determinado el tiempo de cultivo al cual se alcanza la mayor productividad volumétrica, se realizó un cultivo secuencial de cinco ciclos discontinuos de 60 h cada uno, iniciando con las concentraciones de biomasa ($2,1 \text{ g.L}^{-1}$) e inductor (1,25 %) establecidas en ensayos previos. La mayor producción de ramnolípidos ocurrió en el cuarto ciclo.

Concluido este, en 240 h, *P. aeruginosa* Y3-B1A acumuló 145,44 g.L⁻¹ con una PV = 0,606 g.L⁻¹.h⁻¹. Este es el valor de productividad volumétrica más elevado informado hasta el momento; en otros estudios se obtuvo mayor producción de ramnolípidos, pero consumiendo más tiempo [44]. Para una mejor comprensión de la importancia de los valores de productividad volumétrica alcanzados, se muestran en la **Tabla 34** los obtenidos en esta investigación y datos de publicaciones previas que destacan los elementos de la estrategia utilizados.

Se han realizado varios estudios de producción de ramnolípidos producidos por otras cepas *Pseudomonas spp.* en cultivos discontinuos. El cultivo de *P. aeruginosa* S2 con sistema de control de pH y alimentación de glucosa incrementó los valores de producción a 6,06 y 3,04 g.L⁻¹, respectivamente [193]. Durante el cultivo con limitación de nitrógeno de células inmovilizadas de *Pseudomonas sp.* DSM2874, la producción fue de 45 g.L⁻¹ en un proceso discontinuo con aceite de colza [182]. Lee y colaboradores diseñaron una estrategia de alimentación con aceite de pescado en el cultivo de *P. aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P, la producción fue de 22,7 g.L⁻¹ [77]. Todas estas estrategias emplearon fuentes de carbono grado comercial, y costosas, a diferencia de la empleada en esta investigación.

La diversidad de métodos empleados para determinar la concentración de ramnolípidos provoca que la comparación de rendimientos obtenidos en diferentes experimentos sea compleja y poco exacta. Por ejemplo, en una revisión de Mukherjee y colaboradores [194] se compararon valores de producción de biotensioactivos, incluyendo ramnolípidos, producidos por diferentes cepas; informaron un rendimiento máximo de 45 g.L⁻¹ por la cepa *Pseudomonas sp.* DSM 2874, mientras que la del resto

Tabla 34. Estrategias de incremento de la producción de ramnolípidos por cepas de la especie *P. aeruginosa*: Estudios en erlenmeyers agitados.

Cepa	Fuente de carbono	Elementos de la estrategia	RL (g.L ⁻¹)	PV (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Tiempo (h)	Método de determinación de ramnolípidos	Referencia
ATCC 9027	Glucosa	Adición de ácidos grasos como precursores	13,7	0,07*	192	Precipitación ácida, extracción orgánica y gravimetría. Factor de pureza	Zhang y cols., 2014; [195]
ATCC 15692	Aceite de maíz	Discontinuo alimentado (fuente de carbono)	74,9	0,18	408	Ramnosa	He y cols., 2017; [44]
ATCC 15692	Aceite de maíz	Discontinuo alimentado secuencial (1 ciclo de 5 días y 4 de 3 días)	151,2	0,40-0,45	480	Ramnosa	He y cols., 2017; [44]
PA1	Glicerol	pH óptimo, adición de medio de cultivo agotado como inductor	9,39	0,054	174	Ramnosa FC = 2,23 (no determinado)	Dos Santos y cols., 2016 [50]
PA1	Glicerol	pH óptimo, discontinuo-alimentado (fuente de carbono y nitrógeno)	10,39	0,047	220	Ramnosa FC = 2,23 (no determinado)	Dos Santos y cols., 2016 [50]
Y3-B1A	Glicerol	Biomasa inicial, adición de medio de cultivo agotado como inductor, Discontinuo alimentado secuencial (4 ciclos de 60 h)	145,44	0,606	240	Ramnosa FC = 3,24 determinado experimentalmente	Esta investigación

* calculada a partir de los datos; FC: factor de conversión

de las cepas era menor que 15 g.L⁻¹.

Un análisis detallado de los métodos de cuantificación de los biotensioactivos empleados por los autores antes citados, permite hacer otras interpretaciones. El informe de la producción más elevada de ramnolípidos fue con la cepa *Pseudomonas* sp. DSM 2874, realizado por Trummler y colaboradores (2003). En este se empleó un método gravimétrico para calcular la concentración de ramnolípidos [182], este es un método con una elevada incertidumbre teniendo en cuenta que se desconoce el grado de pureza de la muestra. Giani y colaboradores (1997), informaron haber obtenido concentraciones de 74-112 g.L⁻¹ en cultivos discontinuos y discontinuos alimentados con las cepas *Pseudomonas spp.* DSM 7107 y DSM 7108, sin embargo, otros autores han considerado que el informe carece de detalles experimentales y no se ha informado verificación de tales resultados [70].

El crecimiento microbiano y los rendimientos de producción de metabolitos, en los procesos de cultivo en reactores, generalmente, son superiores a los obtenidos en erlenmeyers en cultivo agitado. Esto se debe a que en el reactor se puede satisfacer la demanda de oxígeno del microorganismo a través de la inyección de aire u oxígeno en el seno del líquido. Además, como consecuencia de la agitación mecánica, que garantiza que no se estratifiquen los nutrientes en el medio, existe una mayor homogeneidad.

Para la producción de biotensioactivos en biorreactores, se recomienda el uso de fermentadores muy esbeltos o utilizar volúmenes inferiores al efectivo de trabajo. Estos cultivos generan grandes volúmenes de espuma, lo que se potencia también con el empleo de altas velocidades de agitación. Se seleccionó una velocidad de agitación

baja (130 r.min^{-1} , semejante a la empleada en incubadora de agitación orbital) y volumen de trabajo (1 L) inferior al volumen efectivo (2 L) del reactor utilizado.

En el cultivo de *P. aeruginosa* Y3-B1A en el reactor con inyección de oxígeno puro se apreció una fase de adaptación que se extendió por 16 h. Es habitual observar una fase de adaptación prolongada ($> 10 \text{ h}$) en cultivos en glicerol [177, 180]. Fenómeno que se apreció por primera vez durante el desarrollo de la estrategia. Esto se debe a que la cepa se expuso a condiciones de cultivo diferentes, lo cual implicó un nuevo proceso de adaptación a las estas.

La producción en el reactor con aire enriquecido con oxígeno fue más eficiente que en el cultivo agitado en erlenmeyers. Si se comparan los valores de biomasa a las 72 h (**Figura 13 y Figura 16 B**) se puede apreciar que en el reactor el aumento fue de 1,14 veces (de $8,02$ a $9,12 \text{ g.L}^{-1}$), sin embargo, la productividad volumétrica fue 1,56 veces mayor (de $0,446$ a $0,696 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Zhao y colaboradores demostraron que el oxígeno influye en la expresión de los genes *rhl* y altera de forma positiva el rendimiento [25].

En el reactor se determinó que a las 60 h *P. aeruginosa* Y3-B1A alcanza el mayor valor de productividad volumétrica. Resultado semejante al obtenido en el cultivo agitado en erlenmeyers. Igualmente, en el cuarto ciclo de cultivo secuencial discontinuo, se alcanzó la mayor productividad volumétrica con un valor de $1,079 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$

La estrategia planteada para reactor es una de las que más tiempo consume, no obstante, es la de mayor productividad volumétrica descrita: $0,753 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (**Tabla 35**).

Zhu y colaboradores alcanzaron valores de productividad volumétrica semejantes ($0,735 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), mediante el control del pH en un cultivo discontinuo alimentado [186] disponiendo del 40 % del tiempo requerido en la estrategia diseñada para

Tabla 35. Estrategias de incremento de la producción de ramnolípidos por cepas de la especie *P. aeruginosa*: Estudios en reactor.

Cepa	Fuente de carbono	Elementos de la estrategia	RL (g.L ⁻¹)	PV (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Tiempo (h)	Método de determinación de ramnolípidos	Referencia
USM-AR2	Diésel	Discontinuo alimentado basado en la tasa máxima de consumo de sustrato. 3,0 L (1,5 L VE)	23,6	0,076	312	Ramnosa	Noh y cols., 2014 [77]
E03-40	Aceite de soya / glicerol	Efecto del oxígeno disuelto, pH óptimo y fuente de carbono. 2,0 L (1 L VE)	42,1	0,22	191	Ramnosa FC = 2,22 y 2,73	Sodagari y cols., 2018 [132]
PAO1	Aceite de girasol	Adición de elementos traza a las 20, 40 y 70 h. 42 L (30 L VE)	39	0,43	90	Precipitación ácida, extracción orgánica, cuantificación por HPLC-UV/Vis	Müller y cols., 2010; [181]
O-2-2	Aceite de soya	Control de pH discontinuo-alimentado. 5,0 L (2,5 L VE)	70,56	0,735*	96	Ramnosa	Zhu y cols., 2012 [186]
PA1	Glicerol crudo	Optimización de concentración de fuente de carbono y de nitrógeno. 5,0 L (3 L VE) reactor con membrana	5,46	0,032	120	Ramnosa. FC = 2,23	Pereira y cols., 2013 [169]
Y3-B1A	Glicerol	Inyección de oxígeno, biomasa inicial, adición de medio de cultivo agotado como inductor, Discontinuo alimentado secuencial (cuatro ciclos de 60 h). 2,5 L (1 L VE)	180,78	0,753	240	Ramnosa FC = 3,24	Esta investigación

* calculada a partir de los datos; FC: factor de conversión; VE: volumen efectivo

P. aeruginosa Y3-B1A. Sin embargo, se utilizó aceite de soya como fuente de carbono, lo que compite con el alimento humano. En el año 2013, Pereira y colaboradores, usaron glicerol como fuente de carbono obtuvieron una productividad volumétrica muy baja. En el proceso de cultivo en el reactor solamente optimizaron las fuentes de carbono y nitrógeno [169]; con lo cual se ha demostrado que no es suficiente para alcanzar los niveles que rentabilicen el proceso. En años posteriores las estrategias en reactores han incorporado el estudio y modificación de condiciones de cultivo.

5.4. Evaluación de la estabilidad del crudo de ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A

La habilidad de formar y estabilizar emulsiones puede ser determinada mediante el cálculo del índice de emulsificación (E), este es un método útil y práctico. Actualmente no existe un criterio único acerca de cuál es el mínimo valor de E para evaluar una emulsión como satisfactoria. Varios autores consideran como positivo el rango de 55-90 % en emulsiones con petróleo crudo o queroseno [43, 44, 196], valores de 50 % han sido valorados como moderados [196].

Las emulsiones formadas por los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A con queroseno y petróleo crudo tuvieron una estabilidad superior al 90 % (E cercanos al 60 % durante 60 días). La emulsión formada con diésel perdió su estabilidad después de los 7 días.

Los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A mostraron resultados favorables de estabilidad en el rango de pH evaluado (4-10) a las 24 h, los valores de del índice de emulsificación oscilaron entre 58 y 70 %, reduciéndose en menos de 10 % a los 60 días, excepto a pH 4 que disminuyó hasta 40 %. Resultados similares

obtuvieron Sood y colaboradores, las emulsiones formadas por los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* CR1, mostraron valores de E a las 24 horas cercanos al 60 %, a pH más bajo este índice se redujo [197]. Los ramnolípidos de *Pseudomonas* sp. S1WB, mostraron índices de emulsificación semejantes en el rango de pH 7 a 10 a las 24 h (50 - 60 %), pero con una estabilidad inferior al 50 % a los 30 días, Además, con estos biotensioactivos no se lograron emulsiones estables a pH = 3 por más de 5 días [97].

La disminución del pH provoca la precipitación de los ramnolípidos y causa la desorción de las estructuras disminuyendo la estabilidad de las emulsiones en el tiempo. Se observó que las emulsiones de los ramnolípidos producidos por *P. stutzeri* se afectaron en condiciones muy ácidas (pH = 2), E < 25 % a las 24 h [198], En otro estudio en el que se evaluó la estabilidad de las emulsiones entre ramnolípidos y dos tipos de hidrocarburos, se demostró que la variación de pH afectó sus estructuras, provocando una distorsión en los valores de E, en un caso en condiciones básicas y otro en acidez [192].

Contrario a lo que ocurre con ramnolípidos, la estabilidad de biotensioactivos de tipo péptidos se favorece a valores de pH bajos (2-4) pudiendo llegar hasta el doble de a pH básico (6-12) [196]. Este resultado valida la teoría de que la estabilidad de las emulsiones depende de la estructura del biotensioactivo, la que se ve afectada ante la variación del pH.

La termoestabilidad de las emulsiones es asociada a la termoestabilidad de la estructura de los biotensioactivos. Los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A son termoestables a los 60 días, incluso después de haber sido esterilizados.

Otros biotensioactivos han demostrado comportamiento semejante [97, 192, 196–198], sin embargo su capacidad de formar emulsiones se redujo después de haber sido esterilizados, disminuyendo sus valores de E en 50 % respecto a otras temperaturas [97, 196, 197].

