

Biotensoactivos y características de interés para recuperación de petróleo con bacterias aisladas de crudo cubano.

Thais Hernández Gómez¹, Freya González Núñez², Lisset Miquel González³, Saúl Fernández Valenzuela⁴ y Alexander Govin Sanjudo⁵

¹ Licenciada en Microbiología. Máster en negocio de petróleo y gas. Centro de Investigación del Petróleo, La Habana, Cuba, Correo electrónico: thaishg89@gmail.com.

² Licenciada en Química. Centro de Investigación del Petróleo, La Habana, Cuba, Correo electrónico: freya@ceinpet.cupet.cu.

³ Ingeniera en Tecnologías Nucleares y Energéticas. Máster en negocio de petróleo y gas. Centro de Investigaciones del Petróleo, Cuba, Correo electrónico: lisset@ceinpet.cupet.cu.

⁴ Licenciado en Microbiología. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Cuba, Correo electrónico: saul.fernandez@cigb.edu.cu.

⁵ Licenciado en Microbiología. Máster en Microbiología. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba Correo electrónico: agovin@fbio.uh.cu.

RESUMEN

De los problemas de mayor incidencia que afectan a la industria petrolera se señala la baja eficiencia de extracción de hidrocarburos de sus reservorios naturales. Frente a este problema, los métodos que incluyen el empleo de microorganismos para que se aumenten los índices de recuperación de petróleo (Microbial Enhanced Oil Recovery, MEOR) se presentan como una alternativa ecológica y económicamente sustentable. Los biotensoactivos son moléculas de origen biológico indispensables en los procesos de MEOR. Esta investigación tiene como objetivo la obtención de biotensoactivos, a partir de la evaluación de 6 cepas bacterianas aisladas de un pozo de la Franja Petrolífera Norte de Cuba, para el proceso de recuperación de petróleo. La producción de biotensoactivos se determinó mediante 4 métodos: hemólisis, colapso de la gota, dispersión del petróleo y medición de la tensión interfacial. Se evaluó la estabilidad de los biotensoactivos obtenidos ante elevadas temperaturas y salinidad. Además, se evaluó la influencia en el crecimiento bacteriano de distintas condiciones ambientales que se encuentran en los yacimientos, tales como elevada temperatura, salinidad, pH y presencia de metales pesados. Se demostró que son estables en condiciones de alta salinidad (hasta 10 %) y temperatura (hasta 60 °C). Dichos resultados alcanzan notable significación al diseñarse procesos de MEOR ya que no se limita su apli-

cación a un tipo específico de yacimiento. Actualmente continúan los estudios de laboratorio para realizar un diseño óptimo del proceso de MEOR, que se adecúe a las realidades que se encuentran en los yacimientos cubanos.

Palabras claves: biotensoactivos, recuperación mejorada de petróleo, bacterias, MEOR.

ABSTRACT

Of the problems of greater incidence that affect the oil industry, the low efficiency of hydrocarbon extraction from its natural reservoirs is noted. Faced with this problem, methods that include the use of microorganisms to increase oil recovery rates (Microbial Enhanced Oil Recovery, MEOR) are presented as an ecologically and economically sustainable alternative. Biotensoactivos are molecules of biological origin indispensable in the processes of MEOR. This research aims to obtain biotensoactivos, based on the evaluation of 6 bacterial strains isolated from a well in the Northern Oil Belt of Cuba, for the oil recovery process. The production of biotensoactivos was determined by 4 methods: hemolysis, collapse of the drop, dispersion of the oil and measurement of the interfacial tension. The stability of the biotensoactivos obtained at high temperatures and salinity was evaluated. In addition, the influence on bacterial growth of different environmental conditions found in

the deposits, such as high temperature, salinity, pH and presence of heavy metals, was evaluated. They were shown to be stable under conditions of high salinity (up to 10 %) and temperature (up to 60 °C). These results reach significant significance when designing MEOR processes since their application is not limited to a specific type of reservoir. Laboratory studies are currently continuing to perform an optimal design of the MEOR process, which is adapted to the realities found in the Cuban deposits.

Key words: biotensoactivos, improved oil recovery, bacteria, MEOR

RESUMO

Dos problemas de maior incidência que afetam a indústria de petróleo, nota-se a baixa eficiência da extração de hidrocarbonetos de seus reservatórios naturais. Diante desse problema, métodos que incluem o uso de microrganismos para aumentar as taxas de recuperação de petróleo (Microbial Enhanced Oil Recovery, MEOR) são apresentados como uma alternativa ecológica e economicamente sustentável. Biotensoativos são moléculas de origem biológica indispensáveis nos processos da MEOR. Esta pesquisa tem como objetivo obter biotensoativos, com base na avaliação de 6 cepas bacterianas isoladas de um poço no Cinturão do Norte de Cuba, para o processo de recuperação de petróleo. A produção de biotensoativos foi determinada por quatro métodos: hemólise, colapso da gota, dispersão do óleo e medição da tensão interfacial. A estabilidade dos biotensoativos obtidos a altas temperaturas e salinidade foi avaliada. Além disso, foi avaliada a influência no crescimento bacteriano de diferentes condições ambientais encontradas nos depósitos, como alta temperatura, salinidade, pH e presença de metais pesados. Eles mostraram-se estáveis sob condições de alta salinidade (até 10 %) e temperatura (até 60 °C). Esses resultados alcançam um significado notável ao projetar processos MEOR, pois sua aplicação não se limita a um tipo específico de reservatório. Atualmente, estudos de laboratório continuam a criar um projeto do processo MEOR ideal, adaptado às realidades encontradas nos depósitos cubanos

Palavras chaves: biotensoativos, recuperação aprimorada de óleo, bactérias, MEOR

INTRODUCCIÓN

La naturaleza de los reservorios carbonatados fracturados

y las características físico-químicas de los crudos pesados implican un bajo factor de recuperación. Si además de esto existe una mala explotación o un mal manejo del yacimiento se agudiza la baja recuperación de las reservas extraíbles (Zhang y Xiang, 2010). Luego de la recuperación por métodos convencionales, aún queda atrapado en los poros de la roca generalmente más del 60 % del total de crudo (Yernazarova *et al.*, 2016). La mayoría del petróleo residual se encuentra en microtrampas por causa de las fuerzas capilares, adherido a la superficie mineral o desviado dentro de la formación rocosa (Kohr, 2012). El uso de la biotecnología, como herramienta en la recuperación mejorada de petróleo, se convirtió en una alternativa atractiva y económicamente factible (Batista *et al.*, 2011). En tal sentido, a nivel mundial se renovó el interés por las metodologías que incluyen el empleo de microorganismos para que se aumenten los índices de recuperación de petróleo (MEOR, según sus siglas en inglés de Microbial Enhanced Oil Recovery).

MEOR es un término general que se refiere al uso de microorganismos tales como bacterias y/o archae y sus productos metabólicos (biotensoactivos, ácidos, gases, biopolímeros y otros), para que se aumente la recuperación de hidrocarburos hasta 40 % del crudo residual fundamentalmente en yacimientos parcialmente agotados que sean candidatos al proceso (Al-Sulaimani *et al.*, 2011). Los procesos microbiológicos de MEOR se consideran ventajosos respecto a las variantes físico-químicas porque son más económicos, consumen menos energía, no dependen de los precios del petróleo y no emplean sustancias agresivas al medio ambiente ya que todas son biodegradables (Omoniyi y Abdulmalik, 2015).

Una sustancia es un agente tensioactivo (o surfactante, según sus siglas en inglés SURFACE ACTIVE AGENT) cuando da lugar a un descenso significativo de la tensión en una interfase debido a que es adsorbido en esta. Dichas moléculas son de naturaleza anfifílica, por lo que poseen dos porciones completamente diferentes en su estructura. Una de ellas es la llamada cabeza polar, parte de la molécula con carácter hidrofílico, y otra la cola hidrofóbica o porción apolar (Laith *et al.*, 2007). Los tensioactivos se producen por vía química o biológica. Estos últimos son conocidos como biotensoactivos (o biosurfactantes), los cuales son moléculas biológicas con propiedades tensioactivas producidas sobre superficies vivas, principalmente superficies de células microbianas, o excretados al medio extracelular. En estos compuestos la

parte hidrofílica está constituida generalmente por aminoácidos, péptidos aniónicos o catiónicos y carbohidratos, mientras que la parte hidrofóbica regularmente está constituida por ácidos grasos saturados o insaturados (Jiménez *et al.*, 2010).

