









Extraction and characterization of a biosurfactant synthesized by *Acinetobacter baumannii*

Extracción y caracterización de un biosurfactante sintetizado por *Acinetobacter baumannii*

Rubícel Torres-Custodio, Miguel Ángel Hernández-Rivera , José de los Santos López-Lázaro , Yolanda Córdova-Bautista , Juan Gabriel Álvarez-Ramírez , Pio Sifuentes-Gallardo , Marcia Eugenia Ojeda-Morales* 

Laboratorio de Biotecnología, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Km. 1 Carretera Cunduacán-Jalpa, Colonia La Esmeralda, Cunduacán, C.P. 86690, Tabasco, Mexico.

*Corresponding author

E-mail address: marcia.ojeda@ujat.mx (M. E. Ojeda-Morales)

Article history:

Received: 26 August 2022 / Received in revised form: 26 November 2022 / Accepted: / 4 December 2022 / Published online: 3 January 2023.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2023.8.1.37>

ABSTRACT

Biosurfactants are metabolites produced by microorganisms during their growth and reproduction. They are amphiphilic molecules capable of modifying surface and interfacial tension. A petrophilic, nitrogen-fixing, phosphorus-solubilizing, and biosurfactant-producing bacterial strain was isolated and characterized. The isolated strain was cultivated in Kim medium with a C:N ratio of 2:1, from which its growth kinetics was determined. Samples of the culture broth were taken at different times and the collapsed drop, oil dispersion and emulsification index tests were performed. Maximum culture growth occurred at 72 h. The biosurfactant was extracted from the crude cell-free broth using a mixture of solvents and a yield of 2.21 g/L was obtained. Thin-layer chromatography and FT-IR analyzes revealed the presence of a lipopeptide biosurfactant. Tensiometry tests showed that the biosurfactant was able to lower the surface tension of water from 72 mN/m to 40 mN/m and the critical micelle concentration was 0.058 (w/w). Probit analysis for toxicity determination showed that there was no weight loss in *Eisenia foetida* specimens in a range between 10000 and 50000 ppm.

Keywords: bioremediation, biosurfactants, nitrogen-fixing bacteria, petroleum.

RESUMEN

Los biosurfactantes son metabolitos producidos por microorganismos durante su crecimiento y reproducción. Son moléculas anfifílicas capaces de modificar la tensión superficial e interfacial. Se aisló y caracterizó una cepa bacteriana petrofílica, fijadora de nitrógeno, solubilizadora de fósforo y productora de biosurfactantes. La cepa aislada fue cultivada en medio Kim con una relación C:N de 2:1, a partir del cual se determinó su cinética de crecimiento. Se tomaron muestras del caldo de cultivo a diferentes tiempos y se realizaron las pruebas de gota colapsada, dispersión de aceite e índice de emulsificación. El crecimiento máximo del cultivo se alcanzó a las 72 h. El biosurfactante se extrajo del caldo crudo libre de células mediante una mezcla de solventes y se obtuvo un rendimiento de 2.21 g/L. Los análisis de cromatografía de capa fina y FT-IR revelaron la presencia de un biosurfactante lipopéptido. Ensayos de tensiometría mostraron que el biosurfactante fue capaz de bajar la tensión superficial del agua de 72 mN/m hasta 40 mN/m y la concentración micelar crítica fue de 0.058 (w/w). El análisis Probit para la determinación de la toxicidad mostró que no hubo pérdida de peso en especímenes de *Eisenia foetida* en un intervalo entre 10000 y 50000 ppm.

Palabras clave: Bacterias fijadoras de nitrógeno, biorremediación, biosurfactantes, petróleo.

1. INTRODUCCIÓN

El petróleo es una mezcla de compuestos de carbono que cuando está en estado líquido se denomina "crudo". En la actualidad sigue siendo la principal fuente de energía y representa más del 80 % del consumo primario. Alrededor del 94 % de la energía usada para el transporte viene de la quema de combustibles fósiles (Niu *et al.*, 2020; Ajona & Vasanthi, 2021; Hoang *et al.*, 2021). La extracción del petróleo se lleva a cabo en tres etapas. La primera, llamada recuperación primaria, hace uso de una cantidad mínima de energía. El petróleo es forzado a salir por diferencias naturales de presión, y la recuperación es de 5 al 10 %. Durante la recuperación secundaria, se somete al pozo a un proceso de estimulación mediante la inyección de algún fluido a presión con la finalidad de ejercer un empuje sobre el aceite y desplazarlo hacia el pozo productor. Aquí la recuperación puede llegar hasta un 40 % (Speight, 2016; Fan *et al.*, 2020). Y finalmente, la recuperación terciaria ocurre cuando no se puede extraer más petróleo por los métodos primarios y secundarios, quedando alrededor de 2/3 partes del petróleo original en su sitio atrapado en los poros de la roca (Zhao *et al.*, 2021).