La evaluación de E a las 24 h ante la variación de la salinidad demostró la estabilidad de las emulsiones de 2 a 10 % de NaCl, mientras que a 20 % fue moderada. Los resultados obtenidos por Casia y colaboradores fueron semejantes [192]. Las emulsiones de los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* CR1 disminuyeron su estabilidad a concentraciones de NaCl superiores al 10 % [197], mientras los producidos por *P. stutzeri* mantuvieron una alta estabilidad hasta 20 % de NaCl [199]. En otro estudio, en el cual se evaluó la influencia de la salinidad solo en el rango de 1 a 9 % NaCl, se obtuvieron valores de E en el rango de 40 a 60 %, no obstante a los 30 días la emulsión con 9 % de NaCl había disminuido a menos de 30 % [97].

La estabilidad y el comportamiento de los biotensioactivos a altas temperaturas y salinidad se atribuyen a la presencia de grupos carboxilatos en la estructura. Las unidades de los carboxilatos incrementan el tiempo de estabilidad de los biotensioactivos, por lo que se requiere de una gran cantidad de energía térmica para romperlos. Adicionalmente, los compuestos con estructuras hidrofílicas son más estables en medios salinos. La presencia de ramnosa con varios grupos hidroxilos en el ramnolípidos incrementa la solubilidad en el agua [200].

La robustez y estabilidad en el comportamiento de los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A, en condiciones extremas de salinidad, pH y temperatura, apoya

la posibilidad de emplearlos en la biorremediación, incluso en ecosistemas marinos y en procesos de recuperación mejorada / asistida de petróleo crudo

La estabilidad demostrada por los ramnolípidos posteriormente a su esterilización, le aporta ventajas a la aplicación en procesos como la biorremediación y MEOR. Disminuye el impacto ambiental de su producción y aplicación, al disminuir los residuos de la fermentación y la no liberación de microorganismos al medio ambiente. Además, reduce los costos, al no ser necesario el uso de procesos de purificación.

5.5. Aplicaciones del crudo de ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A en la industria petrolera:

5.5.1. Remoción de vanadio

Debido a las características iónicas de los ramnolípidos, estos se han empleado en diferentes estudios para la remoción de metales pesados como el Cd, Zn, Cu, Ni, Pb, [30, 201, 202]. Obteniéndose resultados satisfactorios debido a que los cationes de tienen afinidad por los tensioactivos de cargas negativas [203]. Diferentes autores refieren que los posibles mecanismos de extracción de metales de los suelos y sedimentos, incluyen el intercambio iónico, la disolución-precipitación y la asociación con contra ion [114, 202].

A las soluciones de ramnolípidos empleadas en el lavado de arena se les ajustó el pH a 8,0 para mantener el vanadato soluble, de lo contrario precipitaría antes de entrar en contacto. Teniendo en cuenta que con el incremento del pH se favorece la ionización del carboxilo del ramnolípidos (RCCO⁻) en la solución; consecuentemente se mejora la solubilidad en agua y aumentan en el tensioactivo los sitios de enlace para los cationes metálicos [204]. Además, el aumento del pH disminuye el tamaño de los ramnolípidos,

lo que podría ser beneficioso ya que las micelas de ramnolípidos más pequeñas son mucho más fáciles de difundir entre las partículas de sedimento para alcanzar los metales pesados [133]. El lavado de la arena se realizó con cinco diluciones de ramnolípidos, tres de estas tenían concentraciones superiores a la CMC para garantizar la formación de micelas y verificar la eficiencia de estas estructuras en la movilización del vanadio. La eficiencia de remoción del vanadio estuvo en el rango de 56,4 a 85,5 % transcurridas las 72 h en agitación. Los valores alcanzados con las soluciones cuyas concentraciones eran superiores a la CMC, fueron significativamente diferente a los obtenidos con las diluciones con concentraciones inferiores.

Con la solución 2 x CMC (240 mg.L^{-1}) se removió el 85,5 % de vanadio, esta es semejante a la que informaron Moura y colaboradores, en un estudio en el que emplearon biotensioactivos producidos por una cepa del género *Candida* en la remoción de Cd y Pb [114]. Varios autores consideran que las micelas pueden remover los metales de la superficie del suelo [205, 206].

La efectividad de los ramnolípidos puede estar asociada a la afinidad entre el metal y el tensioactivo en los sedimentos [133], los ramnolípidos constituyen el grupo de biotensioactivos más citados en la literatura para la remoción de metales pesados [206]. La **Tabla 36** muestra una lista de resultados previamente publicados de remoción de metales pesados usando ramnolípidos.

La eficiencia de remoción de V lograda con soluciones de ramnolípidos (240 mg.L^{-1}) de 85,5 %, es similar a la lograda por otros autores en la remoción de Zn y Fe con una solución de caldo de cultivo libre de células al 2,5 % en 24 h [114]. Mulligan y Wang [207] empleando soluciones de caldo de cultivo y espuma, alcanzaron valores de

Tabla 36. Lista de metales pesados removidos por ramnolípidos en diferentes condiciones.

Microorganismo	Metal	Remoción (%)	Observaciones	Referencia
<i>P. aeruginosa</i> BS2	Cd	92	Solución de ramnolípidos al 0,1 %; pH = 8, 36 h	Juwarkar y cols., 2007 [204]
	Pb	88		
<i>P. aeruginosa</i> RG 18	Cd	32,38	Solución de ramnolípidos al 3 %; 48 h	Wu y cols., 2017 [115]
	Pb	64,12		
Cepa no referida	Cu	80,21	Solución de ramnolípidos al 3 %; pH = 7, 12 h	Chen y cols., 2017 [133]
	Cd	86,87		
	Pb	63,54		
	Cr	47,85		
<i>P. aeruginosa</i> PB 25	Pb	98	Solución de ramnolípidos al 0,1 %; pH = 9	Giraldo y cols., 2014 [113]
	Cd	90		
<i>P. aeruginosa</i> Y3-B1A	V	85,52	Solución de ramnolípidos al 0,24 %, pH = 8; 72 h	Esta investigación

remoción entre 51 y 73,2 % de Cd y Ni, estos valores son menos eficientes que los obtenidos en este trabajo. En otro estudio, en 48 h se alcanzó la máxima remoción de Cd y Pb (64,12 y 32,38 %) con una solución de ramnolípidos al 3 %; además, estos valores de eliminación son menores que los obtenidos utilizando ramnolípidos para remover el vanadio. Chen y colaboradores obtuvieron valores de remoción de Cd (86,87 %), Cu (80,21 %), Pb (63,54 %) y Cr (47,85 %) de un sedimento usando soluciones de ramnolípidos al 0,8 % en 12 horas [133]; los valores de remoción de Cd y Cu son similares al V obtenido en esta investigación.

En la **Tabla 37** se muestran los resultados de remoción o estabilización de vanadio utilizando otros métodos de remediación. En todos los casos los valores obtenidos son inferiores a los presentados en el trabajo. Ghadami y colaboradores [208] en un estudio de remoción de hidrocarburos, níquel y vanadio logró una eficiencia máxima de remoción de vanadio de 31,24 % después de nueve ciclos de lavado del suelo con un tensioactivo tipo saponion; la eficiencia es dos veces menor que la obtenida en este trabajo. Los ramnolípidos también, se utilizaron para eliminar V del catalizador de hidrodesulfuración gastado, los autores obtuvieron un 70 % de eficiencia de eliminación con respecto al control negativo [209].

Varios autores consideran que la adición de biotensioactivos, específicamente ramnolípidos, promueve la desorción de metales pesados de su fase sólida por dos mecanismos diferentes. El primero es mediante la formación de un complejo con metales que residen en la solución; esto disminuye la actividad de la fase de solución del metal y, por lo tanto, promueve la desorción de acuerdo con el principio de Le

Tabla 37. Remoción de vanadio de suelo y sedimentos.

Método	Efecto	Referencia
Remediación combinada de microfito (alfalfa y bacterias resistentes al vanadio)	Remoción del 69,8 % de vanadio	Gan y cols., 2020 [8]
Ácidos grasos de residuales de alimentos	Remoción del 23,55-57,09 % de vanadio	Zou y cols., 2019 [106]
Zeolita, atapulgita e hidroxipatita	Reducción del 41,95; 65,13 y 73,69 % de la fracción de vanadio extraíble, respectivamente	Yang y cols., 2020 [210]
Estabilización con biocarbón	Reducción del vanadio biodisponible en el suelo de 1000 mg.Kg ⁻¹ a 225,59 mg.Kg ⁻¹	Yu y cols., 2020 [211]
Lavado de sedimento con ramnolípidos	Remoción del 56,45 al 85,42 % del vanadio	Esta investigación

Chatelier. El segundo mecanismo es mediante la acumulación de biotensioactivo en la interfaz sólido-solución bajo la condición de tensión interfacial reducida.

Esto permite el contacto directo del biotensioactivo con el metal absorbido en una solución sólida [205, 212, 213]. El mecanismo de interacción del biotensioactivo con metales tiene tres etapas: (i) adsorción del biotensioactivo a la superficie celular y formación del complejo con el metal, (ii) separación del metal del suelo a la solución, y (iii) asociación con micelas [16, 121, 206, 212]. Los metales quedan atrapados dentro de las micelas por interacciones electrostáticas y pueden eliminarse por precipitación o separación por membrana.

5.5.2. Biodegradación de hidrocarburos

La biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos requiere que sea más efectiva, económica y ambientalmente sostenible [214]. En la investigación se evaluó el efecto de la bioestimulación con ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A, en la degradación de petróleo crudo y sus derivados en condiciones de cultivo de laboratorio y campo. Se utilizó un cultivo mixto de cuatro bacterias degradadoras de hidrocarburos [215] para evaluar la técnica de biorremediación por bioaumentación y se determinó la toxicidad de los ramnolípidos.

Se realizó un primer ensayo en medio líquido en el laboratorio, posteriormente se diseñaron microcosmos con suelos contaminados expresamente con petróleo crudo Mesa 30, y por último se aplicó el estudio a parcelas reales contaminadas.

La aplicación de los ramnolípidos en biorremediación no requiere de alta pureza, por esto se emplea el caldo libre de células o crudo de ramnolípidos. Sin embargo, se

evalúa la toxicidad del crudo para descartar la presencia otros compuestos perjudiciales producidos por la bacteria [22].

Los ensayos a escala de laboratorio permitieron comprobar los efectos de las bacterias y los ramnolípidos en la degradación de petróleo. En los cromatogramas (**Figura 27**), se observó la disminución y desaparición de los picos, cuando se bioestimularon los cultivos con ramnolípidos respecto a los controles bióticos y abióticos. La disminución y desaparición de picos se debe a la degradación y metabolización de compuestos en el medio de cultivo [92]. La estimulación del cultivo mixto incrementa al doble la tasa de mejora que se describe en trabajo previos similares; alcanzándose un valor de 61.46 % (**Tabla 38**). El cultivo mixto utilizado está compuesto por cuatro cepas que degradan diferentes fracciones del petróleo crudo, así como otros derivados: queroseno, diésel, gasolina y turbo combustible; con lo que se logra un proceso de degradación más eficiente [215].

Los resultados a escala de laboratorio evidenciaron la influencia de los ramnolípidos en la degradación de hidrocarburos y sentaron las bases para evaluar su efecto en la biorremediación por bioestimulación en microcosmos y parcelas.

En el ensayo de laboratorio se empleó una concentración de ramnolípidos igual a la CMC y en microcosmos y parcelas una inferior para favorecer la solubilización de los hidrocarburos en el suelo. En estudios previos se informó que concentraciones inferiores a la CMC incrementaron la solubilidad aparente de los hidrocarburos formando agregados con una solubilidad molar considerablemente mayor con respecto a la alcanzada a concentraciones de ramnolípidos superiores a la CMC [30].

Tabla 38. Listado de ensayos a escala de laboratorio de degradación de hidrocarburos empleando biotensioactivos.

Biotensioactivo	Contaminante	Condiciones de cultivo	Tasas de degradación (%)	Tasa de mejora de la degradación (%)	Referencia
Ramrólpidos	Crudo Casablanca	RL-500 mg.L ⁻¹ , 20 días en medio líquido con agitación	Consortio: 61,86 Consortio + RL: 71,00	12,87 *	Abalos y cols., 2004 [89]
Lipopéptidos	Diésel	21 días en medio líquido con agitación	Consortio: 31,44 Consortio + LP: 43,52	38,42	Mnif y cols., 2015 [90]
Ramrólpidos	Diésel	RL- 120 mg.L ⁻¹ , 7 días, Lodo activado en medio líquido	Consortio – 47 Consortio + RL: 75	37,33 *	Zdarta y cols., 2016 [91]
Lipopéptidos	Diésel	21 días en medio líquido con suelo en agitación	Consortio – 43,54 Consortio + LP: 48,85	12,19	Mnif y cols., 2017 [92]
Ramrólpidos	Petróleo crudo	RL-1xCMC, 28 días en medio líquido con agitación	CM – 29,88 CM + RL: 78,03	61,46	Esta investigación

RL-ramrólipido, LP-lipopétido, CM: cultivo mixto * Estas tasas se calcularon a partir de los resultados publicados

Esto favorece la disminución de los costos de aplicación de la bioestimulación con ramnolípidos como alternativa de la biorremediación.