En Cuba existe la necesidad de que se obtengan tecnologías propias y económicas, que faciliten los procesos de extracción de crudo. MEOR se presenta como una variante de interés para la mejora del factor de recuperación de los yacimientos cubanos. De ahí surge la necesidad de que se investiguen las tecnologías, en correspondencia con los recientes adelantos científico-técnicos que se reportan en la bibliografía. Así, se contará con una tecnología propia, adaptada a las condiciones de la industria petrolera cubana, con la que se alcance el incremento y la eficiencia de la extracción de petróleo. Con este trabajo se persigue el objetivo de evaluar potencialidades para la producción de biotensoactivos, así como otras características de interés en procesos de MEOR, a partir de seis bacterias aisladas de crudo proveniente de un pozo de la Franja Norte Petrolífera Cubana.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Caracterización fisiológica de los aislados microbianos

Para la caracterización fisiológica se evaluó la influencia en el crecimiento de los aislados bacterianos a partir de crudo, de un conjunto de factores ambientales que se encontrarán en los yacimientos de petróleo y son limitantes para la proliferación de los microorganismos.

Influencia de la temperatura en el crecimiento bacteriano

A partir de un precultivo de los aislados bacterianos en caldo Triptona Soya (CTS), se preparó un inóculo estandarizado, de cada aislado, al tubo 0.5 de la escala de McFarland, los que se inocularon en tubos con CTS. Los cultivos se incubaron durante 24 h en agitación de 150 r.min⁻¹, a temperaturas diferentes (30, 45, 50 y 60 °C). El crecimiento se determinó mediante la medición de la absorbancia a $\lambda = 600$ nm.

Influencia del NaCl en el crecimiento bacteriano

A partir de un precultivo de los aislados bacterianos en CTS, se preparó un inóculo estandarizado al tubo 0.5 de la escala de McFarland, los que se inocularon en tubos con CTS con concentraciones crecientes de NaCl (0.5; 1; 3; 4; 5; 10 y 15 %). Dichos tubos se incubaron durante

24 h a 30 °C en agitación de 150 r.min⁻¹. El crecimiento se determinó mediante la medición de la absorbancia a $\lambda = 600$ nm.

Influencia del pH en el crecimiento bacteriano

A partir de un precultivo de los aislados bacterianos en CTS, se preparó un inóculo estandarizado al tubo 0.5 de la escala de McFarland los que se inocularon en tubos de cultivos con CTS con diferentes valores de pH (4; 5; 6; 7.2; 8; 9 y 10). Los cultivos se incubaron durante 24 horas a 30 °C y a 150 r.min⁻¹. El crecimiento se determinó mediante la medición de la absorbancia a $\lambda = 600$ nm.

Determinación de la CMI de Ni(II) y Co(II) en medio sólido

Los precultivos se prepararon de los aislados bacterianos en medio mínimo Tris (MMT) líquido suplementado con glucosa (0,2 %) y extracto de levadura (0.1 %), a partir de cultivos en cuñas con medio LB agarizado. Estos fueron incubados durante toda la noche en agitación a 150 r.min⁻¹, posteriormente se inocularon por duplicado en placas con MMT sólido con concentraciones crecientes de Ni(II) o Co(II). Los cationes metálicos se adicionaron al medio estéril y se fundieron en forma de sales grado analítico de NiCl₂ x 6H₂O o CoCl₂ x 6H₂O, preparadas como disoluciones stock de 1M y esterilizadas por filtración (filtros de nitrocelulosa de 0.25 μ m de diámetro). Las placas se incubaron a 30 °C y el crecimiento se siguió diariamente durante 5 días, al cabo de los que se registraron los resultados siguiendo un patrón de presencia o ausencia de crecimiento bacteriano, mediante comparación visual con una placa control sin metal. La menor concentración de cada metal que inhibió el crecimiento microbiano, se consideró como concentración mínima inhibitoria (CMI).

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOTENSOACTIVOS

Para la determinación de la producción de biotensoactivos se emplearon cuatro métodos diferentes.

Ensayo de hemólisis

Los aislados se inocularon en placas de agar sangre. Las placas se incubaron a 30 °C durante 5 días (Varadavenkatesan y Murty, 2013). Las zonas hemolíticas formadas alrededor de las colonias indican la producción de biotensoactivos.

Ensayo del colapso de la gota

El colapso de la gota se determinó adicionando 10 μL del sobrenadante libre de células de cada uno de los aislados bacterianos (cultivados previamente en medio mínimo UOM e incubadas a 30 °C y 150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ por 24 h) en un portaobjeto conteniendo una capa de crudo. Se determinó el diámetro de la gota en cm. Se utilizó como control las mismas condiciones, pero adicionando 10 μL de agua destilada estéril (Varadavenkatesan y Murty, 2013).

Ensayo de la dispersión del petróleo

A una placa Petri (90 mm de diámetro) se añadió 30 ml de agua destilada, posteriormente se adicionó 1 ml de crudo y 10 μL del sobrenadante libre de células de cada cultivo (previamente incubadas a 30 °C y 150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ por 24 h) en el centro de la capa formada por el crudo usando una pipeta. La aparición de zonas claras fue indicativo de la presencia de biotensoactivos (Maneerat y Phetrong, 2007). Se empleó como control 10 μL de medio de cultivo sin inocular.

Medición de la tensión interfacial

La tensión interfacial entre el petróleo y el agua (disolución acuosa de tensioactivo) se determinó usando el análisis de la forma de la gota en el tensiómetro DSA100 (KRUSS, Alemania).

RESISTENCIA A LA SALINIDAD Y TERMOESTABILIDAD DE LOS SURFACTANTES OBTENIDOS A PARTIR DE CEPAS PRODUCTORAS

Para la determinación del grado de propensión a la agresión salina, el sobrenadante libre de células se mezcló con las distintas disoluciones modelos de diferentes mineralizaciones cuantitativas y cualitativas, en una proporción de 1/1. Como soluciones modelo se utilizaron:

- **Disolución 1:** Modelo de agua con una mineralización total de 17 g/l, preparado con una disolución de sales, compuestas de 80 % de cloruro de sodio y 20 % de cloruro de calcio.
- **Disolución 2:** Modelo de agua con una mineralización total de 200 g/l, preparado con una disolución de sales, compuestas de 80 % de cloruro de sodio y 20 % de cloruro de calcio.
- **Disolución 3:** Modelo de agua con contenido de 17 g/l de NaCl.
- **Disolución 4:** Modelo de agua con contenido de 200 g/l de NaCl.

Para la determinación de la estabilidad térmica, la mezcla del sobrenadante libre de células y las disoluciones salinas se mantuvieron a temperatura ambiente y a 70 °C. Los frascos se sometieron a inspección visual a las 24 horas y a los 7 días. Como control se utilizó medio de cultivo sin inocular en la misma proporción que las disoluciones modelos.

ANÁLISIS BIOMÉTRICOS

A los datos se les realizaron de forma preliminar las pruebas de normalidad y de homogeneidad de varianza. Una vez comprobadas las premisas, los resultados se analizaron mediante el método paramétrico ANOVA y posteriormente con la prueba de significación honesta de Tukey. Todos los análisis se realizaron mediante el paquete estadístico *Statistica* versión 8.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO

El pozo a partir del cual se aislaron las bacterias, posee una temperatura en la capa productora de 43 °C. Partiendo de este hecho y de que la mayoría de los experimentos se realizaron a temperatura ambiente, se evaluó el crecimiento de las bacterias en el intervalo comprendido entre 30 y 60 °C.