El uso de estas técnicas de recuperación junto con el almacenamiento, transporte y siniestros provocados por actividades antropogénicas ha generado puntos de contaminación en suelo y agua. En el año 2020 hubo 797 notificaciones de emergencias ambientales, de las cuales 255 correspondieron a derrames de

hidrocarburos (Profepa, 2020; Semarnat, 2020). Otros informes indican que tan solo en Tabasco ocurrieron 832 derrames en el periodo que comprende de 2000 a 2017 por extracción y transporte (Morales-Guzmán *et al.*, 2020) y de acuerdo con Pérez-Muñoz *et al.*, (2019), Tabasco ocupa el tercer lugar en esta categoría a nivel nacional. Por otro lado, en el periodo de 2018 a 2021, Pemex registró un total de 176 eventos entre derrames y fugas (156 derrames y 20 fugas), lo que equivale a 735.85 barriles. Tabasco y Veracruz registraron el 63 % de tales siniestros (Pemex, 2022). Estos derrames tienen un efecto directo sobre la fertilidad del suelo, lo mismo que en el crecimiento y distribución de las plantas. Como consecuencia hay un efecto socioeconómico en las comunidades dedicadas a actividades agrícolas, como las plantaciones de cacao, *Theobroma cacao* L. (Pérez Muñoz *et al.*, 2019). Esto es importante porque México es el undécimo productor de cacao en el mundo, con 38.5 mil ton/año, lo que representa el 0.8 % de la producción mundial que equivale a 4823000 ton. El rendimiento promedio de la producción de cacao en México es de 0.49 ton/ha, con la participación de más de 40000 familias en su producción (ICCO, 2020). Tabasco es el principal productor de cacao en México, aportando el 68.6 % de la producción nacional. Además, el agroecosistema cacao proporciona importantes servicios ambientales, capturando de 80 a 120 ton C/ ha-año (Avendaño-Arrazate, 2021). Considerando que en Tabasco están los campos petroleros con mayor potencial de producción, el riesgo de derrames de petróleo es alto. En casos de derrames, cultivos como el cacao son dañados y contaminados con capas de aceite denso de hasta 20 cm de espesor dejando el suelo infértil y salinizándolo (Morales-Bautista *et al.*, 2019; Pérez Muñoz *et al.*, 2019).

En este sentido, el uso de biosurfactantes para la recuperación o restauración ambiental ha ganado mucha importancia. Los biosurfactantes son moléculas que, si bien se producen durante todo el crecimiento microbiano, su rendimiento es mayor durante la fase estacionaria. Estas moléculas tienen usos medicinales, industriales y alimenticios; al ser anfifílicas, tienen la capacidad de bajar la tensión superficial del agua de 72 mN/m a 30 mN/m, así como de una solución de agua-*n*-hexadecano de 43 mN/m a 1 mN/m. Además, los biosurfactantes tienen amplia diversidad estructural, alta selectividad por moléculas de naturaleza oleosa, baja concentración micelar crítica, son biodegradables y de baja toxicidad, son estables en condiciones extremas, tienen un efecto directo sobre la tensión interfacial, y propiedades espumantes, detergentes, así como dispersantes (Varjani, 2017).

Los biosurfactantes son producidos por hongos filamentosos, levaduras, y principalmente por bacterias (Ojeda-Morales *et al.*, 2016; Carolin *et al.*, 2021; Durval *et al.*, 2020; Hentati *et al.*, 2021; Koutinas *et al.*, 2021; Lopes *et al.*, 2021; Mulligan, 2021; Onaizi, 2021). En el caso particular de las bacterias fijadoras de nitrógeno, éstas son de importancia no sólo como productoras de biosurfactantes, sino también por su papel en los ciclos biogeoquímicos, ya que se encargan de fijar el nitrógeno atmosférico transformándolo en NH₃, NH₄ y otras formas asimilables de nitrógeno (Saeed *et al.*, 2021).