La biorremediación exitosa depende de la capacidad metabólica de las bacterias para crecer y degradar los contaminantes, viabilidad del inóculo y la microbiota endógena [172, 214]. Durante el estudio en microcosmos se comprobó la presencia de bacterias degradadoras de hidrocarburos viables y en concentraciones suficientes para lograr un buen proceso de degradación. El crecimiento observado fue semejante al informado por otros autores [102, 172]. El crecimiento de microorganismos en los microcosmos con bioestimulación con ramnolípidos (BE) fue mayor que en el resto de los tratamientos (BA y BA+BE). En los primeros días se degradan los compuestos alifáticos de cadenas cortas ($C \leq 12$), que son empleados en el crecimiento y una vez agotados se enlentece este [101]. Sin embargo, debido a que los ramnolípidos incrementan la biodisponibilidad de compuestos más complejos, los microorganismos presentes continuaron creciendo.

Habitualmente varios factores influyen en la biodegradación de compuestos orgánicos en suelos contaminados, incluyendo la microbiota activa, la biodisponibilidad del contaminante y las condiciones ambientales. La biodisponibilidad es un factor limitante para el éxito del proceso de biodegradación [216]. Se han informado tasas de incremento de degradación empleando biotensioactivos de 20 a 90 % (**Tabla 39**). La aplicación de ramnolípidos en la biorremediación de hidrocarburos es un fenómeno complejo, influenciado por los componentes del suelo (presencia de arcillas, rocas, etc.) y propiedades de la fase acuosa (concentración de ramnolípidos, pH, fuerzas iónicas, materia orgánica disuelta, etc.) [30]. El hecho de favorecer la degradación de

Tabla 39. Listado de ensayos en microcosmos de degradación de hidrocarburos empleando biotensioactivos.

Biotensioactivo (concentración)	Condiciones de ensayo	Tasas de degradación (%)	Tasa de mejora de la degradación (%)	Referencia
Ramrólpidos (1,5 g.L ⁻¹)	300 g de suelo de cultivo de arroz cercano a una estación de almacenamiento de petróleo crudo, 30 días	Control: 1,8 RL:16,8	89,29	Patowary y cols., 2018 [172]
Ramrólpidos (20 g.L ⁻¹)	1 kg de suelo contaminado con petróleo crudo (35 g.kg ⁻¹), 35 días	CM: 63,5 CM + RL: 81,9 RL: 39 5	28,97 < 1	Xue y cols., 2020 [83]
Lipopetidos (0,2 %)	50 g de suelo impregnaos en hidrocarburos poli aromáticos, 32 días	Control: 35,98 LPP:45,12	20,62	Bezza y cols., 2017 [102]
Ramrólpidos	1 kg de suelo contaminado con petróleo crudo (50 g.kg⁻¹), 30 días	CM: 30,28 CM + RL: 33,85 RL: 55,22	38,71 45,16	Esta investigación

algunos compuestos provoca la inhibición de la degradación de otros. Aun cuando los efectos positivos de la aplicación de biotensioactivos en la biodegradación de hidrocarburos, han sido demostrados en las últimas dos décadas [83, 90, 98, 160, 172], también han sido informados algunos efectos negativos. Se han propuesto varios factores y mecanismos para explicar los efectos inhibitorios: (I) la toxicidad que puede tener por la capacidad de lisis celular, incrementar la permeabilidad celular o de solubilizar compuestos tóxicos, (II) efectos físico-químicos que inducen interacciones célula-sustrato no deseadas, (III) disminución de la biodisponibilidad de los hidrocarburos al quedar atrapados en las micelas, (IV) el empleo del biotensioactivo como fuente de carbono preferencial [30, 101].

En las parcelas el crecimiento de microorganismos viables y degradadores no fue proporcional al obtenido en los microcosmos debido a la diferencia en las condiciones ambientales (menos controladas) de los ensayos, del suelo, la microbiota activa y del contaminante. No todas las bacterias están adaptadas a los suelos contaminados, el tipo la fuente de nitrógeno y fósforo, el tipo y biodisponibilidad de hidrocarburos y las interacciones de sinergia y competencia entre ellas, pudieran limitar el proceso de degradación [83].

Para que la biodegradación sea satisfactoria se requiere la desorción de los hidrocarburos del suelo, liberarse al agua y ser asimilados por las células a través de sus membranas. La tasa de transferencia de adsorbido (insoluble) a sorbido (soluble), se considera el paso limitante en la biodegradación [4].

La adición de ramnolípidos mejora la biodegradación de hidrocarburos, aunque los porcentajes alcanzados no son semejantes en parcelas y microcosmos. En primer

lugar, la microbiota autóctona en estos suelos es diferente y también influyen la complejidad de estructuras químicas de los contaminantes presentes, no poder controlar condiciones ambientales tales como humedad, temperatura, ciclos de luz, etc., fuentes de nitrógeno y fósforo. El contenido de nitrógeno en las parcelas era menor que en los microcosmos. Los procesos de degradación natural tienen lugar en 90 o más días, la bioestimulación con ramnolípidos evidenció los incrementos de degradación a los 30 días, con valores superiores al 20 %.

La degradación de los hidrocarburos del petróleo habitualmente decrece en el orden de n-alcenos, alcanos ramificados, aromáticos de bajo peso molecular, monoaromáticos, alcanos cíclicos, aromáticos policíclicos y asfaltenos [101]. La adición de ramnolípidos en las parcelas incrementó la degradación de HTP, GA y aromáticos. En estudios previos se demostró la efectividad de los ramnolípidos en solubilizar e incrementar la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos de desorción lenta, incluso en suelos donde previamente se habían aplicado otros métodos de biorremediación [217]. Las tasas de incremento de la degradación de HTP y aromáticos calculadas en las parcelas fueron 10 % menores a las calculadas en los microcosmos, sin embargo, la degradación de GA mejoró en 86,51 % en la parcela mientras que en los microcosmos no hubo diferencia entre los tratamientos.

Este resultado se debe a efectos previamente confirmados: incremento de la biodisponibilidad y solubilidad de las moléculas, alteración de algunas interacciones microbianas, aumento de la afinidad celular por los hidrocarburos y estimulación del crecimiento de bacterias degradadoras empleando como fuente de carbono los hidrocarburos contaminantes [30].

Como el petróleo crudo es una mezcla compleja de hidrocarburos, su grado de toxicidad, carcinogenicidad y mutagenicidad está condicionado por las diferentes estructuras químicas presentes. Para la biorrecuperación de suelos contaminados con hidrocarburos, además de la degradación de estos, el suelo debe estar apto para la vida. Los valores de toxicidad aguda obtenidos con *Eisenia andrei* (lombriz de tierra) califican el suelo como restaurado ya que este es un modelo ampliamente usado y aceptado para tales fines.

5.5.3. Recuperación de petróleo crudo en columnas empacadas

Los biotensioactivos empleados en los procesos de MEOR deben tener una buena actividad superficial e interfacial, así como ser estables en condiciones ambientales extremas que generalmente prevalecen en los reservorio [218]. La mayoría de los estudios con ramnolípidos producidos por *Pseudomonas spp.* se concentran en sus aplicaciones en la biorremediación y actividad antimicrobiana [143]; sin embargo, han sido empleados en procesos de MEOR por su capacidad de movilizar el crudo atrapado en los reservorios a través de la disminución de la tensión interfacial, formar emulsiones y otros procesos [124].

Los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A redujeron la tensión superficial a 29,06 mN.m⁻¹ y formaron emulsiones estables durante 60 días con petróleo crudo y queroseno, en un amplio rango de pH, temperatura y salinidad. Estas propiedades son deseables para la aplicación de biotensioactivos en MEOR. La aplicabilidad de los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A en la recuperación de crudo, se evaluó a escala de laboratorio empleando el modelo de columna empacada, este ha sido ampliamente usado por ser sencillo, barato, rápido y seguro [185, 219–221].

Los resultados obtenidos fueron aceptables: 19 - 21 % de recuperación adicional (AOR) con soluciones cuyas concentraciones eran cercanas a la CMC. Gudiña y colaboradores informaron que bajos valores de concentración del biotensioactivo (cercanos a la CMC) son suficientes para movilizar el crudo atrapado en las rocas [142].

Los mecanismos de remoción del crudo de la roca empleando biotensioactivos son complejos, se integran procesos interfaciales, superficiales y de emulsificación. Primero, en la fase de movilización los biotensioactivos induce la reducción de las tensiones superficiales e interfaciales, con lo que se reduce la fuerza capilar y el ángulo de contacto entre la roca y el crudo [124]. Este proceso facilita que las interacciones las moléculas del biotensioactivo sean más fuertes con la arena que con el crudo, por lo tanto, se mejora la recuperación de crudo de la arena. Posteriormente la conformación micelar de moléculas del biotensioactivo que se agrupan dentro de los extremos hidrofóbicos y las moléculas apolares permite la incorporación de moléculas de crudo y la solubilización de las mismas. Este proceso se refiere al movimiento del crudo en el agua propiciado por el exterior polar de las micelas, las que aumentan la fluidez de este en la emulsión y su movilidad en la columna de arena [26].

En general, estos resultados están de acuerdo con otros informados previamente. El estudio de Armani y colaboradores demostró una recuperación adicional de 23 % empleando una solución de ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* MM1011, con una concentración equivalente a una vez la CMC [185]. Mientras que, con una solución 2 % v/v de ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* WJ-1 [222], también se alcanzó una recuperación de 23 %.

Índices de recuperación de petróleo crudo menores fueron informados al adicionar los ramnolípidos de *P. aeruginosa* Pa4, 12 % [223] y *P. aeruginosa* HATH, 5 % [224]. Con una solución de 500 ppm de los ramnolípidos de *P. aeruginosa* (Gen bank GQ241354) se recuperó el 15,5 % de crudo atrapado [2]. En otra investigación desarrollada durante dos meses, en la que se inyectaron ramnolípidos en una concentración equivalente a la CMC, el índice de recobro fue de 9,25 % [123].

Recientemente, empleando un micromodelo de recuperación con ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* HAK01, la recuperación alcanzó el 43 % [200]. Con una combinación de quitosan y ramnolípidos en columna empacada con arena, se recuperó entre el 10,8 y el 34,28 % de crudo, en función de las concentraciones de ambos componentes.

Las diferencias de valores de recuperación informados en algunos estudios no solo se deben a la eficiencia del biotensioactivo, sino al modelo empleado, y a las condiciones de pH, temperatura, salinidad y tiempo [225].

5.6. Producción y aplicación sostenible de los ramnolípidos

Los biotensioactivos se han descrito apropiadamente como “biomoléculas multifuncionales del siglo XXI” [16]. Los resultados de las investigaciones están elevando notablemente las expectativas en la industria, particularmente en el saneamiento de los desechos de la industria petrolera y en su propio desarrollo [42]. Los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A tienen gran potencial para satisfacer parte de la demanda de tensioactivos de la industria petrolera cubana. Su demostrada capacidad de remoción de vanadio posibilita el diseño de sistemas de lavado para disminuir el impacto de la contaminación por los catalizadores agotados y

desechados, reutilizarlos y recuperar vanadio a partir de estos. La recuperación del metal, a su vez, podría permitir el uso del mismo en diversas aplicaciones teniendo en cuenta sus propiedades anticorrosivas y su capacidad de disminución de la radiación infrarroja.

El incremento de la atención hacia los biotensioactivos está vinculada al continuo énfasis en el desarrollo de una sociedad sostenible y armonizada con el medio ambiente, así como la necesidad de proteger a este último [4, 42]. Los ramnolípidos evaluados en esta investigación demostraron a escala de campo su capacidad de estimular la biodegradación de hidrocarburos contaminantes sin ocasionar efectos tóxicos. Estos se pueden utilizar en procesos de biorremediación, disminuyendo así el uso de bioestimulantes de origen sintético y el impacto de la industria petrolera en el medio ambiente.

Los ramnolípidos son elementos claves en los procesos de MEOR, debido a su tolerancia a condiciones extremas, su no toxicidad y su naturaleza ecoamigable [27]. Estas características se observaron en los ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A. Actualmente la aplicación de biotensioactivos producidos *in situ* es preferida en la industria petrolera internacional sobre la aplicación de los producidos *ex situ*. Con gran optimismo la comunidad científica trabaja por el incremento de la producción *ex situ* de biotensioactivos con precios competitivos para la aplicación en MEOR [26]. Además, la inyección en los yacimientos cubanos tiene como gran desafío la aceptación de la idea por la comunidad petrolera cubana.