El 100 % de las cepas crecieron a temperaturas entre 30 y 50 °C (**Figura 1**). El 50 % mostró su mayor crecimiento a 45 °C, el 33.3 % a 50 °C y solo el 16.7 % a 30 °C. La temperatura óptima de crecimiento para las cepas *B. subtilis* CC21, *B. subtilis* CC32 y *B. licheniformis* CC33 se observó a 45 °C. En cambio, las cepas *B. subtilis* CC23 y *B. subtilis* CC31 mostraron su mayor crecimiento a 50 °C. *Aeromonas veronii* CC22 mostró los mayores valores de absorbancia a 30 °C. *B. subtilis* CC23 y *B. subtilis* CC31 mostraron un aumento de su absorbancia a medida que se incrementaba la temperatura en el intervalo de 30 °C a 50 °C. Además, a esa misma temperatura se observó un elevado crecimiento para todas las cepas por lo que se clasifican como termotolerantes (Madigan *et al.*, 2014). A 60 °C se observó el menor crecimiento para el 100 % de las cepas evidenciándose la influencia negativa de estos valores sobre el crecimiento bacteriano.

Los resultados están en concordancia con la literatura consultada que plantea que la temperatura óptima de crecimiento de los miembros del género *Aeromonas* se encuentra en el intervalo de 22 °C a 37 °C (Martin y Joseph,

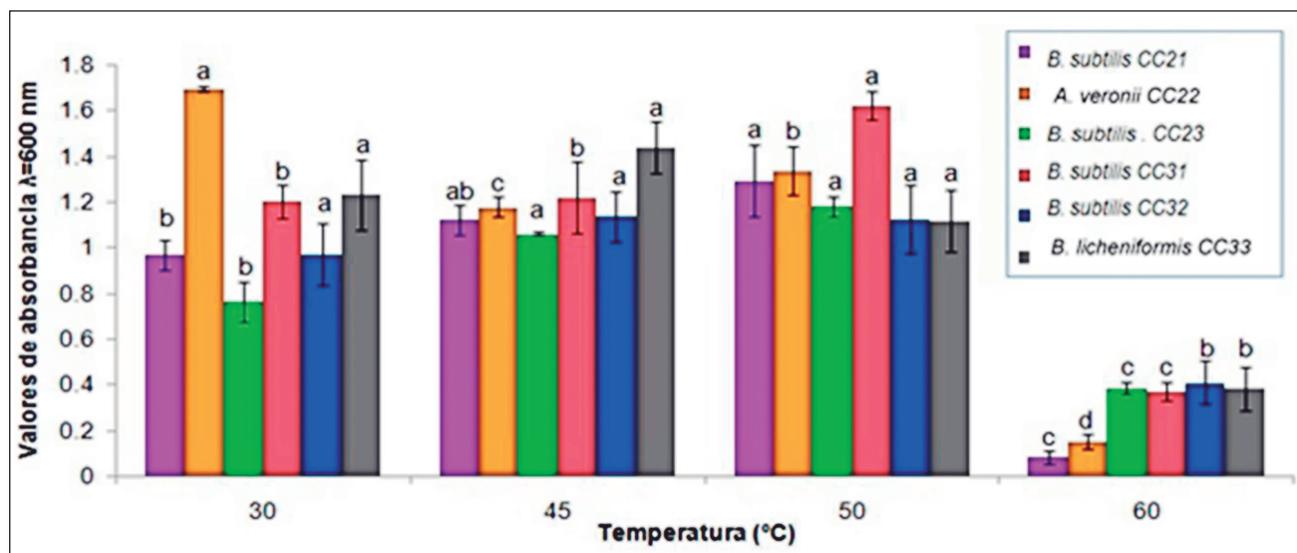


Figura 1. Crecimiento de los aislados bacterianos a partir del crudo cubano en medio caldo Triptona Soya, incubadas a diferentes temperaturas, durante 24 horas a 30 °C en 150 r.min⁻¹. Las letras diferentes indican diferencias significativas, Tukey (n=3, p<0.05).

2007). Por otro lado, se reportó que la temperatura óptima para el género *Bacillus* es de 25 °C a 55 °C y para la especie *B. subtilis* es de 30 a 40 °C (Logan y De Vos, 2007). A su vez, varios investigadores identificaron al género *Bacillus* como microbiota autóctona de yacimientos que presentan temperaturas de yacencia entre 22 °C y 73 °C (Xiao *et al.*, 2016).

En el caso particular de estudio, los resultados obtenidos demuestran que la temperatura no es limitante para el crecimiento de los microorganismos aislados en

el intervalo de temperatura evaluado, el cual coincide con las temperaturas de yacencia de la mayoría de los yacimientos cubanos (de 30 a 60 °C). Dicho aspecto es primordial para posteriores investigaciones que involucren estos microorganismos en procesos de MEOR.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE NaCl EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO

La influencia de la concentración de NaCl en el crecimiento de cada aislado se relaciona en la **Figura 2**. El 100 % de

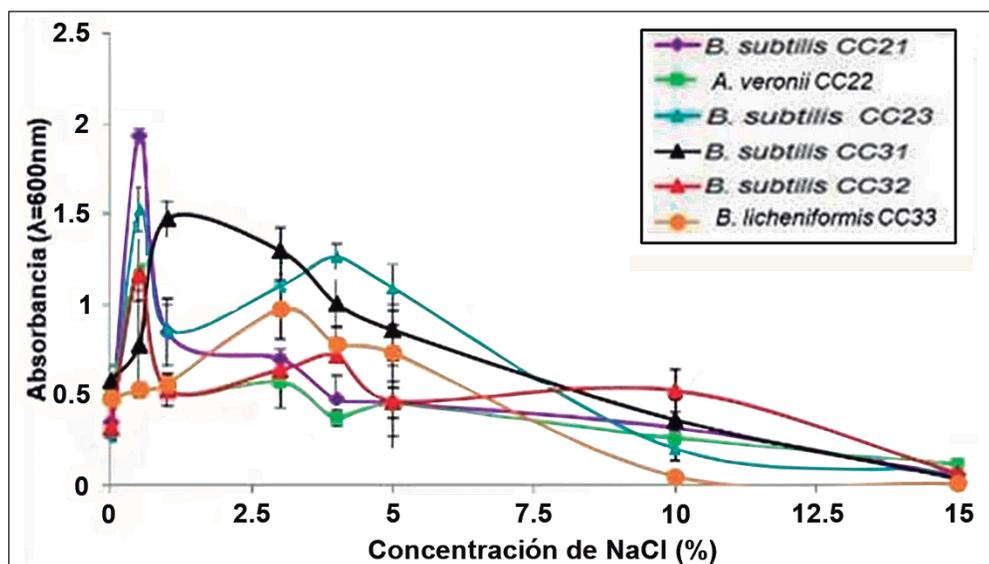


Figura 2. Crecimiento de los aislados bacterianos a partir del crudo cubano, en medio caldo Triptona Soya ajustado a diferentes concentraciones de NaCl, incubados durante 24 horas a 30 °C en 150r.min⁻¹. Las barras representan el valor medio de tres determinaciones ± desviación estándar.

los mismos crecieron en concentraciones de 0 % a 10% (w/v) de NaCl. En todos los casos se observó la influencia negativa del aumento de la concentración de sal en el crecimiento bacteriano. Cuatro de las cepas (*B. subtilis* CC21, *A. veronii* CC22, *B. subtilis* CC23 y *B. subtilis* CC32) mostraron los mayores valores de absorbancia en 0.5 % (w/v) de NaCl. Las cepas *B. subtilis* CC31 y *B. licheniformis* CC33 mostraron el mayor crecimiento en 1% (w/v) y 3 % (w/v) respectivamente.

El comportamiento de las cepas de *Bacillus* (CC21, CC23, CC31, CC32 y CC33) en presencia de las diferentes concentraciones de NaCl coinciden con los referidos en la literatura para los miembros del género *Bacillus*, los que crecen en el intervalo de concentraciones de 0 % a 20 % (w/v) de NaCl. En el caso de la especie *B. subtilis* se plantea que el intervalo de crecimiento es de 0% a 10 % (w/v) (Logan y De Vos, 2007). Algunos autores reportan que cepas de *B. licheniformis* muestran un límite de tolerancia al NaCl del 13 % (Ageitos, 2011). La cepa *A. veronii* CC22 mostró el mayor crecimiento en el intervalo de 0 a 3 % de NaCl. Estos resultados coinciden con el intervalo referido por Martín y Joseph, (2007) para el género *Aeromonas* (0 % a 3 % w/v). Si se tiene en cuenta el valor de la concentración de NaCl en el que se observó el mayor crecimiento, todas las cepas son consideradas halotolerantes (Madigan *et al.*, 2014).