Estos microorganismos además enriquecen el suelo con nutrientes, restaurando su fertilidad cuando ha sido impactado por derrames de hidrocarburos. Algunos géneros han sido reportados en la literatura: *Clostridium*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia* (fijadoras de nitrógeno) y *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacteria*, *Aspergillus*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Achromobacter* (solubilizadoras de fósforo) tanto en la

degradación de hidrocarburos como productoras de biosurfactantes (Ojeda-Morales *et al.*, 2015; Girigiri *et al.*, 2020; Bhosale & Khode, 2021; Kumar *et al.*, 2021). Dada la importancia de estos microorganismos, en esta investigación se aisló y caracterizó un biosurfactante de cepas bacterianas nativas de la rizósfera de plantas de cacao, que son fijadoras de nitrógeno y que además tienen potencial para su aplicación en la restauración de suelos impactados con hidrocarburos del petróleo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Microorganismos, medios de cultivo y condiciones de cultivo

Las cepas microbianas fueron aisladas directamente del sistema radicular de plantaciones de *Theobroma cacao*. El sitio de muestreo se ubicó entre las coordenadas 93° 07' 42.24" de latitud norte y 18° 07' 7.68" de longitud oeste, a 7.5 km al NE de la ciudad de Cunduacán, Tabasco.

La rizósfera procedente de las raíces fue recolectada para su posterior tratamiento. En un matraz se colocaron 10 g de la raíz y 90 mL de agua destilada, se dejó reposar por 1 hora. Para aislar las unidades formadoras de colonias presentes en la rizósfera de cacao se empleó el método de diluciones seriadas y sembrado en placa por extensión, descrito por Madigan *et al.* (2017), y sembrada en medio de cultivo agar rojo Congo de composición ácido málico: 5.0; K₂HPO₄, 0.5; MgSO₄·7H₂O, 0.2; NaCl, 0.1; extracto de levadura, 0.5; FeCl₃·6H₂O, 0.015; KOH, 4.8; agar-agar, 20.0; solución de rojo Congo 15.0. Las bacterias que crecen en este medio reemplazan la metabolización del nitrógeno por el nitrógeno atmosférico que se encierra en el microambiente de la caja de Petri (Salazar & Ordóñez, 2013). Además, el crecimiento en este medio garantiza que las cepas sean bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno (Fitriyanti *et al.*, 2017). Además de las características deseables de fijación de nitrógeno y solubilización de fósforo, es necesario que las cepas sean petrofilicas, por lo cual fueron sometidas a una prueba de degradación de petróleo de carácter cualitativa con el fin de observar si las cepas poseían la propiedad de degradación.

El medio de cultivo Bushnell-Haas fue utilizado para evaluar la capacidad de las bacterias para degradar los hidrocarburos (Hamza *et al.*, 2012; Vaidya *et al.*, 2017). Se prepararon 250 mL de medio de cultivo Bushnell Haas, este fue esterilizado en autoclave a 121 °C por 15 minutos a 15 psi de presión, posteriormente, las cepas fueron sembradas por el método de estriado en placa (Madigan *et al.*, 2017), con 0.1 mL de petróleo estéril como única fuente de carbono. Las cepas tuvieron un periodo de incubación de 72 h, transcurrido este tiempo se observó la presencia de las cepas bacterianas, así como la degradación de hidrocarburos.

2.2 Caracterización del crecimiento microbiano

Después de que las cepas bacterianas fueron sometidas a diferentes filtros de selección (tinción de Gram, prueba de degradación de petróleo, fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo y prueba de ensayo hemolítico), finalmente se eligió sólo una, que fue identificada con la clave CC1. Con el fin de obtener la cinética de crecimiento, se cultivó hasta una absorbancia de 0.3 (OD_{600nm}) en 150 mL de medio caldo nutritivo