La sostenibilidad solo es sostenible cuando es rentable [42], de ahí la necesidad de resaltar la viabilidad económica de la producción de biotensioactivos para uso

comercial. La estrategia de producción de ramnolípidos propuesta en esta investigación incrementa casi tres veces la productividad volumétrica, lo que supone una disminución de los costos del proceso. Adicionalmente para las aplicaciones planteadas no se requieren otras etapas de purificación, solo esterilizar el cultivo final obtenido, por lo que no se requiere el empleo de solventes ni se generan desechos. Por sus propiedades químico-físicas, 1 L de cultivo rinde 6 L de producto aplicable, elemento que también supone una disminución en los costos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6. CONCLUSIONES

1. Se seleccionó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* Y3-B1A, que produce mayoritariamente los ramnolípidos Rha-C10-C10 y Rha-Rha-C10-C10; estos reducen la tensión superficial a $24,98 \text{ mN.m}^{-1}$ con una CMC de $117,78 \text{ mg.L}^{-1}$, y forman emulsiones con índices de estabilidad superiores al 90 % en condiciones extremas de pH, salinidad y temperatura; lo que propicia su aplicación en la industria petrolera.
2. La estrategia de cultivo diseñada para obtener el crudo de ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A, combina las concentraciones de biomasa e inductor inicial con un cultivo semicontinuo alimentado e incrementa la productividad volumétrica de 0,259 a $0,753 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.
3. La aplicación de ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* Y3-B1A como agente de lavado removió el 85,5 % de vanadio de sedimentos contaminados, lo que favorece su empleo como alternativa para la remoción de este metal de matrices sólidas.
4. La bioestimulación con los ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A incrementó la biodegradación de hidrocarburos hasta un 87 % en condiciones ambientales no controladas, lográndose la restauración del suelo sin efectos tóxicos.
5. Con los ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A se recuperó el 21 % del petróleo crudo en columnas, confirmando su uso en procesos de recuperación asistida.

7. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la factibilidad económica de la producción a mediana escala de ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A.
2. Aplicar el crudo de ramnolípidos de *P. aeruginosa* Y3-B1A en los sistemas de tratamientos de residuales sólidos petrolizados de la industria petrolera cubana.
3. Diseñar con el crudo de ramnolípidos un sistema de lavado de los catalizadores hidrodesmetalizadores residuales de las refinerías para su recuperación o disposición final.
4. Realizar prueba piloto de aplicación del crudo de ramnolípidos en yacimiento de petróleo en declive.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akbari, S., Abdurahman, N. H., Yunus, R. M., Fayaz, F., & Alara, O. R. (2018). *Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review*. *Biotechnology Research and Innovation*, 2(1), 81–90. <https://doi.org/10.1016/J.BIORI.2018.09.001>
2. Sakthipriya, N., Kumar, G., Agrawal, A., Doble, M., & Sangwai, J. S. (2021). *Impact of Biosurfactants, Surfactin, and Rhamnolipid Produced from Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa, on the Enhanced Recovery of Crude Oil and Its Comparison with Commercial Surfactants*. *Energy and Fuels*, 35(12), 9883–9893. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.1c00679>
3. Farias, C. B. B., Almeida, F. C. G., Silva, I. A., Souza, T. C., Meira, H. M., Soares da Silva, R. de C. F., ... Sarubbo, L. A. (2021). *Production of green surfactants: Market prospects*. *Electronic Journal of Biotechnology*. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.02.002>
4. Dhanya, M. S. (2021). *Biosurfactant-enhanced bioremediation of petroleum hydrocarbons: potential issues, challenges, and future prospects*. In *Bioremediation for Environmental Sustainability* (pp. 215–250). INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820524-2.00010-9>
5. Sarubbo, L. A., Silva, M. da G. C., Durval, I. J. B., Bezerra, K. G. O., Ribeiro, B. G., Silva, I. A., ... Banat, I. M. (2022). *Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives*. *Biochemical Engineering Journal*, 181, 108377. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377>
6. Soares da Silva, R. de C. F., de Almeida, D. G., Brasileiro, P. P. F., Rufino, R. D., de Luna, J. M., & Sarubbo, L. A. (2019). *Production, formulation and cost estimation of a commercial biosurfactant*. *Biodegradation*, 30(4), 191–201. <https://doi.org/10.1007/s10532-018-9830-4>
7. Zeinali, S., & Tatian, S. (2019). *Vanadium removal from fuel oil and waste water in power plant using humic acid coated magnetic nanoparticles*. *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(4), 249–263.
8. Gan, C. dan, Chen, T., & Yang, J. yan. (2020). *Remediation of vanadium contaminated soil by alfalfa (Medicago sativa L.) combined with vanadium-resistant bacterial strain*. *Environmental Technology and Innovation*, 20, 101090. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101090>
9. Liao, Y., & Yang, J. (2020). *Remediation of vanadium contaminated soil by nano-hydroxyapatite*. *Journal of Soils and Sediments*, 20(3), 1534–1544. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02522-0>
10. Briffa, J., Sinagra, E., & Blundell, R. (2020). *Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans*. *Heliyon*, 6(9), e04691. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>
11. Xiao, X. Y., Yang, M., Guo, Z. H., Jiang, Z. C., Liu, Y. N., & Cao, X. (2015). *Soil vanadium pollution and microbial response characteristics from stone coal smelting district*. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)*, 25(4), 1271–1278. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(15\)63727-X](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(15)63727-X)
12. De Almeida, D. G., Soares Da Silva, R. de C. F., Luna, J. M., Rufino, R. D., Santos, V. A., Banat, I. M., & Sarubbo, L. A. (2016). *Biosurfactants: Promising*

- Molecules for Petroleum Biotechnology Advances*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1718. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01718>
13. Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M., & Alexandridis, P. (2020). *Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications*. *Advances in Colloid and Interface Science*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>
 14. Drakontis, C. E., & Amin, S. (2020). *Biosurfactants: Formulations, properties, and applications*. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.03.013>
 15. Akbari, S., Nour, A. H., Yunus, R. M., & Farhan, A. H. (2018). *Biosurfactants as promising multifunctional agent: A mini review*. *International Journal of Innovative Research and Scientific Studies*, 1(1), 1–6. <https://doi.org/10.53894/ijirss.v1i1.2>
 16. Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016, March). *Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century*. *International Journal of Molecular Sciences*. Switzerland. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>
 17. Dhanya, M. S. (2021). *Biosurfactant-enhanced bioremediation of petroleum hydrocarbons: potential issues, challenges, and future prospects*. In G. Saxena, V. Kumar, & M. Shah (Eds.), *Bioremediation for Environmental Sustainability* (pp. 215–250). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820524-2.00010-9>
 18. Sałek, K., & Euston, S. R. (2019). *Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation*. *Process Biochemistry*, 85, 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.027>
 19. Irerere, V. U., Tripathi, L., Marchant, R., McClean, S., & Banat, I. M. (2017). *Microbial rhamnolipid production: a critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(10), 3941–3951. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8262-0>
 20. Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2017). *Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant*. *Bioresource Technology*, 232, 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.047>
 21. Sivapathasekaran, C., & Sen, R. (2017). *Origin, properties, production and purification of microbial surfactants as molecules with immense commercial potential*. *Tenside, Surfactants, Detergents*, 54(2), 92–104. <https://doi.org/10.3139/113.110482>
 22. Dobler, L., Ferraz, H. C., Araujo de Castilho, L. V., Sangenito, L. S., Pasqualino, I. P., Souza dos Santos, A. L., ... Almeida, R. V. (2020). *Environmentally friendly rhamnolipid production for petroleum remediation*. *Chemosphere*, 252. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126349>
 23. Chong, H., & Li, Q. (2017). *Microbial production of rhamnolipids: Opportunities, challenges and strategies*. *Microbial Cell Factories*. England: BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0753-2>
 24. Kashif, A., Rehman, R., Fuwad, A., Shahid, M. K., Dayarathne, H. N. P., Jamal, A., ... Choi, Y. (2022). *Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants – A critical review*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 306, 102718.

- <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102718>
25. Zhao, F., Shi, R., Ma, F., Han, S., & Zhang, Y. (2018). *Oxygen effects on rhamnolipids production by Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0888-9>
 26. Geetha, S. J., Banat, I. M., & Joshi, S. J. (2018). *Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR)*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.010>
 27. Varjani, S., Rakholiya, P., Yong Ng, H., Taherzadeh, M. J., Hao Ngo, H., Chang, J. S., ... Bui, X. T. (2021). *Bio-based rhamnolipids production and recovery from waste streams: Status and perspectives*. *Bioresource Technology*, 319, 124213. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124213>
 28. Roy, A. (2018). *A Review on the Biosurfactants: Properties, Types and its Applications*. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*, 08(01), 1–5. <https://doi.org/10.4172/2090-4541.1000248>
 29. Zeng, Z., Liu, Y., Zhong, H., Xiao, R., Zeng, G., Liu, Z., ... Qin, L. (2018). *Mechanisms for rhamnolipids-mediated biodegradation of hydrophobic organic compounds*. *Science of the Total Environment*, 634, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.349>
 30. Liu, G., Zhong, H., Yang, X., Liu, Y., Shao, B., & Liu, Z. (2018). *Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: A review*. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(4), 796–814. <https://doi.org/10.1002/bit.26517>
 31. Suganthi, S. H., Murshid, S., Sriram, S., & Ramani, K. (2018). *Enhanced biodegradation of hydrocarbons in petroleum tank bottom oil sludge and characterization of biocatalysts and biosurfactants*. *Journal of Environmental Management*, 220, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.120>
 32. Vandana, P., & Singh, D. (2018). *Review on Biosurfactant Production and its Application*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(08), 4228–4241. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.708.443>
 33. Nikolova, C., & Gutierrez, T. (2020). *Use of Microorganisms in the Recovery of Oil From Recalcitrant Oil Reservoirs: Current State of Knowledge, Technological Advances and Future Perspectives*. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02996>
 34. Safdel, M., Anbaz, M. A., Daryasafar, A., & Jamialahmadi, M. (2017). *Microbial enhanced oil recovery, a critical review on worldwide implemented field trials in different countries*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 74, 159–172. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.02.045>
 35. Randhawa, K. K. S., & Rahman, P. K. S. M. (2014). *Rhamnolipid biosurfactants-past, present, and future scenario of global market*. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00454>
 36. Singh, P., Patil, Y., & Rale, V. (2019). *Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies*. *Journal of Applied Microbiology*, 126(1), 2–13. <https://doi.org/10.1111/jam.14057>
 37. Magri, M., & Abdel-Mawgoud, A. M. (2022). *Identification of putative producers of rhamnolipids/glycolipids and their transporters using genome mining*. *Current*

- Research in Biotechnology, 4, 152–166. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.02.002>
38. Abalos, A., Maximo, F., Manresa, M. A., & Bastida, J. (2002). *Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa AT10*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 77(7), 777–784. <https://doi.org/10.1002/jctb.637>
39. Patel, P., Bhatt, S., Patel, H., Sayyed, R. Z., & Aguilar-Marcelino, D. (2022). *Biosurfactant A Biomolecule and its Potential Applications*. In R. Z. Sayyed & H. A. El-Enshasy (Eds.), *Microbial Surfactants V2: Applications in Food and Agriculture* (pp. 63–81). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1201/9781003247739-4>
40. Fenibo, E. O., Douglas, S. I., & Stanley, H. O. (2019). *A Review on Microbial Surfactants: Production, Classifications, Properties and Characterization*. Journal of Advances in Microbiology, 18(3), 1–22. <https://doi.org/10.9734/jamb/2019/v18i330170>
41. Kaczorek, E., Pacholak, A., Zdarta, A., Smulek, W., Kaczorek, E., Pacholak, A., ... Smulek, W. (2018). *The Impact of Biosurfactants on Microbial Cell Properties Leading to Hydrocarbon Bioavailability Increase*. Colloids and Interfaces, 2(3), 35. <https://doi.org/10.1002/cite.201855328>
42. Olasanmi, I. O., & Thring, R. W. (2018). *The role of biosurfactants in the continued drive for environmental sustainability*. Sustainability, 10, 4817. <https://doi.org/10.3390/su10124817>
43. Varjani, S., & Upasani, V. N. (2019). *Evaluation of rhamnolipid production by a halotolerant novel strain of Pseudomonas aeruginosa*. Bioresource Technology, 288, 121577. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121577>
44. He, N., Wu, T., Jiang, J., Long, X., Shao, B., & Meng, Q. (2017). *Toward high-efficiency production of biosurfactant rhamnolipids using sequential fed-batch fermentation based on a fill-and-draw strategy*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 157(3), 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.007>
45. Suh, S. J., Invally, K., & Ju, L.-K. K. (2019). *Rhamnolipids: Pathways, Productivities, and Potential*. In D. G. Hayes, D. K. Y. Solaiman, & R. D. Ashby (Eds.), *Biobased Surfactants: Synthesis, Properties, and Applications* (Second Edi., pp. 169–203). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812705-6.00005-8>
46. Tiso, T., Zauter, R., Tulke, H., Leuchtle, B., Li, W.-J. J., Behrens, B., ... Blank, L. M. (2017). *Designer rhamnolipids by reduction of congener diversity: Production and characterization*. Microbial Cell Factories, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0838-y>
47. Jarvis, F. G., & Johnson, M. J. (1949). *A Glyco-lipide Produced by Pseudomonas Aeruginosa*. Journal of the American Chemical Society, 71(12), 4124–4126. <https://doi.org/10.1021/ja01180a073>
48. Dobler, L., Vilela, L. F., Almeida, R. V., & Neves, B. C. (2016). *Rhamnolipids in perspective: Gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting*. New Biotechnology, 33(1), 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.09.005>
49. Wittgens, A., Kovacic, F., Müller, M. M., Gerlitzki, M., Santiago-Schübel, B.,