La salinidad es uno de los factores más importantes que influyen en la diversidad filogenética de las

comunidades bacterianas en los yacimientos de petróleo. En los reservorios que presentan una elevada salinidad, la diversidad filogenética microbiana es menor y a medida que disminuye la salinidad aumenta la diversidad bacteriana, estableciéndose de esta manera, una relación inversa entre la concentración de sales de un yacimiento y la diversidad de los microorganismos autóctonos del mismo (Xiao *et al.*, 2016).

Los resultados de la presente investigación demuestran que las cepas son estables en condiciones de elevada salinidad, por tanto, se considerarán como candidatas para su empleo en aplicaciones de MEOR.

INFLUENCIA DEL PH EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO

Los resultados de la influencia del pH en el crecimiento bacteriano se presentan en la **Figura 3**. El 100 % de las cepas crecieron en el intervalo de pH de 5 a 9, el 66.7 % mostró un mayor crecimiento a pH 8 y el 33.3 % a pH 6. Las cepas *B. subtilis* CC21 y *B. subtilis* CC31 mostraron un óptimo crecimiento a pH 6 y pH 8, no mostrando diferencias significativas en el crecimiento a ambos pH. Las cepas *A. veronii* CC22, *B. subtilis* CC23, *B. licheniformis* CC33 y *B. subtilis* CC32 no mostraron diferencias significativas en los valores de absorbancia a pH 8, donde mostraron los mejores resultados. En los pH 4 y 10 no se observó crecimiento.

Los resultados obtenidos coinciden con los refe-

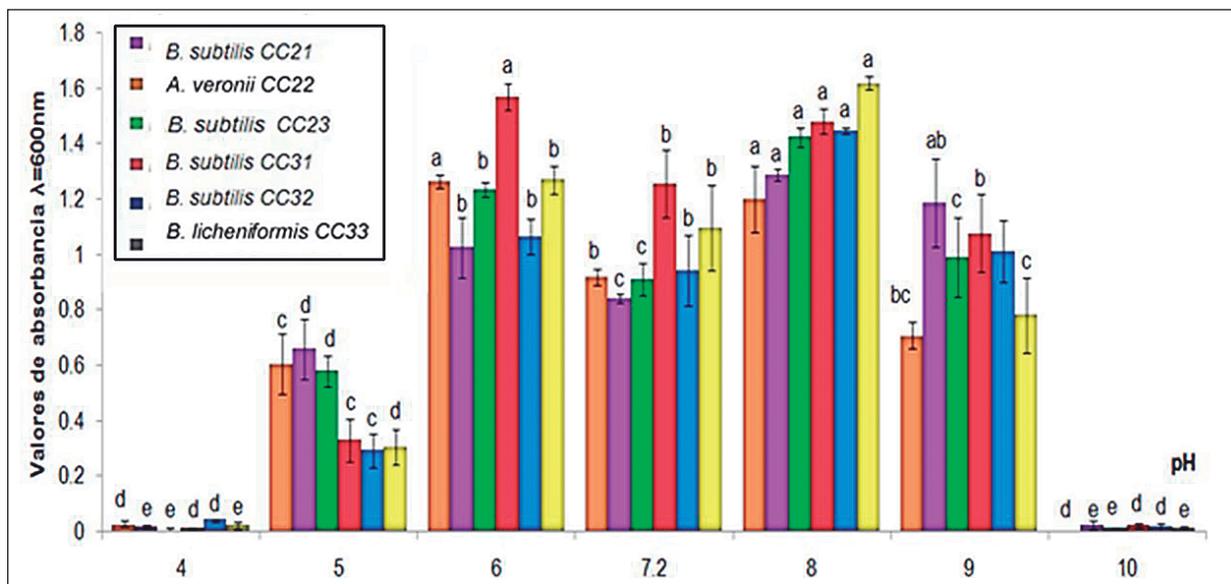


Figura 3. Crecimiento de las cepas bacterianas aisladas del crudo cubano en medio caldo Triptona Soya ajustado a diferentes valores de pH, incubados durante 24 horas a 30 °C en 150 r.min⁻¹. Las barras indican la desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas, Tukey (n=3, p<0.05).

ridos en la literatura. Se ha demostrado que el género *Bacillus* crece en un intervalo de pH de 5 a 10 y la especie *B. subtilis* lo hace en el intervalo de 5.5 a 8.5 (Logan y De Vos, 2007). Comportamiento similar ha sido informado para el género *Aeromonas*, cuyos miembros crecen en un intervalo de pH de 4.5 a 9 (Martin y Joseph, 2007).

El pozo en estudio posee agua de capa con pH de 7.6, clasificándose como débilmente básica. Todas las cepas analizadas crecen prósperamente en este valor de

pH, además poseen un intervalo de tolerancia relativamente amplio (de 5 a 9). Por tal motivo, el pH no constituye una limitante para que se consideren a los aislados estudiados como candidatas a procesos de MEOR.

RESISTENCIA A NÍQUEL Y COBALTO

La concentración mínima inhibitoria (CMI) a Ni(II) y Co(II) de las bacterias autóctonas del yacimiento de crudo cubano se relacionan en la **Tabla 1**.

Aislados	Ni (II)	Co (II)
<i>B. subtilis</i> CC21	0.5	2.0
<i>A. veronii</i> CC22	0.5	3.0
<i>B. subtilis</i> CC23	2.0	5.0
<i>B. subtilis</i> CC31	1.0	3.0
<i>B. subtilis</i> CC32	1.0	5.0
<i>B. licheniformis</i> CC33	1.0	3.0

Tabla 1. Concentración Mínima Inhibitoria a Ni (II) y Co (II) de las bacterias autóctonas del yacimiento de crudo cubano en medio mínimo Tris sólido, durante 120 horas a 30 °C.

Los aislados crecieron en concentraciones de níquel de 0.5 a 2.0 mM. Según Marrero y Coto (2007) es posible catalogar los microorganismos como: moderadamente resistente las cepas que son capaces de crecer hasta una concentración de 3 mM, resistentes aquellas que crecerán de 5-20 mM, altamente resistente 20-200 mM y súper resistentes más de 200 mM. Si se aplica este criterio de clasificación de resistencia (a níquel), las seis cepas del yacimiento de crudo cubano son moderadamente resistentes.

Los seis aislados crecieron en concentraciones superiores a 1 mM de cobalto. Los aislados *B. subtilis* CC23 y *B. subtilis* CC32 mostraron la mayor CMI a cobalto, siendo esta de 5 mM.

El cobalto tiene efecto genotóxico, provoca daños directos en el ADN e inhibe sus mecanismos de reparación, además induce estrés oxidativo (Bresson *et al.*, 2013) de ahí que son escasos los informes de bacterias resistentes a cobalto (Marrero *et al.*, 2007; Díaz, 2013).

Los metales pesados están presentes en la mayoría de las aguas de formación en unas pocas partes por millón de concentración. También es posible encontrarlos asociados a las cadenas hidrocarbonadas de las fracciones más pesadas del crudo. Los elementos níquel, cobalto y vanadio son los metales que con frecuencia se encuentran en los yacimientos de petróleo.

Los microorganismos empleados en los procesos

de MEOR deben resistir las condiciones estresantes propias de los yacimientos. Aunque los metales pesados no son uno de los factores abióticos más estudiados en este campo, sí se tienen en cuenta, por su efecto negativo en el crecimiento microbiano. Por tal motivo estos resultados son de gran importancia para los procesos de MEOR. Además, ratifica a estas cepas como candidatas para ser evaluadas en los procesos de biorremediación de ambientes impactados por hidrocarburos y metales pesados.

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOTENSOACTIVOS

Los microorganismos productores de biotensoactivos son fundamentales para que se incremente la producción de petróleo a través de los procesos de MEOR. El aislamiento e identificación de las bacterias productoras de este metabolito, a partir de sus ecosistemas naturales, representa una ventaja ya que son microorganismos adaptados a las condiciones extremas presentes en estos ambientes (Dong *et al.*, 2016). Por esta razón se evaluó la habilidad de producción de biotensoactivos por las cepas en estudio mediante cuatro métodos diferentes.