de composición (g/L) extracto de carne, 1.0; extracto de levadura, 2.0; peptona caseína, 5.0; NaCl, 5.0. Al llegar a la absorbancia indicada se transfirió el 10 % del medio en 1000 mL de medio Kim de composición extracto de levadura, 0.2; extracto de carne, 5.0; glucosa o dextrosa, 2.0; KH_2PO_4 monobásico, 0.2; K_2HPO_4 dibásico, 0.3; MgSO_4 , 0.1; NaSO_4 , 0.1; CaCl_2 : 0.1; FeSO_4 , 0.1 y una proporción carbono/nitrógeno de 2:1, especializado en la producción de biosurfactantes. Durante el tiempo del crecimiento microbiano se obtuvo muestras de 10 mL a los tiempos (h): 0, 24, 48, 72, 96 y 120. Estas muestras fueron colocadas en tubos de ensayo y preservadas a 4 °C para pruebas posteriores. El experimento se llevó a cabo por triplicado. La medición de la absorbancia se realizó con ayuda de un espectrofotómetro de UV-VIS, Thermo Spectronic Genesys 20. Del mismo modo, los biorreactores contaron con un sistema de aireación con el fin de distribuirlo uniformemente. Estos biorreactores fueron ensamblados de acuerdo con Hernández-Rivera *et al.* (2011). La tasa de flujo volumétrico fue de $1.21 \times 10^{-4} \text{ m}^3/\text{s}$. El software Sigma Plot, versión 14.0 fue utilizado para construir las gráficas de crecimiento microbiano.

2.3 Perfil del potencial de producción de biosurfactantes (métodos indirectos)

Con el objeto de estimar el tiempo de obtención de la máxima producción de biosurfactantes se usaron técnicas de fotogrametría, con ayuda del software FIJI de ImageJ win-32, versión 1.44^o. Las pruebas se hicieron por triplicado por cada tiempo, y de los resultados se calculó el promedio. Con base en esto, se desarrollaron las siguientes técnicas.

a) Caldo libre de células. Se obtuvieron muestras de 30 mL cada 24 h desde el tiempo 0 hasta 120 h, las cuales fueron centrifugadas a 6000 rpm por 30 min a 4 °C, con el fin de sedimentar las células bacterianas y generar así un caldo crudo que contuviera los biosurfactantes y otras moléculas. El sobrenadante fue extraído y almacenado en condiciones asépticas en congelación hasta su utilización.

b) El agar base sangre es una técnica indirecta que busca la presencia de sustancias tensioactivas. En este punto se preparó el agar base sangre de acuerdo con Joy *et al.* (2017). Con ayuda de un horador se extrajo una porción del agar dejando una cavidad circular tubular, en forma de pozo, de 0.8 a 1.0 cm de diámetro, la profundidad dependió del grosor del agar en la placa. El número de cavidades estuvo en función de los tiempos. Cada uno de estos pozos fueron inundados completamente con el caldo crudo libre de células, lo que implicó un gasto de 0.1 mL por cada muestra, en promedio. El caldo crudo no debe tocar la superficie del agar. Como control se usó medio de cultivo sin cultivar. Después de 72 h de incubación a 30 °C o temperatura ambiente $28 \pm 1^\circ\text{C}$, la hemólisis total o parcial alrededor de cada cavidad formó un halo, cuya área fue medida por técnicas de fotogrametría.

c) Dispersión de aceite. En cajas de Petri de 90 x 10 mm, se agregaron 50 mL de agua destilada. Posteriormente se añadió una alícuota de 20 μL de petróleo crudo ligero hasta formar una delgada capa superficial. Después se aplicaron 10 μL del caldo crudo libre de células sobre la fina capa de petróleo que flotaba sobre el agua (Marques-Álvarez *et al.*, 2020). El diámetro de la zona aclarada en todas las pruebas se midió con un vernier. Como control se usó la misma cantidad de μL de caldo sin

cultivar. Este procedimiento fue realizado por cada punto de muestreo. La prueba se consideró positiva cuando, tras la aplicación del caldo crudo, se forma una zona de aclaramiento en la capa de petróleo. La zona de aclaramiento se forma cuando hay presencia de sustancias tensioactivas.

d) Índice de emulsión (IE₂₄). Se mezclaron 2 mL de caldo libre de células y 2 mL de petróleo crudo ligero con ayuda de un vórtex durante 2 min. Posteriormente, la emulsión se dejó reposar por 24 h evitando su exposición a la radiación solar directa. El cálculo del porcentaje fue el resultado de la división de la altura de la emulsión entre la altura total de la mezcla, multiplicado por 100 (Datta *et al.*, 2018). Como sistema control se usó caldo libre de células sin cultivar.

e) Gota colapsada. Para esta prueba se colocaron 40 µL de caldo libre de células en una superficie hidrofóbica de papel parafilm, observando la forma de la gota en los diferentes tiempos de muestreo y midiéndose el diámetro de la gota. La pérdida de la forma de la gota indicó un colapso de la misma provocada por la presencia de sustancias tensioactivas en el caldo, aumentando su diámetro (Ray *et al.*, 2021). Como control se empleó el surfactante con base en alfa-limoneno, con nombre comercial de Ecoterra BS.