- Hofmann, D., ... Rosenau, F. (2017). *Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors*. Applied Microbiology and Biotechnology, 101(7), 2865–2878. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8041-3>
50. Dos Santos, A. S., Pereira, N., & Freire, D. M. G. (2016). *Strategies for improved rhamnolipid production by Pseudomonas aeruginosa PA1*. PeerJ, 2016(5), 1–16. <https://doi.org/10.7717/peerj.2078>
51. Rikalović, M. G., Vrvić, M. M., & Karadžić, I. M. (2015). *Rhamnolipid biosurfactant from Pseudomonas aeruginosa - From discovery to application in contemporary technology*. Journal of the Serbian Chemical Society, 80(3), 279–304. <https://doi.org/10.2298/JSC140627096R>
52. Najmi, Z., Ebrahimipour, G., Franzetti, A., & Banat, I. M. (2018). *Investigation of physico-chemical properties and characterization of produced biosurfactant by selected indigenous oil-degrading bacterium*. Iranian Journal of Public Health, 47(8), 1151–1159.
53. Zhao, F., Shi, R., Zhao, J., Li, G., Bai, X., Han, S., & Zhang, Y. (2015). *Heterologous production of Pseudomonas aeruginosa rhamnolipid under anaerobic conditions for microbial enhanced oil recovery*. Journal of Applied Microbiology, 118(2), 379–389. <https://doi.org/10.1111/jam.12698>
54. Tiwary, M., & Dubey, A. K. (2018). *Characterization of Biosurfactant Produced by a Novel Strain of Pseudomonas aeruginosa, Isolate ADMT1*. Journal of Surfactants and Detergents, 21(1), 113–125. <https://doi.org/10.1002/jsde.12021>
55. Cheng, T., Liang, J., He, J., Hu, X., Ge, Z., & Liu, J. (2017). *A novel rhamnolipid-producing Pseudomonas aeruginosa ZS1 isolate derived from petroleum sludge suitable for bioremediation*. AMB Express, 7(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0418-x>
56. Gogoi, D., Bhagowati, P., Gogoi, P., Bordoloi, N. K., Rafay, A., Dolui, S. K., & Mukherjee, A. K. (2016). *Structural and physico-chemical characterization of a dirhamnolipid biosurfactant purified from Pseudomonas aeruginosa: Application of crude biosurfactant in enhanced oil recovery*. RSC Advances, 6, 70669–70681. <https://doi.org/10.1039/c6ra11979d>
57. Mnif, I., & Ghribi, D. (2015). *Microbial derived surface active compounds: properties and screening concept*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 31(7), 1001–1020. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1866-6>
58. Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2001). *Natural roles of biosurfactants*. Environmental Microbiology, 3(4), 229–236. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x>
59. Pardhi, D., Panchal, R. and Rajput, K. (2020). *Screening of Biosurfactant Producing Bacteria and Optimization of Production Conditions for Pseudomonas guguanensis D30*. Bioscience Biotechnology Research Communications, 13(1), 170–179.
60. Ambust, S., Das, A. J., & Kumar, R. (2021). *Bioremediation of petroleum contaminated soil through biosurfactant and Pseudomonas sp. SA3 amended design treatments*. Current Research in Microbial Sciences, 2, 100031. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100031>
61. Li, L., Shen, X., Zhao, C., Liu, Q., Liu, X., & Wu, Y. (2019). *Biodegradation of dibenzothiophene by efficient Pseudomonas sp. LKY-5 with the production of a*

- biosurfactant*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 176, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.070>
62. Hentati, D., Chebbi, A., Hadrich, F., Frikha, I., Rabanal, F., Sayadi, S., ... Chamkha, M. (2019). *Production, characterization and biotechnological potential of lipopeptide biosurfactants from a novel marine Bacillus stratosphericus strain FLU5*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 167, 441–449. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.036>
63. Xu, M., Fu, X., Gao, Y., Duan, L., Xu, C., Sun, W., ... Xiao, X. (2020). *Characterization of a biosurfactant-producing bacteria isolated from Marine environment: Surface activity, chemical characterization and biodegradation*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), 104277. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104277>
64. Reis, R. S., Pacheco, G. J., Pereira, A. G., & Freire, D. M. G. (2013). *Biosurfactants: Production and Applications*. In R. Chamy & F. Rosenkranz (Eds.), *Biodegradation - Life of Science*. London, United Kingdom: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/56144>
65. Benincasa, M., Marqués, A., Pinazo, A., & Manresa, A. (2010). *Rhamnolipid Surfactants: Alternative Substrates, New Strategies*. In R. Sen (Ed.), *Biosurfactants* (pp. 170–184). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_13
66. Bertrand, B., Mart, F., Sarela, N., Morales-guzm, D., & Trejo-hern, R. (2018). *Statistical Design , a Powerful Tool for Optimizing Biosurfactant Production : A Review*, (8), 1–18. <https://doi.org/10.3390/colloids2030036>
67. Walter, V., Sylatk, C., & Hausmann, R. (2010). *Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms*. In R. Sen (Ed.), *Biosurfactants* (Springer N., pp. 1–13). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_1
68. Gaur, V. K., Sharma, P., Sirohi, R., Varjani, S., Taherzadeh, M. J., Chang, J. S., ... Kim, S. H. (2022). *Production of biosurfactants from agro-industrial waste and waste cooking oil in a circular bioeconomy: An overview*. *Bioresource Technology*, 343, 126059. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126059>
69. Li, Q. (2017). *Rhamnolipid synthesis and production with diverse resources*. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 11(1), 27–36. <https://doi.org/10.1007/s11705-016-1607-x>
70. Henkel, M., Geissler, M., Weggenmann, F., & Hausmann, R. (2017). *Production of microbial biosurfactants: Status quo of rhamnolipid and surfactin towards large-scale production*. *Biotechnology Journal*, 12(7), 1–10. <https://doi.org/10.1002/biot.201600561>
71. Armendáriz, B. P., Cal, C., Girgis, E., Kassis, E., Daniel, L., & Martínez, O. (2019). *Use of waste canola oil as a low - cost substrate for rhamnolipid production using Pseudomonas aeruginosa*. *AMB Express*, 9(61). <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0784-7>
72. Rane, A. N., Baikar, V. V, Ravi Kumar, D. V., & Deopurkar, R. L. (2017). *Agro-industrial wastes for production of biosurfactant by Bacillus subtilis ANR 88 and its application in synthesis of silver and gold nanoparticles*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00492>

73. Yañez-Ocampo, G., Somoza-Coutiño, G., Blanco-González, C., & Wong-Villarreal, A. (2017). *Utilization of agroindustrial waste for biosurfactant production by native bacteria from chiapas*. *Open Agriculture*, 2(1), 341–349. <https://doi.org/10.1515/opag-2017-0038>
74. Gaur, V. K., Sharma, P., Gupta, S., Varjani, S., Srivastava, J. K., Wong, J. W. C., & Ngo, H. H. (2022). *Opportunities and challenges in omics approaches for biosurfactant production and feasibility of site remediation: Strategies and advancements*. *Environmental Technology and Innovation*, 25, 102132. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102132>
75. Jimoh, A. A., & Lin, J. (2019). *Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 184, 109607. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109607>
76. Jiang, J., Zu, Y., Li, X., Meng, Q., & Long, X. (2020). *Recent progress towards industrial rhamnolipids fermentation: Process optimization and foam control*. *Bioresource Technology*, 298, 122394. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122394>
77. Md Noh, N. A., Mohd Salleh, S., & Yahya, A. R. M. (2014). *Enhanced rhamnolipid production by Pseudomonas aeruginosa USM-AR2 via fed-batch cultivation based on maximum substrate uptake rate*. *Letters in Applied Microbiology*, 58(6), 617–623. <https://doi.org/10.1111/lam.12236>
78. Roy, A. (2017). *Fundamentals of Renewable Energy and Applications A Review on the Biosurfactants: Properties, Types and its Applications*. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*, 8(1), 1–5. <https://doi.org/10.1177/1753944715597623>
79. Salihu, A., Abdulkadir, I., & Almoustapha, M. N. (2009). *An Investigation for Potential Development on Biosurfactants*. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 3(5), 111–117.
80. Islas, D. J., Medina, S. A., Noel, J., Rodríguez, G., Biotechnología, D. De, P., U. P. D. P. C., ... Sahagún, C. (2010). *Propiedades, Aplicaciones y producción de biotensoactivos*. *Revistas Internacional de Contaminación Ambiental*, 26(1), 65–84.
81. Saharan, B. S., Sahu, R. K., & Sharma, D. (2012). *A review on biosurfactants: Fermentation, current developments and perspectives*. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 2011(GEJB-29), 1–14.
82. Arrigoni-Martelli, E. (1995). *First European Congress of Pharmacology*. *Drugs of Today*, 31(8), 635–637. <https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000124>
83. Xue, S. wen, Huang, C., Tian, Y. xin, Li, Y. bing, Li, J., & Ma, Y. ling. (2020). *Synergistic Effect of Rhamnolipids and Inoculation on the Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soils by Bacterial Consortia*. *Current Microbiology*, 77(6), 997–1005. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01899-3>
84. Imam, A., Kanaujia, P. K., Ray, A., & Suman, S. K. (2021). *Removal of Petroleum Contaminants Through Bioremediation with Integrated Concepts of Resource Recovery: A Review*. *Indian Journal of Microbiology*, 61(3), 250–261. <https://doi.org/10.1007/s12088-021-00928-4>
85. Eras-Muñoz, E., Farré, A., Sánchez, A., Font, X., & Gea, T. (2022). *Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications*. *Bioengineered*,

- 13(5), 12365–12391. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2074621>
86. Liu, Y., Zeng, G., Zhong, H., Wang, Z., Liu, Z., Cheng, M., ... Liu, S. (2017). *Effect of rhamnolipid solubilization on hexadecane bioavailability: enhancement or reduction?* *Journal of Hazardous Materials*, 322, 394–401. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.025>
87. Charles Oluwaseun, A., Julius Kola, O., Mishra, P., Ravinder Singh, J., Kumar Singh, A., Singh Cameotra, S., & Oluwasesan Micheal, B. (2017). *Characterization and optimization of a rhamnolipid from Pseudomonas aeruginosa C1501 with novel biosurfactant activities.* *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 6, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2017.07.001>
88. Shi, J., Chen, Y., Liu, X., & Li, D. (2021). *Rhamnolipid production from waste cooking oil using newly isolated halotolerant Pseudomonas aeruginosa M4.* *Journal of Cleaner Production*, 278, 123879. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123879>
89. Abalos, A., Viñas, M., Sabaté, J., Manresa, M. A., & Solanas, A. M. (2004). *Enhanced Biodegradation of Casablanca Crude Oil by A Microbial Consortium in Presence of a Rhamnolipid Produced by Pseudomonas Aeruginosa AT10.* *Biodegradation*, 15(4), 249–260. <https://doi.org/10.1023/B:BIOD.0000042915.28757.fb>
90. Mnif, I., Mnif, S., Sahnoun, R., Maktouf, S., Ayedi, Y., Ellouze-Chaabouni, S., & Ghribi, D. (2015). *Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants.* *Environmental Science and Pollution Research*, 22(19), 14852–14861. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4488-5>
91. Zdarta, A., Smulek, W., Pietraszak, E., Kaczorek, E., & Olszanowski, A. (2016). *Hydrocarbons biodegradation by activated sludge bacteria in the presence of natural and synthetic surfactants.* *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 51(14), 1262–1268. <https://doi.org/10.1080/10934529.2016.1215194>
92. Mnif, I., Sahnoun, R., Ellouze-Chaabouni, S., & Ghribi, D. (2017). *Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium.* *Process Safety and Environmental Protection*, 109, 72–81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.02.002>
93. Durval, I., Rufino, R., & Sarubbo, L. (2022). *Biosurfactant as an Environmental Remediation Agent: Toxicity, Formulation, and Application in the Removal of Petroderivate in Sand and Rock Walls.* *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(1), 34–48. <https://doi.org/10.33263/briac121.034048>
94. Meng, L., Li, W., Bao, M., & Sun, P. (2019). *Effect of surfactants on the solubilization, sorption and biodegradation of benzo (a) pyrene by Pseudomonas aeruginosa BT-1.* *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 96, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2019.01.007>
95. Sharma, S., Verma, R., & Pandey, L. M. (2019). *Crude oil degradation and biosurfactant production abilities of isolated Agrobacterium fabrum SLAJ731.* *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21(August), 101322. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101322>