Hemólisis en agar sangre

En la **Figura 4** se muestra la actividad hemolítica de las cepas en agar sangre después de 120 horas de incubación.

Todos los aislados mostraron halos de hemólisis alrededor de las colonias (actividad hemolítica), excepto la cepa *B. subtilis* CC33.



Figura 4. Hemólisis producidas por las cepas autóctonas del yacimiento de crudo cubano en Agar Sangre. Las placas se incubaron a 30°C durante 120 horas. Las flechas indican la hemólisis (halo transparente).

Los valores del diámetro de la hemólisis se relacionan en la **Tabla 2**.

Según Varadavenkatesan y Murty, (2013) si el diámetro de la hemólisis es menor a uno, ocurre una hemólisis parcial y si es mayor a este valor, ocurre una hemólisis completa. Si se tiene en cuenta este criterio las

Aislados	<i>B. subtilis</i>	<i>A. veronii</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>
	CC21	CC22	CC23	CC31	CC32	CC33
Diámetro [cm]	0.5	0.6	0.5	1.0	1.3	0.0

Tabla 2. Diámetro [cm] de la hemólisis en agar sangre de las cepas autóctonas del yacimiento de crudo, durante 120 horas, 30 °C.

El colapso de la gota es un método cualitativo, sensible y muy eficiente, además demanda poco volumen de muestra. Su aplicación es fácil, rápida y no requiere de equipo especializado para su ejecución. Según Varadavenkatesan y Murty (2013), el colapso de la gota se clasifica en cuatro categorías teniendo en cuenta el diámetro (D) después del colapso, las cuales son: no colapso, colapso parcial ($D < 1$ cm), colapso casi completo ($1 \text{ cm} < D < 1.5$ cm),

cepas *B. subtilis* CC32 y *B. subtilis* CC31 presentaron una hemólisis completa, mientras que *A. veronii* CC22, *B. subtilis* CC23, *B. subtilis* CC21 realizaron una hemólisis parcial. Este resultado se explica por la producción incrementada de biotensoactivos por CC32 y CC31 en comparación con las demás cepas evaluadas.

La hemólisis en Agar Sangre es una técnica preliminar para la determinación de la producción de biotensoactivos. Se considera un método poco específico debido a que algunas enzimas celulares, como las hemolisinas, también causan la oxidación de la hemoglobina en los glóbulos rojos (Hamed *et al.*, 2012). Por otro lado, la difusión del biotensoactivo inhibirá la formación de zonas claras. Además, algunos surfactantes no tienen actividad hemolítica (Madigan *et al.*, 2014). Es por ello que se ha referido con anterioridad que esta técnica presenta altos niveles de resultados tanto falsos-positivos como falsos-negativos (Varjani *et al.*, 2014). Aun así, es un método ampliamente utilizado debido a su sencillez (Sanjana *et al.*, 2017).

Colapso de la gota

En la **Figura 5** se muestra el ensayo del colapso de la gota, realizada para la prospección de la producción de biotensoactivos por parte del sobrenadante libre de células de los cultivos de las seis cepas en estudio. Se aprecia que cinco de los aislados bacterianos mostraron colapso de la gota (destacado con las flechas azules). Sólo el aislado *B. subtilis* CC33 mostró un comportamiento similar al del control negativo (agua destilada estéril), manteniendo la forma de la gota (señalizado con las flechas rojas).

colapso completo ($1.5 \text{ cm} < D$). Los mayores diámetros corresponden a aquellos microorganismos que produzcan mayor cantidad de biotensoactivos.

En la Figura 6 se muestra el diámetro del colapso de la gota para los 6 aislados que se analizaron. El 100 % de las cepas positivas a esta prueba, mostraron colapso completo con diámetros entre 3,5 y 4,8 cm. El mayor diámetro se observó en la cepa *B. subtilis* CC31, que mostró

en promedio una expansión de la gota de 4,5 cm. Le siguen en orden decreciente según el diámetro del colapso de la gota, los aislados: *B. subtilis* CC32 (4,2 cm), *B. subtilis* CC23 (3,9 cm), *B. subtilis* CC21 (3,8 cm) y *A. veronii*

CC22 (3,5 cm). Según estos resultados se infiere que los cinco aislados que mostraron colapso de la gota lo hicieron gracias a una producción considerablemente alta de biotensoactivo.



Figura 5. Ensayo del colapso de la gota con tres repeticiones para cada aislado y el control. (A) Control (agua destilada estéril); (B) *B. subtilis* CC21; (C) *A. veronii* CC22; (D) *B. subtilis* CC23, (E) *B. subtilis* CC31, (F) *B. subtilis* CC32; (G) *B. licheniformis* CC33. Las líneas rojas muestran el mantenimiento de la forma de la gota. Las líneas azules muestran el colapso de la gota.

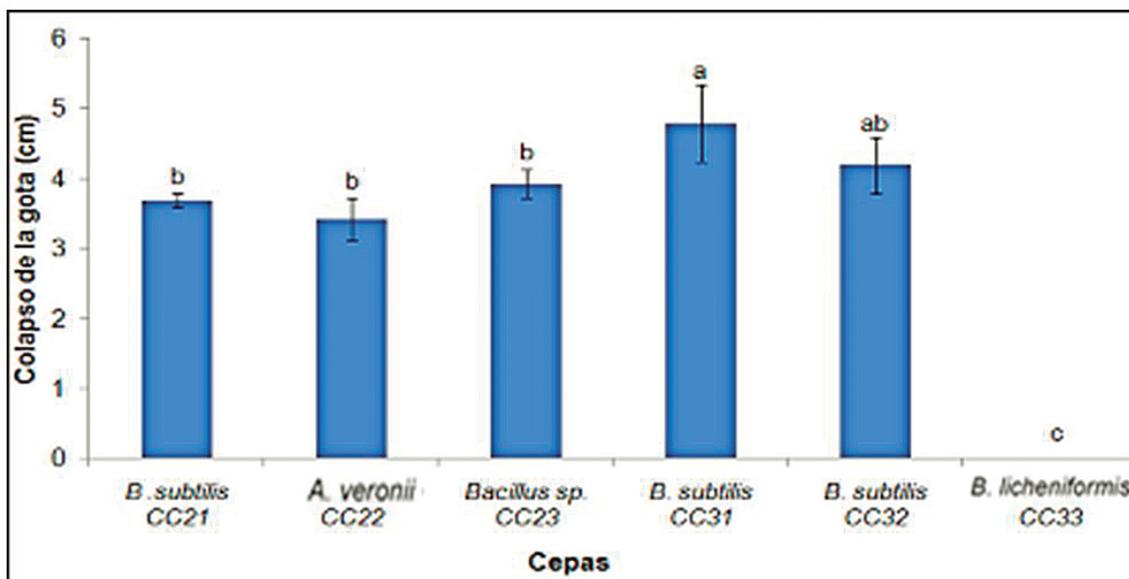


Figura 6. Colapso de la gota (cm) de los sobrenadantes libres de células de las cepas autóctonas del yacimiento de crudo cubano. Las barras muestran la desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas, Tukey (n=3, p<0.05).

Desplazamiento del petróleo

La presencia de biotensoactivos en el sobrenadante de las seis cepas se analizó mediante el método del desplazamiento del petróleo. Dicha técnica es sencilla y útil para bajas concentraciones de biotensoactivos y baja actividad superficial. Si hay presencia de tensoactivos el crudo se desplaza y aparecen zonas claras. En la **Figura 7** se muestran los resultados para esta prueba.

En la realización del ensayo experimental se observó la rápida formación de un halo debido al desplazamiento del crudo cuando se aplicó el sobrenadante de los cultivos de *B. subtilis* CC21, CC23, CC31, CC32 y *A. veronii* CC22. La cepa *B. licheniformis* CC33 no mostró desplazamiento de petróleo, comportándose de forma similar al control negativo (**Figura 7**). En esta imagen se aprecia que los aislados *B. subtilis* CC21, *A. veronii* CC22 y *B. subtilis* CC31 mostraron un desplazamiento total del petróleo hacia los bordes de la placa. Lo expuesto se atribuiría a una mayor concentración del bio-producto evaluado en el sobrenadante libre de células para los casos mencionados.