2.4 Extracción y purificación del biosurfactante

El caldo crudo fue filtrado en embudo Büchner de porcelana de 9 cm de diámetro interno con papel filtro whatman No. 42, acoplado a un matraz kitasato conectado a bomba de vacío. El caldo filtrado se centrifugó a 3000 rpm por 30 min. Posteriormente, la extracción del biosurfactante se llevó a cabo mediante la precipitación con acetona para eliminar la mayor parte de sustancias no tensioactivas, empleando una relación caldo/acetona 1:1.2 a 4 °C. La acetona se añadió al caldo lentamente a flujo constante manteniendo agitación a 85 rpm durante 15 min, posteriormente se dejó reposar en embudos de separación de 500 mL hasta la precipitación de los sólidos. Después, la acetona fue eliminada en un rotavapor a 70 °C y 30 rpm (Almazán *et al.*, 2000).

El caldo recuperado libre de acetona fue sometido a tres extracciones sucesivas, con una mezcla de solventes cloroformo/metanol con una relación de 2:1. La mezcla de solventes se añadió al caldo con una relación 1:1, con agitación a 85 rpm durante 15 min y se dejó reposar en embudos de separación de 500 mL durante 30 min. El caldo se separó del sobrenadante por diferencia de densidad y en un rotavapor se eliminó la mezcla de caldo/solventes a 35 °C y 30 rpm (Almazán *et al.*, 2000). Finalmente, el sobrenadante fue purificado en un rotavapor a 30 °C y 30 rpm, hasta llegar a la sequedad.

2.5 Propiedades fisicoquímicas del biosurfactante

2.5.1 Identificación de lípidos polares asociados a acción surfactante y FT-IR

La presencia de lípidos polares se determinó por medio de cromatografía en capa fina. El biosurfactante fue analizado en placas de sílica gel 60 F254 de 0.25 mm de 3.5 cm. Un sistema de solventes de cloroformo/acetona/metano/ácido acético/agua destilada en proporción de 6:8:2:2:1 v/v fue utilizado para indicar el lípido polar. Para la

revelación de las diferentes bandas se utilizaron diversas sustancias: difenilamina (2 g, glucolípidos), ninhidrina al 2 % (lipopéptidos) y una solución de 0.01 g de azul de bromotimol en 100 mL de NaOH 0.01N (fosfolípidos). Las placas se calentaron a 100 °C de 5-10 min (Hamilton y Hamilton, 1992). Posteriormente las placas fueron escaneadas para determinar las áreas de las bandas y los factores de retardo (Rf). Para este fin se hizo uso del programa FIJI de ImagenJ win-32 versión 1.44°. El Rf se calculó dividiendo la distancia recorrida por la surfactina u otro componente, en la placa por la distancia recorrida por el frente del solvente y sirvió para identificar el componente en la muestra (Dlamini *et al.*, 2020)

Para soporte de los resultados obtenidos con la cromatografía en capa fina, se llevó a cabo una identificación de los principales grupos funcionales por Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR). Las muestras se analizaron en un espectrómetro marca Shimadzu Modelo IRAffinity-1 FT-IR (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, U.S.A.), en modo transmitancia en un rango de número de onda de 400-4000 cm⁻¹, a una resolución de 4 cm⁻¹ y 50 barridos. Los datos fueron procesadas en el software Irsolution™ (Parthipan *et al.*, 2017; Ohadi *et al.*, 2018; Ashitha *et al.*, 2020).

2.5.2 Índice de refracción

El índice de refracción se determinó en un refractómetro de mesa marca Abbe de Atago. Una gota del tensioactivo puro fue colocado en el prisma del equipo, y de forma manual se manipuló el equipo regulando la luz hasta determinar la escala del índice de refracción. La medición se realizó por triplicado reportando el promedio de 3 repeticiones.

2.5.3 Peso molecular

El peso molecular promedio del biosurfactante se calculó con base en el índice de saponificación de acuerdo con la norma NMX-F-174-S-1981. El índice de saponificación es la cantidad de KOH expresado en mg necesario para saponificar 1 g de aceite o grasa.