96. Ben Ayed, H., Jemil, N., Maalej, H., Bayoudh, A., Hmidet, N., & Nasri, M. (2015). *Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from Bacillus amyloliquefaciens An6*. International Biodeterioration and Biodegradation, 99, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.12.009>
97. Ali, I., Yu, Z., Li, J., Ndayisenga, F., Hu, B., Ahmed, M., & Yang, X. (2022). *Evaluation of di-rhamnolipid biosurfactants production by a novel Pseudomonas sp. S1WB : Optimization , characterization and effect on petroleum-hydrocarbon degradation*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 242, 113892. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113892>
98. Bezza, F. A., & Chirwa, E. M. N. (2015). *Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by Bacillus subtilis CN2*. Biochemical Engineering Journal, 101, 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.007>
99. Li, S., Pi, Y., Bao, M., Zhang, C., Zhao, D., Li, Y., ... Lu, J. (2015). *Effect of rhamnolipid biosurfactant on solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Marine Pollution Bulletin, 101(1), 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.059>
100. Dhote, M., Kumar, A., & Juwarkar, A. (2018). *Petroleum Contaminated Oil Sludge Degradation by Defined Consortium: Influence of Biosurfactant Production*. Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences, 88(2), 517–523. <https://doi.org/10.1007/s40011-016-0778-z>
101. Bezza, F. A., Beukes, M., & Chirwa, E. M. N. (2015). *Application of biosurfactant produced by Ochrobactrum intermedium CN3 for enhancing petroleum sludge bioremediation*. Process Biochemistry, 50(11), 1911–1922. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.07.002>
102. Bezza, F. A., & Chirwa, E. M. N. (2017). *The role of lipopeptide biosurfactant on microbial remediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil*. Chemical Engineering Journal, 309, 563–576. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.10.055>
103. Hentati, D., Chebbi, A., Mahmoudi, A., Hadrich, F., Cheffi, M., Frikha, I., ... Chamkha, M. (2021). *Biodegradation of hydrocarbons and biosurfactants production by a newly halotolerant Pseudomonas sp. strain isolated from contaminated seawater*. Biochemical Engineering Journal, 166(November), 107861. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107861>
104. Rodríguez, O., Abalos, A., Vilasó, J., & Cabrera, J. G. (2017). *Screening and Characterization of Biosurfactant-Producing Bacteria Isolated from Contaminated Soils with Oily Wastes*. Journal of Environmental Treatment Techniques, 5(1), 5–11.
105. Gidudu, B., & Chirwa, E. M. N. (2022). *Evaluation of the toxicity of a rhamnolipid biosurfactant for its application in the optimization of the bio-electrokinetic remediation of petrochemical contaminated soil*. Cleaner Engineering and Technology, 9, 100521. <https://doi.org/10.1016/j.clet.2022.100521>
106. Zou, Q., Xiang, H., Jiang, J., Li, D., Aihemaiti, A., Yan, F., & Liu, N. (2019). *Vanadium and chromium-contaminated soil remediation using VFAs derived from food waste as soil washing agents: A case study*. Journal of Environmental Management, 232, 895–901. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.129>

107. Imtiaz, M., Rizwan, M. S., Xiong, S., Li, H., Ashraf, M., Shahzad, S. M., ... Tu, S. (2015). *Vanadium, recent advancements and research prospects: A review*. *Environment International*, 80, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.03.018>
108. Muhammad, S. A., Abubakar, S. I., Babashani, H., Asagbra, A. E., & Alhassan, A. J. (2020). *Assessment of Heavy Metals Concentration in Crude Oil Contaminated Water Samples of Three Communities of Ikpokpo, Atanba, and Okpele-Ama of Gbaramatu Kingdom, Along the Escravos River in Warri South West Local Government Area of Delta State, Nigeria*. *International Journal of Environment and Pollution Research*, 8(3), 41–59.
109. Rigñack, M., Sánchez, A., Reyes, A., & Ramón, G. (2020). *Reduction of heavy metals in Cuban light crude oil with the use of zeolite*. *Facultad de Ingeniería Química y Agronomía. Universidad de Oriente. Cuba*, 40(3), 17.
110. Bojórquez-Sánchez, S., Marmolejo-Rodríguez, A. J., Ruiz-Fernández, A. C., Sánchez-González, A., Sanchez-Cabeza, J. A., Bojórquez-Leyva, H., & Pérez-Bernal, L. H. (2018). *Nickel and Vanadium natural enrichment in sediment cores near oil extraction sites in the Gulf of Mexico*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(4), 713–723. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.04.12>
111. Morales-Ramírez, Á. de J., Ramírez-López, A., Carrillo-Romo, F. de J., Martínez-Romero, G., & Vite-Martinez, P. (2010). *Caracterización de productos metálicos de catalizadores gastados utilizados en la industria petrolera*. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 1(2), 15–24.
112. Boveiri Shami, R., Shojaei, V., & Khoshdast, H. (2019). *Efficient cadmium removal from aqueous solutions using a sample coal waste activated by rhamnolipid biosurfactant*. *Journal of Environmental Management*, 231, 1182–1192. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.03.126>
113. Giraldo, Jd., Gutiérrez, S., & Merino, F. (2014). *Oil Emulsifying Activity and Removal of Heavy Metals By Pseudomonas aeruginosa Pb 25 Rhamnolipid*. *Revista Sociedad Química Perú*, 80(1), 35–44.
114. Luna, J. M., Rufino, R. D., & Sarubbo, L. A. (2016). *Biosurfactant from Candida sphaerica UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties*. *Process Safety and Environmental Protection*, 102, 558–566. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.05.010>
115. Wu, J., Zhang, J., Wang, P., Zhu, L., Gao, M., Zheng, Z., & Zhan, X. (2017). *Production of rhamnolipids by semi-solid-state fermentation with Pseudomonas aeruginosa RG18 for heavy metal desorption*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(11), 1611–1619. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1817-8>
116. Cieśla, J., Koczańska, M., & Bieganski, A. (2018). *An interaction of rhamnolipids with Cu²⁺ ions*. *Molecules*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/molecules23020488>
117. Tang, J., He, J., Qiu, Z., & Xin, X. (2019). *Metal removal effectiveness, fractions, and binding intensity in the sludge during the multiple washing steps using the combined rhamnolipid and saponin*. *Journal of Soils and Sediments*, 19(3), 1286–1296. <https://doi.org/10.1007/s11368-018-2106-0>
118. Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S.

- (2011). *Environmental applications of biosurfactants: Recent advances*. International Journal of Molecular Sciences, 12(1), 633–654. <https://doi.org/10.3390/ijms12010633>
119. Yang, B., He, J., Zhang, G., & Guo, J. (Eds.). (2021). *Applications of vanadium in the steel industry*. In Vanadium (pp. 267–332). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818898-9.00011-5>
120. Yang, B., He, J., Zhang, G., & Guo, J. (Eds.). (2021). *Development of the vanadium industry*. In Vanadium (pp. 487–520). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818898-9.00018-8>
121. Pradhan, A. K., & Pradhan, N. (2015). *Microbial Biosurfactant for Hydrocarbons and Heavy Metals Bioremediation*. In L. B. Sukla, N. Pradhan, S. Panda, & B. K. Mishra (Eds.), Soil Biology (Vol. 45, pp. 91–104). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19018-1_5
122. Singh, A. K., & Cameotra, S. S. (2013). *Efficiency of lipopeptide biosurfactants in removal of petroleum hydrocarbons and heavy metals from contaminated soil*. Environmental Science and Pollution Research, 20(10), 7367–7376. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1752-4>
123. Câmara, J. M. D. A., Sousa, M. A. S. B., Barros Neto, E. L., & Oliveira, M. C. A. (2019). *Application of rhamnolipid biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa in microbial-enhanced oil recovery (MEOR)*. Journal of Petroleum Exploration and Production Technology. <https://doi.org/10.1007/s13202-019-0633-x>
124. Niu, J., Liu, Q., Lv, J., & Peng, B. (2020). *Review on microbial enhanced oil recovery: Mechanisms, modeling and field trials*. Journal of Petroleum Science and Engineering, 192, 107350. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2020.107350>
125. Barrios, Y., Acosta, S., Sánchez, A., Toledo, A., González, F., & García, R. M. (2012). *Estudio y selección de bacterias aerobias degradadoras de hidrocarburos del petróleo aisladas de costas de Cuba*. Biotecnología Aplicada, 29(2), 73–79.
126. Toledo León, H. F. (2016). *Selección de bacterias productoras de biosurfactantes*. Tesis de Maestría. La Habana.
127. Chandrasekaran, E. V., & Bemiller, J. N. (1980). *11 - Constituent Analysis of Glycosaminoglycans*. (R. L. Whistler & J. N. B. T.-G. M. BeMiller, Eds.). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746208-0.50018-9>
128. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. Journal of Bacteriology, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
129. Pandey, K. K., Mayilraj, S., & Chakrabarti, T. (2002). *Pseudomonas indica sp. nov., a novel butane-utilizing species*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52(5), 1559–1567. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-5-1559>
130. Rufino, R. D., de Luna, J. M., de Campos Takaki, G. M., & Sarubbo, L. A. (2014). *Characterization and properties of the biosurfactant produced by Candida lipolytica UCP 0988*. Electronic Journal of Biotechnology, 17(1), 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2013.12.006>

131. Bailey JA, & Follis, D. (1996). *Metabolic stoichiometry and energetics*. In K. V. C. C. Martin. (Ed.), *Biochemical Engineering Fundamentals* (Second., pp. 228–306). McGraw-Hill International Editions.
132. Sodagari, M., Invally, K., & Ju, L. K. (2018). *Maximize rhamnolipid production with low foaming and high yield*. *Enzyme and Microbial Technology*, 110, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.10.004>
133. Chen, W., Qu, Y., Xu, Z., He, F., Chen, Z., Huang, S., & Li, Y. (2017). *Heavy metal (Cu, Cd, Pb, Cr) washing from river sediment using biosurfactant rhamnolipid*. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(19), 16344–16350. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9272-2>
134. Barrios San Martín, Y., Acosta Días, S., González Hernández, F., & Hayes García, R. (2014). *Optimización del medio de cultivo QBP para la producción de biomasa del consorcio BIOYAF*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(1), 171–176. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n1.37928>
135. Environmental Protection Agency. (1999). *Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Oil and Grease and Non-Polar Material Under the Clean Water Act and Resource Conservation and Recovery Act; Final Rule*. *Federal Register*, 64(93), 26315–26327.
136. Baird, R., Eaton, A., & Rice, E. (Eds.). (2017). *APHA-AWWA-WEF. Standar methods for the examination of water and wastewater* (23rd ed.). Washington DC.
137. García-Rivero, M., Saucedo-Castañeda, G., & Gutiérrez-Rojas, M. (2007). *Organic solvents improve hydrocarbon desorption and biodegradation in highly contaminated weathered soils*. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 6(4), 389–395. <https://doi.org/10.1139/s06-061>
138. Drews, A. W. (Ed.). (1998). *Manual on Hydrocarbon Analysis*. 6th Edition. West Conshohocken, PA: ASTM International. <https://doi.org/10.1520/MNL3-6TH-EB>
139. Gomez-Taylor, M. (2001). *Total Kjeldahl Nitrogen in Water and Biosolids by Automated Colorimetry with Preliminary Distillation/Digestion*. In *Science And Technology* (Vol. EPA-821-R-).
140. Margesin, R., Labbé, D., Schinner, F., Greer, C. W., & Whyte, L. G. (2003). *Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3085–3092. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3085-3092.2003>
141. Christina, P., Pereira, G., Valoura, R., Pavesi, T., Mendes, E., Costa, J., & Veríssimo, F. (2017). *Ecotoxicology and Environmental Safety Lethal and sub-lethal evaluation of Indigo Carmine dye and byproducts after TiO₂ photocatalysis in the immune system of Eisenia andrei earthworms*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 143, 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.043>
142. Gudiña, E. J., Pereira, J. F. B., Pereira, R. C., Coutinho, J. A. P., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2013). *Biosurfactant-producing and oil-degrading Bacillus subtilis strains enhance oil recovery in laboratory sand-pack columns*. *Journal of Hazardous Materials*, 261, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.071>
143. Sharma, R., Singh, J., & Verma, N. (2018). *Optimization of rhamnolipid*

- production from Pseudomonas aeruginosa PBS towards application for microbial enhanced oil recovery.* 3 Biotech, 8(1), 20. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1022-0>
144. Vakili-Nezhaad, G. R., Al-Wadhahi, M., Al-Haddabi, S., Vakilinejad, A., & Acree, W. E. (2019). *Surface tension of multicomponent organic mixtures: Measurement and correlation.* Journal of Molecular Liquids, 296, 112008. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112008>
 145. Samykannu, M., & Achary, A. (2017). *Utilization of Agro-Industry Residue for Rhamnolipid Production by P. aeruginosa AMB AS7 and Its Application in Chromium Removal.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 183(1), 70–90. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2431-6>
 146. Bharali, P., & Konwar, B. K. (2011). *Production and physico-chemical characterization of a biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa OBP1 isolated from petroleum sludge.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 164(8), 1444–1460. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9225-z>
 147. Saimmai, A., Rukadee, O., Onlamool, T., Sobhon, V., & Maneerat, S. (2012). *Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by a new and promising strain of Oleomonas sagaranensis AT18.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(10), 2973–2986. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1108-0>
 148. Kuhn, J., Müller, H., Salzig, D., & Czermak, P. (2015). *A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation.* Electronic Journal of Biotechnology, 18(3), 252–255. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.01.005>
 149. Sinclair, C. G. (2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* (D. H. 1. Bergey & J. G. Holt, Eds.) (9th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1939.s1-19.605>
 150. Stuart, B. H. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications.* Wiley. Retrieved from <https://books.google.com/cu/books?id=xQVog8RrJKcC>
 151. Bodour, Adria A.; Miller-Maier, R. M. (1998). *Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms.* Journal of Microbiological Methods, 32(3), 273–280.
 152. Shubhrasekhar, C., Supriya, M., Karthik, L., Gaurav, K., & Bhaskara Rao, K. V. (2013). *Isolation Characterization and application of Biosurfactant produced by Marine Actinobacteria isolated from Saltpan Soil from costal area of Andhra Pradesh, India.* Research Journal of Biotechnology, 8(1), 18–25.
 153. Tripathi, L., Irorere, V. U., Marchant, R., & Banat, I. M. (2018). *Marine derived biosurfactants: a vast potential future resource.* Biotechnol Lett, 40(11–12), 1441–1457. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2602-8>
 154. Saravanan, V., & Vijayakumar, S. (2012). *Isolation and screening of biosurfactant producing microorganisms from oil contaminated soil.* Journal Academic Industrial Research, 1(5), 264–268.
 155. Singh, V. (2012). *Biosurfactant-Isolation, Production, Purification & Significance.* International Journal of Scientific and Research Publication, 2(7), 2–5.
 156. Shahaliyan, F., Safahieh, A., & Abyar, H. (2015). *Evaluation of Emulsification Index in Marine Bacteria Pseudomonas sp. and Bacillus sp.* Arabian Journal for Science and Engineering, 40(7), 1849–1854. <https://doi.org/10.1007/s13369->