Todas las cepas que mostraron resultados positivos en el ensayo del colapso de la gota y en la hemólisis en Agar Sangre, también resultaron positivas en el desplazamiento de petróleo. Estos resultados confirman la producción (para las cepas con resultados positivos) o no

(para la cepa con resultado negativo) de biotensoactivos.

Resultados similares se informaron en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de agua de mar (Thavasi *et al.*, 2011) y suelos contaminados con hidrocarburos (Varjani *et al.*, 2014).

El método del desplazamiento de petróleo es muy simple y requiere poco volumen de muestra, lo que favorece su repetitividad (Tamura *et al.*, 2011). Además, para su realización no hacen falta instrumentos especializados (Varjani *et al.*, 2014).

Medición de la tensión interfacial

La tensión interfacial (π) entre dos líquidos depende de la fuerza de cohesión entre las moléculas de cada líquido y de la fuerza de adhesión entre las moléculas de un líquido y el otro. De dicha manera, la tensión interfacial entre dos líquidos se relaciona con la tensión superficial de cada líquido saturado en el otro. Para disminuir la π , los surfactantes actúan como un «puente» formando una tercera fase de «microemulsión» que favorece la interacción entre la fase acuosa y la del hidrocarburo (Raiger y López, 2009).

En la **Tabla 9** se muestran los valores de la medición interfacial entre el sobrenadante libre de células y petróleo crudo. Las mediciones se hicieron semanalmente por un período de 21 días. Como control se utilizó agua destilada estéril.

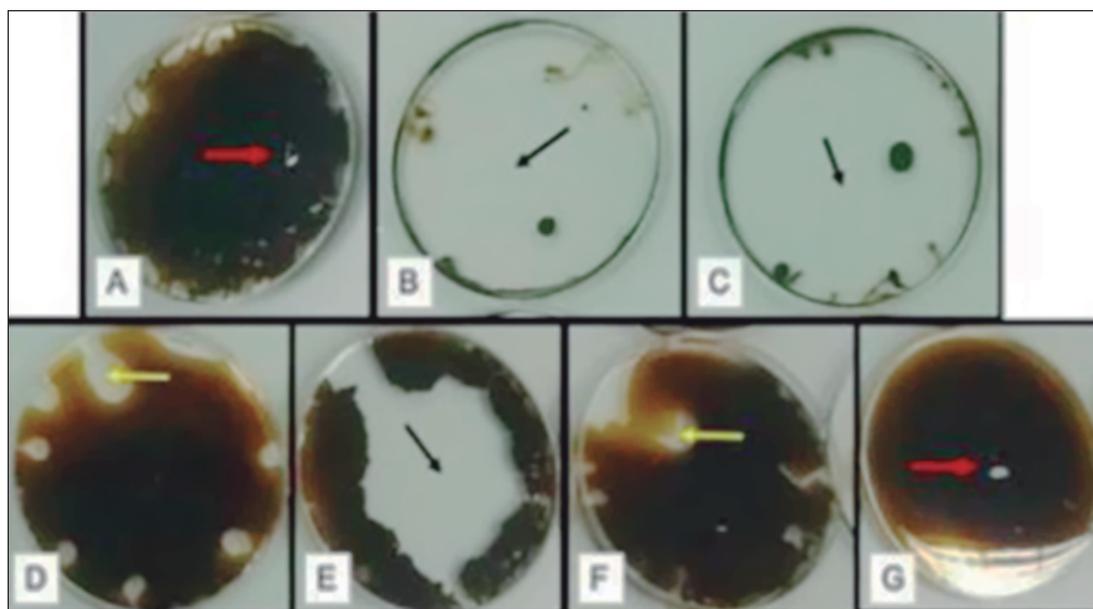


Figura 7. Desplazamiento de petróleo causado por los sobrenadantes libres de células de las cepas autóctonas del yacimiento de crudo. (A) Control, (B) *B. subtilis* CC21 (C) *A. veronii* CC22, (D) *B. subtilis* CC23, (E) *B. subtilis* CC31, (F) *B. subtilis* CC32, (G) *B. licheniformis* CC33. Las líneas: rojas señalan la gota sin desplazarse, las amarillas muestran un desplazamiento parcial, las negras muestran un desplazamiento total.

Muestra	Período de incubación			
	24h	7 días	14 días	21 días
Tensión interfacial [mN/m]				
Control	46.30	45.20	45.10	44.30
<i>B. subtilis</i> CC21	42.40	40.00	35.20	33.30
<i>A. veronii</i> CC22	44.70	43.08	33.12	29.70
<i>B. subtilis</i> CC23	42.90	38.20	29.64	30.97
<i>B. subtilis</i> CC31	47.87	43.70	36.00	28.17
<i>B. subtilis</i> CC32	43.04	43.72	35.37	30.10
<i>B. licheniformis</i> CC33	45.80	45.20	44.70	43.10

Tabla 3. Medición de la tensión interfacial entre el sobrenadante libre de células de cada aislado y petróleo crudo, realizada semanalmente por un período de 21 días. Control: agua destilada estéril.

En general se observó que la tendencia de la tensión interfacial (TI) para todas las cepas que se evaluaron fue la de disminuir en el tiempo. El aislado *B. subtilis* CC31 mostró la mayor disminución de la TI, siendo esta de 1.7 veces menor de su valor inicial, transcurridos 21 días. Con la cepa *A. veronii* CC22 también a las 3 semanas de tratamiento se obtuvo la mayor disminución de la TI, siendo 1,5 veces menor de su valor inicial. Los aislados *B. subtilis* CC32, *B. subtilis* CC23 y *B. subtilis* CC21 al final del período evaluado disminuyeron la TI entre 1.42 y 1.27 veces. El aislado *B. licheniformis* CC33 se comportó de manera similar al control, ratificando los resultados obtenidos en los análisis del colapso de la gota, el desplazamiento del petróleo y la hemólisis en agar sangre, catalogándose como no productor de biotensoactivo.

Los biotensoactivos son compuestos intracelulares o extracelulares, sintetizados por los microorganismos durante su crecimiento en sustratos específicos, durante la fase estacionaria o en respuesta a las condiciones ambientales. Al ser producto del metabolismo secundario, no se sintetizan en las primeras fases del crecimiento microbiano. (Madigan *et al.*, 2014). Para la medición de la TI los aislados se mantuvieron en fermentación estática y temperatura ambiente, en medio mínimo UOM con petróleo crudo como única fuente de carbono y energía. Todas las cepas evaluadas presentaron un largo período de adap-

tación a dichas condiciones, nunca alcanzándose la fase estacionaria del crecimiento antes de las dos semanas de incubación. Los mejores resultados en la disminución de la TI se corresponden con dichos resultados, evidenciándose la mayor producción de biotensoactivo después del período de adaptación y del crecimiento exponencial.

RESISTENCIA A LA SALINIDAD Y TERMOESTABILIDAD DE LOS SURFACTANTES OBTENIDOS A PARTIR DE CEPAS PRODUCTORAS

Los yacimientos de petróleo son generalmente ambientes extremos sometidos a altas temperaturas y elevada salinidad del agua de capa. En un proceso de MEOR tanto los microorganismos utilizados, como los bioproductos que ellos generan, necesariamente tienen que resistir tales condiciones. En la **Tabla 4** se resumen los resultados obtenidos en la evaluación de la estabilidad de los biotensoactivos (contenidos en el sobrenadante libre de células) generados por las cinco cepas que demostraron la producción de dicho metabolito. Para este análisis se mezclaron en la misma proporción con cuatro modelos de disoluciones salinas. Como control se sustituyó el sobrenadante por la misma cantidad de medio de cultivo sin inocular. Las condiciones evaluadas fueron las siguientes: mantenimiento de las mezclas de los sobrenadantes con cada disolución a temperatura ambiente (TA)

y 70 °C, con evaluación visual a las 24 horas y a los 7 días. La aparición de un precipitado o de turbidez en el

medio indica la no estabilidad del biotensoactivo bajo esas condiciones.