2.6 Propiedades termodinámicas del biosurfactante

2.6.1 pH y densidad

La medición del pH se llevó a cabo con un potenciómetro marca HANNA HI 208. En tanto que la densidad fue medida a través del método del micropicnómetro (Ec. 1), tomando como referencia la densidad del agua.

$$\rho_{BT} = \frac{\omega_{\mu m} - \omega_{\mu v}}{\omega_{\mu a} - \omega_{\mu v}} \left(1 \text{ g/cm}^3 \right) \dots \dots \dots \text{(Ec. 1)}$$

En dicha ecuación: $\omega_{\mu m}$ = masa del micropicnómetro con muestra del biosurfactante (g), $\omega_{\mu v}$ = masa del micropicnómetro vacío (g) y $\omega_{\mu a}$ = masa del micropicnómetro con agua destilada (g).

2.7 Determinación de la capacidad y estabilidad de la emulsión agua-petróleo-surfactante

La capacidad y estabilidad de la emulsión fue determinada a través de mediciones con diferentes concentraciones de NaCl, mediante el método modificado de Cassidy & Hudak (2001). En un tubo de ensayo (180 x 18 mL y sellado a 14.7 lb/in²) se adicionaron 2 mL de biosurfactante y 1 mL de agua destilada a diversas concentraciones de NaCl (1, 3, 6, 9, 12 y 15 %). Se agregaron 0.2 mL de petróleo hasta observar una fracción del petróleo en la parte superior de la mezcla. El tubo de ensayo se agitó a 500 rpm durante 20 s en un agitador vórtex marca Barnstead International modelo M16715. El volumen total de petróleo usado se dividió por el volumen de la fase acuosa y esta fue multiplicada por 100, el procedimiento se hizo por triplicado. El resultado se reportó como porcentaje de la capacidad emulsionante. Por otra parte, para determinar la estabilidad de la emulsión se midió el tiempo transcurrido hasta que se observó la separación completa de fases, este tiempo fue anotado y reportado como estabilidad de la emulsión.

2.8 Identificación de la cepa bacteriana: pruebas bioquímicas API 20 E, tinción de Gram y tamaño de la célula

La identificación la cepa bacteriana se realizó a través de una prueba bioquímica API E20 marca bioMérieux. En esta prueba se evaluaron la reducción de nitratos a nitritos, formación de indol, fermentación de la glucosa, arginina dihidrolasa, ureasa y por ensayos de asimilación de D-glucosa, L-arabinosa, D-manosa, D-manitol, D-ribosa, N-acetil glucosamina, D-sorbitol y D-fructosa. El análisis morfológico de la bacteria se realizó en un microscopio HRTEM JEOL JEM 2100 a 200 Kv en modo de campo claro con pieza polar objetiva de alta resolución con filamento de LaB6. Usando el software GATA digital micrograph, calibrado con una muestra patrón de oro en el plano de 1.09 mm con un margen de error de ± 0.1 %. De la misma manera, para llevar a cabo la caracterización fenotípica de la bacteria se utilizó la prueba de tinción diferencial de Gram (Aquiahuatl-Ramos y Pérez-Chabela, 2004; Madigan *et al.*, 2017).

El análisis morfológico de la bacteria se realizó en un microscopio HRTEM JEOL JEM 2100 a 200 Kv en modo de campo claro con pieza polar objetiva de alta resolución con filamento de LaB6. Usando el software GATA digital micrograph, calibrado con una muestra patrón de oro en el plano de 1.09 mm con un margen de error de ± 0.1 %. De la misma manera, para llevar a cabo la caracterización fenotípica de la bacteria se utilizó la prueba de tinción diferencial de Gram (Aquiahuatl-Ramos y Pérez-Chabela, 2004; Madigan *et al.*, 2017). A los aislamientos bacterianos se les practicó un estudio taxonómico empleando la galería del sistema API 20E, específicos para Enterobacteriaceae (Logan y Berkeley, 1984), que incluyeron 21 test bioquímicos con diversos sustratos deshidratados como: tinción de gram, tamaño de la célula, tipo de colonia, oxidasa, catalasa, reducción de nitratos a nitritos, formación de indol, acidificación de D-glucosa, arginina dihidrolasa, ureasa, b-glucosidasa proteasa, asimilación de glucosa, asimilación de arabinosa, asimilación de manosa, asimilación de manitol, asimilación de ribosa, asimilación de sorbitol y asimilación de fructuosa, de los cuales cinco fueron metabolizados. Se obtuvo un perfil numérico que fue analizado

en el software apiwebTM REF 40011 (bioMerieux, France). De la misma manera, en condiciones *in vitro* se estableció en el laboratorio un experimento de acuerdo a Ojeda *et al.* (2016) para determinar por densidad óptica (Córdova-Bautista *et al.*, 2020) el intervalo de temperatura en el que se desarrollaba la población bacteriana medido