- 015-1663-4
157. Mahalingam P. U., & Sampath, N. (2014). *Isolation , characterization and identification of bacterial biosurfactant*. European Journal of Experimental Biology, 4(6), 59–64.
 158. Leite, G. G. F., Figueirôa, J. V., Almeida, T. C. M., Valôes, J. L., Marques, W. F., Duarte, M. D. D. C., & Gorchach-Lira, K. (2016). *Production of rhamnolipids and diesel oil degradation by bacteria isolated from soil contaminated by petroleum*. Biotechnology Progress, 32(2), 262–270. <https://doi.org/10.1002/btpr.2208>
 159. Elshikh, M., Funston, S., Chebbi, A., Ahmed, S., Marchant, R., & Banat, I. M. (2017). *Rhamnolipids from non-pathogenic Burkholderia thailandensis E264: Physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens*. New Biotechnology, 36, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.12.009>
 160. Torres, L. G., González, R., & Gracida, J. (2018). *Production and Application of No-purified Rhamnolipids in the Soil-washing of TPHs Contaminated Soils*. Asian Soil Research Journal, 1(1), 1–12. <https://doi.org/10.9734/ASRJ/2018/40924>
 161. Kopalle, P., Pothana, S. A., & Maddila, S. (2022). *Structural and Physicochemical Characterization of a Rhamnolipid Biosurfactant*. SSRN Electronic Journal, 41, 100905. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4113636>
 162. He, C., Dong, W., Li, J., Li, Y., Huang, C., & Ma, Y. (2017). *Characterization of rhamnolipid biosurfactants produced by recombinant Pseudomonas aeruginosa strain DAB with removal of crude oil*. Biotechnol Lett, 39(9), 1381–1388. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2370-x>
 163. EL-Amine Bendaha, M., Mebrek, S., Naimi, M., Tifrit2, A., Belaouni, H. A., & Abbouni, B. (2012). *Isolation and Comparison of Rhamnolipids Production in Pseudomonas aeruginosa P.B:2 and Pseudomonas fluorescens P.V:10*. Open Acces Scientific Reports, 1(12), 544. <https://doi.org/10.4172/scientificreports.544> Copyright:
 164. Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M. R., Casals, M., García, F., & Manresa, A. (2001). *Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by Pseudomonas aeruginosa AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes*. Langmuir, 17(5), 1367–1371. <https://doi.org/10.1021/la0011735>
 165. Antoniou, E., Fodelianakis, S., Korkakaki, E., & Kalogerakis, N. (2015). *Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strains using crude oil as carbon source*. Frontiers in Microbiology, 6(APR), 274. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00274>
 166. Haloi, S., Sarmah, S., Gogoi, S. B., & Medhi, T. (2020). *Characterization of Pseudomonas sp. TMB2 produced rhamnolipids for ex-situ microbial enhanced oil recovery*. 3 Biotech, 10(3), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2094-9>
 167. Monteiro, S. A., Sasaki, G. L., de Souza, L. M., Meira, J. A., de Araújo, J. M., Mitchell, D. A., ... Krieger, N. (2007). *Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa DAUPE 614*. Chemistry and Physics of Lipids, 147(1), 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2007.02.001>
 168. Christova, N., Tuleva, B., Cohen, R., Ivanova, G., Stoev, G., Stoilova-Disheva, M., & Stoineva, I. (2011). *Chemical characterization and physical and biological*

- activities of rhamnolipids produced by pseudomonas aeruginosa BN10.* Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences, 66 C(7–8), 394–405. <https://doi.org/10.1515/znc-2011-7-811>
169. Pereira, A. G., Pacheco, G. J., Tavares, L. F., Neves, B. C., Kronemberger, F. D. A., Reis, R. S., & Freire, D. M. G. (2013). *Optimization of biosurfactant production using waste from biodiesel industry in a new membrane assisted bioreactor.* Process Biochemistry, 48(9), 1271–1278. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.028>
170. Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & McLaughlin, J. L. (1982). *Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents.* Planta medica, 45(5), 31–34. Retrieved from https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/17396775/Brine_shrimp:_a_convenient_general_bioassay_for_active_plant_constituents_
171. Nogueira Felix, A. K., Martins, J. J. L., Lima Almeida, J. G., Giro, M. E. A., Cavalcante, K. F., Maciel Melo, V. M., ... Saraiva de Santiago Aguiar, R. (2019). *Purification and characterization of a biosurfactant produced by Bacillus subtilis in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 175, 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.062>
172. Patowary, R., Patowary, K., Kalita, M. C., & Deka, S. (2018). *Application of biosurfactant for enhancement of bioremediation process of crude oil contaminated soil.* International Biodeterioration and Biodegradation, 129, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.01.004>
173. Hogan, D. E., Tian, F., Malm, S. W., Olivares, C., Palos Pacheco, R., Simonich, M. T., ... Maier, R. M. (2019). *Biodegradability and toxicity of monorhamnolipid biosurfactant diastereomers.* Journal of Hazardous Materials, 364, 600–607. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.10.050>
174. Singh, A. K., & Cameotra, S. S. (2013). *Rhamnolipids production by multi-metal-resistant and plant-growth-promoting rhizobacteria.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 170(5), 1038–1056. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0244-9>
175. de Santana-Filho, A. P., Camilios-Neto, D., de Souza, L. M., Sassaki, G. L., Mitchell, D. A., & Krieger, N. (2015). *Evaluation of the Structural Composition and Surface Properties of Rhamnolipid Mixtures Produced by Pseudomonas aeruginosa UFPEDA 614 in Different Cultivation Periods.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 175(2), 988–995. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1343-y>
176. Baskaran, S. M., Zakaria, M. R., Mukhlis Ahmad Sabri, A. S., Mohamed, M. S., Wasoh, H., Toshinari, M., ... Banat, I. M. (2021). *Valorization of biodiesel side stream waste glycerol for rhamnolipids production by Pseudomonas aeruginosa RS6.* Environmental Pollution, 276, 116742. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116742>
177. Poblete-Castro, I., Wittmann, C., & Nikel, P. I. (2020). *Biochemistry, genetics and biotechnology of glycerol utilization in Pseudomonas species.* Microbial Biotechnology, 13(1), 32–53. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13400>
178. Cherif, N., Tifrit, A., Larbi Daouadji, K., Mezouari, S., Chama, Z., & Abbouni, B. (2015). *Effect of carbon and nitrogen source on the microbial production of*

- biosurfactants by Pseudomonas aeruginosa*. Der Pharmacia Lettre, 7(8), 42–48.
179. Ehinmitola, E. O., Aransiola, E. F., & Adeagbo, O. P. (2018). *Comparative study of various carbon sources on rhamnolipid production*. South African Journal of Chemical Engineering, 26, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2018.09.001>
180. Nickel, P. I., Romero-Campero, F. J., Zeidman, J. A., Goñi-Moreno, Á., & de Lorenzo, V. (2015). *The glycerol-dependent metabolic persistence of Pseudomonas putida KT2440 reflects the regulatory logic of the GlpR repressor*. mBio, 6(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00340-15>
181. Müller, M. M., Hörmann, B., Syltatk, C., & Hausmann, R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems*. Applied Microbiology and Biotechnology, 87(1), 167–174. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2513-7>
182. Trummler, K., Effenberger, F., & Syltatk, C. (2003). *An integrated microbial/enzymatic process for production of rhamnolipids and L-(+)-rhamnose from rapeseed oil with Pseudomonas sp. DSM 2874*. European Journal of Lipid Science and Technology, 105(10), 563–571. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200300816>
183. Zhao, F., Yuan, M., Lei, L., Li, C., & Xu, X. (2021). *Enhanced production of mono-rhamnolipid in Pseudomonas aeruginosa and application potential in agriculture and petroleum industry*. Bioresource Technology, 323, 124605. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124605>
184. Sun, W., Cao, W., Jiang, M., Saren, G., Liu, J., Cao, J., ... Naz, I. (2018). *Isolation and characterization of biosurfactant-producing and diesel oil degrading Pseudomonas sp. CQ2 from Changqing oil field, China*. RSC Advances, 8(69), 39710–39720. <https://doi.org/10.1039/C8RA07721E>
185. Amani, H., Müller, M. M., Syltatk, C., & Hausmann, R. (2013). *Production of microbial rhamnolipid by Pseudomonas aeruginosa MM1011 for Ex situ enhanced oil recovery*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 170(5), 1080–1093. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0249-4>
186. Zhu, L., Yang, X., Xue, C., Chen, Y., Qu, L., & Lu, W. (2012). *Enhanced rhamnolipids production by Pseudomonas aeruginosa based on a pH stage-controlled fed-batch fermentation process*. Bioresource Technology, 117, 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.091>
187. Aparna, A., Srinikethan, G., & Smitha, H. (2012). *Production and characterization of biosurfactant produced by a novel Pseudomonas sp. 2B*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 95, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.01.043>
188. Avili, M. G., Fazaelpoor, M. H., Jafari, S. A., & Ataei, S. A. (2012). *Comparison between batch and fed-batch production of rhamnolipid by Pseudomonas aeruginosa*. Iranian Journal of Biotechnology, 10(4), 263–269.
189. Zhao, F., Zhou, J., Han, S., Ma, F., Zhang, Y., & Zhang, J. (2016). *Medium factors on anaerobic production of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa SG and a simplifying medium for in situ microbial enhanced oil recovery applications*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32(4), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2020-9>
190. Pacheco, G. J., Reis, R. S., Fernandes, A. C. L. B., Da Rocha, S. L. G., Pereira,

- M. D., Perales, J., & Freire, D. M. G. (2012). *Rhamnolipid production: Effect of oxidative stress on virulence factors and proteome of Pseudomonas aeruginosa PA1*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(6), 1519–1529. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4258-y>
191. Radzuan, M. N., Banat, I. M., & Winterburn, J. (2017). *Production and characterization of rhamnolipid using palm oil agricultural refinery waste*. *Bioresource Technology*, 225, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.052>
192. Soares da Silva, R. de C. F., Almeida, D. G., Meira, H. M., Silva, E. J., Farias, C. B. B., Rufino, R. D., ... Sarubbo, L. A. (2017). *Production and characterization of a new biosurfactant from Pseudomonas cepacia grown in low-cost fermentative medium and its application in the oil industry*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.09.004>
193. Chen, S. Y., Wei, Y. H., & Chang, J. S. (2007). *Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous Pseudomonas aeruginosa S2*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(1), 67–74. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0980-2>
194. Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2006). *Towards commercial production of microbial surfactants*. *Trends in Biotechnology*, 24(11), 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.09.005>
195. Zhang, L., Pemberton, J. E., & Maier, R. M. (2014). *Effect of fatty acid substrate chain length on Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 monorhamnolipid yield and congener distribution*. *Process Biochemistry*, 49(6), 989–995. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.003>
196. Gargouri, B., Contreras, M. del M., Ammar, S., Segura-Carretero, A., & Bouaziz, M. (2017). *Biosurfactant production by the crude oil degrading Stenotrophomonas sp. B-2: chemical characterization, biological activities and environmental applications*. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(4), 3769–3779. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8064-4>
197. Sood, U., Singh, D. N., Hira, P., Lee, J. K., Kalia, V. C., Lal, R., & Shakarad, M. (2020). *Rapid and solitary production of mono-rhamnolipid biosurfactant and biofilm inhibiting pyocyanin by a taxonomic outlier Pseudomonas aeruginosa strain CR1*. *Journal of Biotechnology*, 307, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.11.004>
198. Singh, D. N., & Tripathi, A. K. (2013). *Coal induced production of a rhamnolipid biosurfactant by Pseudomonas stutzeri, isolated from the formation water of Jharia coalbed*. *Bioresource Technology*, 128, 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.127>
199. Parthipan, P., Sarankumar, R. K., Jaganathan, A., Amuthavalli, P., Babujanarthanam, R., Rahman, P. K. S. M., ... Rajasekar, A. (2018). *Biosurfactants produced by Bacillus subtilis A1 and Pseudomonas stutzeri NA3 reduce longevity and fecundity of Anopheles stephensi and show high toxicity against young instars*. *Environmental science and pollution research international*, 25(11), 10471–10481. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0105-0>
200. Khademolhosseini, R., Jafari, A., Mousavi, S. M., Hajfarajollah, H., Noghabi, K. A., & Manteghian, M. (2019). *Physicochemical characterization and optimization*