Disolución salina		<i>B. subtilis</i> CC21	<i>A. veronii</i> CC22	<i>B. subtilis</i> CC23	<i>B. subtilis</i> CC31	<i>B. subtilis</i> CC32	Control
1)	80% NaCl y	A	B	B	A	A	A
2)	20% CaCl ₂ [17 g/l]						
3)	80% NaCl y 20% CaCl ₂ [200 g/l]	C	C	C	C	C	A
4)	NaCl [17 g/l]	A	A	A	A	A	A
5)	NaCl [200 g/l]	A	A	A	A	A	A

Tabla 4. Evaluación de la estabilidad ante elevada temperatura y distintas mineralizaciones de disoluciones salinas, de los biotensoactivos producidos por cinco de los aislados bacterianos estudiados. (A) Estable bajo todas las condiciones evaluadas, (B) Aparición de precipitado después de 7 días a 70 °C, (C) Abundante turbidez y precipitado desde las 24 horas tanto a TA como a 70 °C

De manera general se aprecia que en contacto con la disolución 1 después de 24 horas, tanto a temperatura ambiente como a 70°C, no apareció precipitado en ninguno de los frascos. Transcurridos 7 días a la temperatura de 70°C, los biotensoactivos producidos por *B. subtilis* CC22 y *A. veronii* CC22 no se mantuvieron estables, apreciándose un ligero precipitado en los frascos que los contenían. El control se mantuvo invariable.

Ante el modelo de disolución salina número 2, el cual poseía una salinidad total de 200 g/l en proporciones de 80 % NaCl y 20 % CaCl₂, todos los biotensoactivos que se evaluaron resultaron inestables desde la primera inspección visual realizada a las 24 horas. A temperatura ambiente se observó la aparición de precipitado, que en alguno de los casos no se depositó completamente en el fondo del frasco. Transcurrido este mismo tiempo se observó que las muestras que se mantuvieron a 70 °C tenían mayor cantidad de precipitado y la presencia de una película en suspensión que se mantenía en la superficie. Después de 7 días la cantidad de precipitado en todos los casos aumentó y se extinguió la película de la superficie.

Los medios de cultivo aclararon demostrando la casi total deposición de su material en suspensión. Solo en el caso del control no hubo cambios apreciables. Por los resultados se infiere que este efecto estará dado por la presencia en la disolución de la sal de calcio.

Tanto para el caso de la disolución 3 como de la 4 bajo todas las condiciones evaluadas, el sobrenadante libre de células de las cinco cepas mantuvo un comportamiento similar al control. De esta manera se demuestra su estabilidad ante distintas concentraciones de NaCl (17 g/l y 200 g/l). La temperatura tampoco afectó en estos casos.

Hay que considerar que los biotensoactivos de origen bacteriano son moléculas complejas que abarcan una amplia gama de compuestos químicos que incluyen péptidos, ácidos grasos, fosfolípidos, lipopéptidos, entre otros. La mayoría de estos compuestos son aniónicos y solo algunos se catalogan como catiónicos, tal es el caso de los que contienen grupos amino (Madigan *et al.*, 2014). La interacción de los tensoactivos con su entorno es un proceso complejo que involucra múltiples factores. En cualquier caso, para que se entiendan los fenómenos

químico-físicos involucrados es necesario conocer la estructura de la molécula para determinar cómo la afectan factores tales como la temperatura y la salinidad (Martínez, 2011).

El mayor efecto negativo sobre la estabilidad de los biotensoactivos se apreció al ponerlos en contacto con la disolución 2, la cual poseía la mayor concentración de dos sales distintas, una monovalente (NaCl) y otra divalente (CaCl₂). De manera general, la adición de electrolitos tiende a que disminuya la solubilidad de muchas sustancias en agua, e incluso producirá la precipitación en forma de fase sólida (Martínez, 2011). En el caso de las sustancias tensoactivas la adición de electrolitos disminuye la solvatación de la parte hidrofílica del surfactante. La presencia de electrolitos tiende a decrecer la concentración micelar crítica (CMC, que se refiere a la menor concentración donde aparecen las primeras micelas) ya que produce una mayor concentración de iones en la vecindad de la superficie de las micelas y por lo tanto resulta en un efecto de pantalla que reduce las repulsiones electrostáticas entre las partes hidrofílicas cargadas (Sallager, 2005).

En el efecto de la salinidad sobre los tensoactivos es necesario que se consideren las valencias de las sales involucradas (Patermina, 2015). En el caso de las sales monovalentes, como es el NaCl, a mayor presencia de iones Na⁺ en el medio, se genera un aumento en la adsorción de los surfactantes. Lo expuesto está dado porque al incrementar las concentraciones de iones en el sistema, conlleva a un incremento de la fuerza iónica, lo que genera una disminución en la distancia entre los diferentes iones presentes y ocasiona la compresión en la doble capa eléctrica entre una superficie sólida y el medio. Esto implica que la presencia de este tipo de sales generarían fenómenos de precipitación y redisoluciones de surfactantes (Patermina, 2015). En nuestro caso de estudio esta sal no causó efectos negativos en la estabilidad de los biotensoactivos que se evaluaron.

Para el caso de los iones divalentes como el CaCl₂, a mayor cantidad de iones divalentes el proceso predominante es la formación de micelas en salinidades intermedias y bajas. Las elevadas cantidades de iones divalentes intensifica la compresión de la doble capa eléctrica, así como la formación de agregados en el sustrato, lo que provoca un aumento del fenómeno de adsorción. En un estudio realizado por Patermina (2015) se demostró que, en el caso del efecto de los iones divalentes, este re-

sultaba en un comportamiento más complejo, en donde el aumento de dureza beneficiaba ampliamente la formación de micelas sobre la adsorción de surfactante en el sustrato bajo condiciones intermedias de salinidad.

En otro experimento realizado por Chávez y colaboradores en el año 2009, se estudió la influencia de NaCl, Na₂SO₄ y Na₂HPO₄ sobre la concentración micelar crítica de mezclas de surfactantes tipo alcoholes polietoxilados. Estos investigadores encontraron que los aniones divalentes SO₄⁻² y HPO₄⁻² redujeron la CMC en mayor grado que el anión Cl⁻. Los surfactantes presentaron alta actividad superficial en presencia de Na₂SO₄ y Na₂HPO₄ más que en NaCl. Por consiguiente, para que el NaCl originara un cambio efectivo la concentración de la disolución de esta sal debía ser, por lo menos, tres veces mayor de la respectiva concentración de Na₂SO₄ y Na₂HPO₄. Esto se explica ya que muchos de los electrolitos inorgánicos reducen la solubilidad de solutos orgánicos en agua (fenómeno de *salting-out*), y otros tienen una acción opuesta (efecto de *salting-in*). Los electrolitos se clasifican dentro de la llamada serie Hofmeister acorde a su fuerza de *salting-out* a una concentración molar dada:



Para los biotensoactivos se sabe, por ejemplo, que altas concentraciones de cloruro de sodio inactivan a los glicolípidos. En tal caso *B. licheniformis* produce liquenisina A a concentraciones de cloruro de sodio superiores al 13 %, ya que este resulta más estable que el Surfactin (Martínez, 2011).

En el caso particular de las cepas en estudio, estas se aislaron de crudo proveniente del yacimiento cubano Boca de Jaruco. En este yacimiento se encontrará agua de formación tipo agua de mar, débilmente básica, muy dura, con predominio de cloruro de sodio y una salinidad total de aproximadamente 27 g/l. Por tal motivo los resultados reportados de la estabilidad de los biotensoactivos producidos por estas bacterias a concentraciones de hasta 200 g/l de NaCl son muy alentadores. La inestabilidad de los mismos ante la disolución de 200 g/l en proporciones de 80 % de NaCl y 20 % de CaCl₂ no resulta limitante ya que esta formulación implica una concentración de 40 g/l de la sal divalente, lo cual en condiciones de yacencia no se encuentra. Solo en los casos del sobrenadante libre de células a partir de *B. subtilis* CC22 y *A. veronii* CC22 y luego de 7 días a una temperatura mantenida de 70 °C en contacto con

la disolución 1 apareció un precipitado. Se asume que este efecto negativo también fue causado por la presencia del CaCl_2 y se demuestra que los bioproductos generados por estas cepas son más sensibles a dicha sal.