2.9 Toxicidad y concentración letal media del biosurfactante

La finalidad del bioensayo de toxicidad fue determinar la probabilidad de pérdida de peso (%) e inhibición de crecimiento de la población de *E. foetida* ante una concentración conocida del biosurfactante producido por la cepa CC1. Esta prueba consistió en dos fases: 1) Por contacto por papel filtro, para determinar las concentraciones en suelo, y 2) Prueba con suelo artificial y muestras de suelo contaminado, de acuerdo con la guía 207 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos para la evaluación de las sustancias (OECD, 1984), y la publicación 96-327 del Departamento de Ecología del Estado de Washington (WSDE, 1996).

Para calcular la dosis letal (CL₅₀) se colocaron 10 individuos de *E. foetida* en matraces de 500 mL con 250 g de suelo, cada tratamiento se realizó por triplicado. Se usaron siete concentraciones del biosurfactante puro desde 10x10³ ppm hasta 80x10³ ppm. El biosurfactante fue diluido en agua destilada hasta lograr un 80 % de humedad en el suelo. El diseño experimental fue completamente aleatorizado unifactorial, y los resultados obtenidos fueron analizados con el software Probit Analysis ProGram, seguido de un ANOVA. El cálculo de la CL₅₀ se evaluó a los 14 días de la exposición.

2.10 Tensión superficial y concentración micelar crítica

En un tensiómetro digital Krüs modelo K 10 ST se llevaron a cabo las mediciones de la tensión superficial y la concentración micelar crítica del biosurfactante puro producido por la cepa *Acinetobacter baumannii* (CC1). El equipo permite la medición de la tensión superficial e interfacial entre dos líquidos inmiscibles. El método empleado fue el del plato de Wilhelmy a una temperatura de 30 °C.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterización del crecimiento microbiano

Las condiciones ambientales para el crecimiento son importantes, de manera que el medio también es esencial porque cada microorganismo tiene sus propios requerimientos. En la figura 1 se muestra la cinética de crecimiento. En la gráfica se observa el inicio de la cinética a una OD_{600nm} = 0.3. El biorreactor con medio de Kim fue inoculado con 10 % de inóculo bacteriano que previamente creció en caldo nutritivo a 0.3 de absorbancia. Esto asegura que el inóculo se encuentre en la fase exponencial del crecimiento microbiano, lo cual permite una densidad microbiana de 1x10⁶ UFC/mL a 1x10⁷ UFC/mL. De este modo, la fase lag será más corta, lo que permitió alcanzar la fase estacionaria en menor tiempo. La fase estacionaria de la cepa CC1 se alcanzó a

las 72 h, durando hasta las 120 h, de acuerdo a los parámetros del experimento. El promedio de la densidad óptica máxima fue de 1.9.

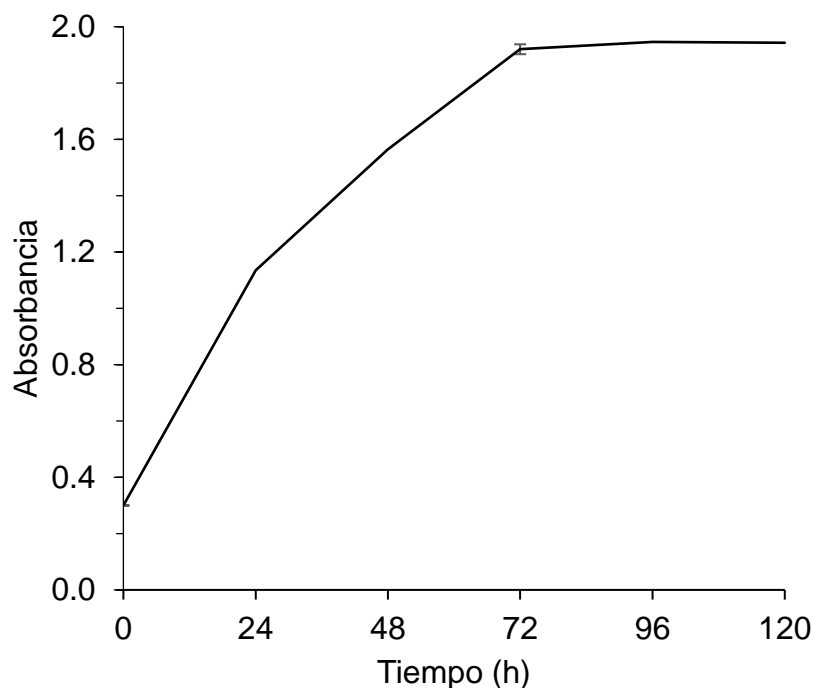


Fig. 1. Cinética de crecimiento de *Acinetobacter baumannii* (CC1) en medio de Kim.