- of glycolipid biosurfactant production by a native strain of *Pseudomonas aeruginosa* HAK01 and its performance evaluation for the MEOR process. *RSC Advances*, 9(14), 7932–7947. <https://doi.org/10.1039/C8RA10087J>
201. Gong, Y., Zhao, D., & Wang, Q. (2018). *An overview of field-scale studies on remediation of soil contaminated with heavy metals and metalloids: Technical progress over the last decade*. *Water Research*, 147, 440–460. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.024>
 202. Dell'Anno, F., Sansone, C., Ianora, A., & Dell'Anno, A. (2018). *Biosurfactant-induced remediation of contaminated marine sediments: Current knowledge and future perspectives*. *Marine Environmental Research*, 137, 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.03.010>
 203. Sarubbo, L. A., Brasileiro, P. P. F., Silveira, G. N. M., & Juliana, M. (2018). *Application of a Low Cost Biosurfactant in the Removal of Heavy Metals in Soil*. *Chemical Engineering Transactions*, 64, 433–438. <https://doi.org/10.3303/CET1864073>
 204. Juwarkar, A. A., Nair, A., Dubey, K. V., Singh, S. K., & Devotta, S. (2007). *Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils*. *Chemosphere*, 68(10), 1996–2002. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.027>
 205. Das, A. J., Lal, S., Kumar, R., & Verma, C. (2017). *Bacterial biosurfactants can be an ecofriendly and advanced technology for remediation of heavy metals and co-contaminated soil*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(6), 1343–1354. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1183-0>
 206. Sarubbo, L. A., Rocha, R. B., Luna, J. M., Rufino, R. D., Santos, V. A., & Banat, I. M. (2015). *Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants*. *Chemistry and Ecology*, 31(8), 707–723. <https://doi.org/10.1080/02757540.2015.1095293>
 207. Mulligan, C. N., & Wang, S. (2006). *Remediation of a heavy metal-contaminated soil by a rhamnolipid foam*. *Engineering Geology*, 85(1), 75–81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enggeo.2005.09.029>
 208. Ghadami, R., Khoshmanesh, B., & Ghafourinejad, A. A. (2018). *The assessment of efficiency of saponin as bio-surfactant in removal of nickel and vanadium from soil contaminated by petroleum, Case study: Ahwaz oil pumping unit*. *Anthropogenic Pollution Journal*, 2(1), 12–23. <https://doi.org/10.22034/ap.2018.538374>
 209. Alsaqer, S., Marafi, M., Banat, I. M., & Ismail, W. (2018). *Biosurfactant-facilitated leaching of metals from spent hydrodesulphurization catalyst*. *Journal of Applied Microbiology*, 125(5), 1358–1369. <https://doi.org/10.1111/jam.14036>
 210. Yang, J., Gao, X., Li, J., Zuo, R., Wang, J., Song, L., & Wang, G. (2020). *The stabilization process in the remediation of vanadium-contaminated soil by attapulgite, zeolite and hydroxyapatite*. *Ecological Engineering*, 156, 105975. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2020.105975>
 211. Yu, Y. qi, Li, J. xin, Liao, Y. liang, & Yang, J. yan. (2020). *Effectiveness, stabilization, and potential feasible analysis of a biochar material on simultaneous remediation and quality improvement of vanadium contaminated soil*. *Journal of Cleaner Production*, 277. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123506>

212. Maikudi Usman, M., Dadrasnia, A., Tzin Lim, K., Fahim Mahmud, A., & Ismail, S. (2016). *Application of biosurfactants in environmental biotechnology; remediation of oil and heavy metal*. AIMS Bioengineering, 3(3), 289–304. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2016.3.289>
213. Qi, X., Xu, X., Zhong, C., Jiang, T., Wei, W., & Song, X. (2018). *Removal of Cadmium and Lead from Contaminated Soils Using Sophorolipids from Fermentation Culture of *Starmerella bombicola* CGMCC 1576 Fermentation*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 15, 2334. <https://doi.org/10.3390/ijerph15102334>
214. Chen, W., Kong, Y., Li, J., Sun, Y., Min, J., & Hu, X. (2020). *Enhanced biodegradation of crude oil by constructed bacterial consortium comprising salt-tolerant petroleum degraders and biosurfactant producers*. International Biodeterioration and Biodegradation, 154, 105047. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105047>
215. Acosta Diaz, S., Barrios San Martín, Y., Toledo León, H. F., Comesañas García, Y., & Aldana Jiménez, K. (2021). *Evaluación de la capacidad hidrocarburoclástica de un consorcio bacteriano aislado de zonas costeras de cuba*. Revista CENIC. Ciencias Químicas, 52(2), 79–88.
216. Feng, L., Jiang, X., Huang, Y., Wen, D., Fu, T., & Fu, R. (2021). *Petroleum hydrocarbon-contaminated soil bioremediation assisted by isolated bacterial consortium and sophorolipid*. Environmental pollution (Barking, Essex: 1987), 273, 116476. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116476>
217. Posada-Baquero, R., Grifoll, M., & Ortega-Calvo, J. J. (2019). *Rhamnolipid-enhanced solubilization and biodegradation of PAHs in soils after conventional bioremediation*. Science of the Total Environment, 668, 790–796. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.056>
218. Lee, K. S., Kwon, T.-H., Park, T., & Jeong, M. S. (2020). *Microbiology and Microbial Products for Enhanced Oil Recovery*. Theory and Practice in Microbial Enhanced Oil Recovery. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819983-1.00002-8>
219. Ashish, M. D. (Das). (2018). *Application of biosurfactant produced by an adaptive strain of *C.tropicalis* MTCC230 in microbial enhanced oil recovery (MEOR) and removal of motor oil from contaminated sand and water*. Journal of Petroleum Science and Engineering, 170, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2018.06.034>
220. Purwasena, I. A., Astuti, D. I., Syukron, M., Amaniyah, M., & Sugai, Y. (2019). *Stability test of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* DS1 using experimental design and its application for MEOR*. Journal of Petroleum Science and Engineering, 183, 106383. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2019.106383>
221. Sharma, R., Lamsal, B. P., & Mba-Wright, M. (2018). *Performance of *Bacillus subtilis* on fibrous biomass sugar hydrolysates in producing biosurfactants and techno-economic comparison*. Bioprocess and biosystems engineering. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-2004-2>
222. Xia, W. J., Luo, Z. Bin, Dong, H. P., Yu, L., Cui, Q. F., & Bi, Y. Q. (2012). *Synthesis, characterization, and oil recovery application of biosurfactant produced by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* WJ-1 using waste vegetable oils*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 166(5), 1148–1166.

- <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9501-y>
223. Alvarez Yela, A. C., Tibaquirá Martínez, M. A., Rangel Piñeros, G. A., López, V. C., Villamizar, S. H., Núñez Vélez, V. L., ... González Barrios, A. F. (2016). *A comparison between conventional Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids and Escherichia coli transmembrane proteins for oil recovery enhancing*. International Biodeterioration and Biodegradation, 112, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.033>
224. Amani, H. (2015). *Study of enhanced oil recovery by rhamnolipids in a homogeneous 2D micromodel*. Journal of Petroleum Science and Engineering, 128, 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2015.02.030>
225. Arora, P., Kshirsagar, P. R., Rana, D. P., & Dhakephalkar, P. K. (2019). *Hyperthermophilic Clostridium sp. N-4 produced a glycoprotein biosurfactant that enhanced recovery of residual oil at 96 °C in lab studies*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 182, 110372. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110372>

AUTOBIOGRAFÍA VINCULADA CON LA TESIS

9. AUTOBIOGRAFÍA VINCULADA CON LA TESIS

Publicaciones científicas

- **Barrios San Martín, Y**; Toledo León, HF; Ábalos Rodríguez, A; Acosta Díaz, SL y Sánchez López, MI. (2022) Aplicación de ramnolípidos de *Pseudomonas sp.* Y3-B1A en la biodegradación de hidrocarburos a diferentes escalas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 38: 373-387.
 - **Barrios San Martín, Y**; Toledo León, HF; Ábalos Rodríguez, A; Marqués AM y Sánchez López, MI. (2021) Rhamnolipids Application for the Removal of Vanadium from Contaminated Sediment. *Current Microbiology*, 78 (5): 1949-1960.
 - Acosta Diaz, S; **Barrios San Martín, Y**; Toledo León, HF; Comesañas García, Y. y Aldana Jiménez, K. (2021) Evaluación de la capacidad hidrocarburoclástica de un consorcio bacteriano aislado de zonas costeras de Cuba. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 52 (2): 79–88.
 - Toledo León, HF; **Barrios San Martín, Y**; Plá Pérez, A; Romero Silva, R y Acosta Díaz, S. (2022) Diseño y caracterización de un consorcio bacteriano para la degradación de ripsos de perforación base diésel. *Revista CNIC Ciencias Químicas*, 53 (2): 102–112
 - Romero Silva, R; Chao Reyes, C; González Suárez, A; Comesañas García, Y; **Barrios San Martín, Y** y Ameneiros Martínez, JM. (2021) Tratamiento para cortes de perforación contaminados con diésel. *Revista Centro Azúcar*, 48 (1): 35-46.
 - **Barrios San Martín, Y**; Acosta Días, SL; Sánchez Reyes, A; Toledo León, A; González Hernández, F y García Laureiro, RM. (2012) Study and isolation of aerobic hydrocarbon-degrading from Cuban shorelines. *Biología Aplicada*, 29 (2): 80-86.
 - **Barrios San Martín, Y.** (2011). Bioremediation: a tool for the management of oil pollution in marine ecosystems. *Biología Aplicada*, 28 (2): 69-76
-
- **Barrios San Martín, Y**; Sánchez López, MI; Ábalos Rodríguez, A y Marqués AM. Diseño de estrategia de cultivo para incrementar la productividad volumétrica de los ramnolípidos durante el cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* Y3-B1A. *Biología Aplicada* (en arbitraje)

- Ábalos Rodríguez, A; Rodríguez Gámez, O; **Barrios San Martín, Y.** Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* in the cleaning of polluted environments. Rhamnolipids Book, Springer (en producción)

Ponencias en eventos (ponente y primera autor)

- Evaluación de la capacidad de degradación de petróleo crudo de ocho cepas bacterianas de la colección del Ceinpet; ponente **IX Jornadas Científico Técnicas del Ceinpet. 2018; VII Congreso de Petróleo y Gas en Geociencias 2019**
- Caracterización de los biosurfactantes producidos por el cultivo mixto de *Pseudomonas luteola* Y10 y *Pseudomonas aeruginosa* Y3; **IX Jornadas Científico Técnicas del Ceinpet. 2018**
- Evaluación de posibles usos en la industria petrolera de los biosurfactantes producidos por *Marinomonas* sp F1FL y *Pseudomonas* sp. B2A. **VIII Jornadas Científico Técnicas del Ceinpet, 2016**
- Evaluación de la capacidad de producción de biosurfactantes por bacterias aisladas de ecosistemas contaminados con hidrocarburos de Cuba. **VIII Jornadas Científico Técnicas del Ceinpet, 2016**
- Cuba, the need for new treatment and ecosystem recovery technologies. **55 Students Scientific Session (mining Section) AGH-UST, Polonia. 2014**
- Selección de bacterias autóctonas de agua y sedimentos de Felton capaces de degradar hidrocarburos. **III Congreso sobre Manejo de Ecosistemas y Biodiversidad en el marco de la VIII Convención Internacional sobre Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2011**
- Study and isolation of aerobic hydrocarbon-degrading bacteria from a shoreline in Cuba. **3rd International Symposium on Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Systems (ISMOS-3, Canadá), (aceptado), 2011**
- Evaluación de la producción de biosurfactantes por bacterias hidrocarbonoclastas de origen marino. **20 Conferencia de Química, Universidad de Oriente, 2011**

Proyectos de investigación

- Biosurfactantes producidos por microorganismos y su uso en la industria petrolera. (2014-2021). **Jefe de Proyecto**
- Evaluación de tratamientos como alternativas de manejo y disposición final de residuos sólidos de lodo base –diésel combustible (2017-2020)
- Desarrollo de procesos biológicos para el saneamiento de ecosistemas contaminados por la industria petrolera (2016-2020) **Jefe de Proyecto 2016-2018**
- Biotecnología aplicada a la industria petrolera. (2009-2018) **Jefe de Proyecto**
- Desarrollo de métodos de ensayos toxicológicos para productos y desechos peligrosos de la industria petrolera. (2016-2018)

Tutorías de tesis

- Aplicación de ramnolípidos en el proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. --(Centro de Investigación del Petróleo--Facultad de biología, UH, 2019-actualidad). Tesis de maestría Microbiología mención Biotecnología.
- Diseño de consorcio bacteriano para la biorremediación de rios de perforación contaminados con diésel--(Centro de Investigación del Petróleo--Facultad de biología, UH, 2016-2019). Tesis de diploma Lic. Microbiología.
- Aislamiento y selección de cepas productoras de Biosurfactantes (Centro de Investigación del Petróleo--Facultad de biología, UH, 2013-2016). Tesis de diploma Lic. Microbiología.