El otro aspecto a considerar es la temperatura. Un aumento de la temperatura se conoce que causa una desorganización creciente de las moléculas de agua que se encuentran cerca del grupo no polar. Como consecuencia el desajuste agua-grupo no polar decrece, o en otros términos la compatibilidad aumenta, lo que desfavorece la formación de micelas (la CMC disminuye). Además, el aumento de temperatura también genera una reducción de hidratación del grupo hidrofílico. Dicho efecto es aquel que provoca el punto de turbidez de los surfactantes y por lo tanto tiende a que se favorezca la micelización, lo que contribuye a la formación de micelas a menor concentración (Salager, 2005).

El punto de turbidez (cloud point) es esencialmente independiente de la concentración de surfactante. A medida que aumenta la temperatura, se reduce la hidrofiliidad del surfactante. La CMC del surfactante disminuye y el número de agregación crece; las micelas aumentan de tamaño y al llegar a cierto valor (centenares de Amgstrons) empiezan a interactuar con la luz, produciendo una turbidez. Si se sigue aumentando la temperatura, las micelas llegan a un tamaño suficiente (micrómetro) para que la gravedad las pueda sedimentar, produciéndose una separación de fase.

La estabilidad del bioproducto a 70 °C se evaluó aun cuando la temperatura típica del yacimiento no supera los 50 °C. En el caso de estudio se considera que la temperatura no fue un factor limitante ya que en los casos donde se observó la presencia de precipitado se infiere que el mismo se provocó por la agresión salina de los iones de calcio.

CONCLUSIONES

- Los aislados bacterianos crecieron activamente en un intervalo de 35 a 50° C. Todas las cepas toleraron una salinidad de 0 % a 10 % de NaCl. Además, todos los aislados crecieron en el intervalo de pH de 5 a 9.
- Los métodos hemólisis en agar sangre, medición de la tensión interfacial, colapso de la gota y desplazamiento del petróleo fueron utilizados para evaluar la capacidad de los aislados para sintetizar biotensoactivos. Cinco de las seis cepas fueron catalogadas como productoras de biotensoactivos.

- La temperatura de 20 a 70 °C no interfiere en la estabilidad de los biotensoactivos producidos. Estos bioproductos resultaron sensibles al cloruro de calcio (a una concentración de 20 % en 200 g/l), no así al cloruro de sodio hasta una concentración de 200 g/l.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Sulaimani, H., S. Joshi, Y. Al-Wahaibi, S. Al-Bahry, A. Elshafie y A. AlBemani**, 2011, Microbial biotechnology for enhancing oil recovery: Current developments and future prospects. *Biotechnol. Bioinf. Bioeng*, 1 (2):147-158.
- Bresson, C., C. Darolles, A. Carmona, C. Gautier, N. Sage, S. Roudeau, r. Ortega, E. Ansoberlo y V. Malard**, 2013, Cobalt chloride speciation, mechanisms of cytotoxicity on human pulmonary cells, and synergistic toxicity with zinc. *Metalomics*, 5 (2): 85-176.
- Chávez, G., G. Arenas, I. Parra, M. Luzardo, B. Bravo, Ysambertt F. y N. Márquez**, 2009, Estudio de las variables fisicoquímicas en el proceso de micelización de mezclas de surfactantes no-iónicos polietoxilados en la interfase agua/aire. Parte I: efecto de la salinidad. *Ciencia* 17(3):235-244.
- Díaz, A.**, 2013, Caracterización de la resistencia a metales de una colección bacteriana aislada del yacimiento niquelífero de Moa (Cuba) y sus potencialidades en la biorremediación ambiental de sitios contaminados por metales pesados. Tesis presentada para optar por el grado científico de doctor. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.
- Dong, H., W. Xia, H. Dong, Y. She, P. Zhu, K. Liang, Z. Zhang, C. Liang, Z. Song, S. Sun y G. Zhang**, 2016, Rhamnolipids Produced by Indigenous *Acinetobacter junii* from Petroleum Reservoir and its Potential in Enhanced Oil Recovery. *Front. Microbiol.* 7:1710.doi: 10.3389/fmicb.2016.01710.
- Jiménez D., Medina S y Gracida J.**, 2010, Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 26(1): 65-84.
- Kohr, W.**, 2012, Microbial enhanced oil recovery methods. USA. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Patent No: MX 2012002380 A.

- Laith Al-Araji, Raja Noor Zaliha Raja Abd. Rahman, Mahiran Basri y Abu Baker Salleh.** *MINIREVIEW Microbial Surfactant. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 2007; 15(3): 99-105.
- Logan, N. A y P De Vos**, 2007, Genus I. Bacillus. en: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2da Edición. Vol 3. The Firmicutes. Brenner et al. (Eds). pp. 21-127.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley, D. A. Stahl**, 2014, *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Education.
- Maneerat, S. y K. Phetrong**, 2007, Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. Songklanakarin. *Journal of Science and Technology*, 29:781-791.
- Marrero, J. G. Auling, O. Coto y D. H. Nies**, 2007, High-Level Resistance to Cobalt and Nickel but Probably No Transenvelope Efflux: Metal Resistance in the Cuban *Serratia marcescens* Strain C-1. *Microbial Ecology*, 53:123-133.
- Martin y S. W. Joseph Genus I. Aeromonas**, 2007, Genus I. Bacillus. en: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2da Edición. Vol 2. The Proteobacteria. Part B. The Gamma-proteobacteria Brenner *et al.* (Eds). pp.557-578.
- Martínez, X.**, 2011, Producción de biotensoactivos por microorganismos aislados de sitios extremos y contaminados con hidrocarburos. Tesis para obtener el título de Ingeniero Ambiental. IPN. Unidad Profesional Interdisciplinaria de biotecnología. México.
- Omoniyi, O.A y F. Abdulmalik**, 2015, A review of microbial enhanced oil recovery: Current development and future prospects. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 6 (1): 1378-1389.
- Patermina, C., Londoño, A., Botett, J., Rondon, M., Mercado, R., Muñoz, S.**, Influencia de la salinidad y dureza del agua sobre la adsorción estática de surfactantes extendidos en el medio poroso., *Memorias del Congreso Colombiano del Petróleo*, Bogotá, 2015, consultado en <http://www.opec.org>.
- Raiger L. J. y N. I. López**, 2009, Los biotensoactivos y la industria petrolera. *Química Viva*, 8 (3): 146-161. ISSN 1666-7948.
- Salager J.**, 2005, Recuperación mejorada de petróleo. Cuaderno FIRP S357-C Universidad de los Andes, 1ra Versión. Venezuela.
- Sanjana S. Varma, Durgesh D. Wasnik and P.M. Tumane**, 2017, Production and characterization of biosurfactant by bacillus subtilis isolated from soil samples. *International Journal of Development Research* Vol. 07, Issue, 08, pp.14857-14864. ISSN: 2230-9926
- Tamura, D., N. Peterson, G. Peterson, M. Stecher, M. Nei y S. Kumar**, 2011, MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Thavasi, R., S. Sharma y S. Jayalakshmi**, 2011, Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. *J Pet Environ Biotechnol*, 1: 1-6, doi: 10.4172/2157-7463.S1-001.
- Varadavenkatesan, T. y V.R. Murty**, 2013, Production of a Lipopeptide Biosurfactant by a Novel Bacillus sp. and Its Applicability to Enhanced Oil Recovery. *ISRN Microbiology*, 2013 (1):1-8.
- Varjani, S. J., D. P. Rana, S. Bateja, M. C. Sharma y V. N. Upasani**, 2014, Screening and identification of biosurfactant (bioemulsifier) producing bacteria from crude oil contaminated sites of Gujarat, India. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 3 (4): 9205-9213.
- Xiao, M., S. S. Sun, Z.Z. Zang, J. M. Wang, L. W. Qiu, H. Y. Sun, Z. Z. Song, B. Y. Zhang, D. L. Gao, G. Q. Zhang y W. M. Wu**, 2016, Analysis of bacterial diversity in two oil blocks from two lowpermeability reservoirs with high salinities. *Scientific RepoRts*, 6 (19600): 1-10. doi:10.1038/srep19600.
- Yernazarova, A., G. Kayirmanova, A. Baubekova y A. Zhubanova**, 2016, Microbial Enhanced Oil Recovery. INTECH. doi: 10.5772/64805.
- Zhang X. y T. Xiang**, 2010, Review on Microbial Enhanced Oil Recovery Technology and Development in China. *International Journal of Petroleum Science and Technology*, 4(1):61-80.