Fig. 1. Growth kinetics of *Acinetobacter baumannii* (CC1) in Kim's medium.

3.2 Perfil del potencial de producción de biosurfactantes (métodos indirectos)

La actividad, rendimiento y composición de un biosurfactante depende de la composición y las condiciones de cultivo. Por otro lado, la velocidad de crecimiento del microorganismo es también importante para determinar el tiempo indicado para la extracción (Montoya-Vallejo *et al.*, 2021). Para determinarlo se tiene que recurrir a una batería de ensayos específicos: prueba de ensayo hemolítico, gota colapsada, dispersión de aceite e índice de emulsificación. La prueba de ensayo hemolítico resultó positiva al formarse una zona blanco-amarillenta alrededor de la estría en la placa de Petri. En la tabla 1 se indican los resultados de las mediciones para determinar el tiempo de producción máxima de biosurfactante. También se determinó el índice de emulsificación a las 24 h, el cual resultó ser mayor de 90 %, pero con una clara tendencia hacia las 72 y 96 h.

Tabla 1. Ensayos para estimar el tiempo de producción máxima de biosurfactante producido por *Acinetobacter baumannii* (CC1) en medio de Kim, a diferentes tiempos de cultivo.

Table 1. Tests to estimate the maximum production time of biosurfactant produced by *Acinetobacter baumannii* (CC1) in Kim's medium, at different culture times.

Tiempo (h)	Gota colapsada (tamaño de gota, cm)	Dispersión de aceite (zona de aclaramiento, cm)	Índice de emulsión (IE ₂₄ , %)
0	1.97 ± 0.01	0.97 ± 0.03	0 ± 0
24	3.58 ± 0.02	5.98 ± 0.01	94 ± 4.6
48	4.18 ± 0.01	6.39 ± 0.03	94 ± 3.5
72	4.54 ± 0.02	12.04 ± 0.04	96 ± 3.5
96	4.04 ± 0.03	10.05 ± 0.04	96 ± 4.5
120	4.28 ± 0.02	6.40 ± 0.20	92 ± 6

3.3 Propiedades fisicoquímicas del biosurfactante

3.3.1 Identificación de lípidos polares y FT-IR

La identificación de lipopéptidos en el caldo de cultivo se realizó mediante pruebas de cromatografía de capa fina. El resultado del Rf fue de 0.511, la presencia de lipopéptidos se corroboró por análisis de infrarrojo. Las figuras 2a y 2b muestran los resultados de ambas pruebas.

En el espectro de FTIR se distingue una fuerte banda alrededor de 3281 cm⁻¹ atribuida al estiramiento N-H (tensión del enlace N-H) y es una característica típica de los compuestos que contienen carbono con grupos amino (Ohadi *et al.*, 2018; Nayak *et al.*, 2020). Las bandas de menor intensidad del entre 2964 cm⁻¹ y 2925 cm⁻¹ corresponden a vibraciones del grupo -C-H (tensión asimétrica de los enlaces -CH₃, -CH₂) y confirmaron la presencia de cadenas alifáticas en la estructura del biosurfactante (Bao *et al.*, 2014; Ohadi *et al.*, 2018; Ashitha *et al.*, 2020; Nayak *et al.*, 2020; Aiman *et al.*, 2021). Las fuertes bandas de absorción en 1627 cm⁻¹ (tensión del enlace C=O) y a 1530 cm⁻¹ (flexión del enlace N-H) confirman la presencia de grupos peptídicos, debido a que corresponden a vibraciones de amida I y amida II en péptidos, respectivamente (Ohadi *et al.*, 2018; Bao *et al.*, 2014). La banda alrededor de 1441 cm⁻¹ está relacionada con la presencia de cadenas alifáticas del grupo C-H (flexión del enlace CH₃) (Parthipan *et al.*, 2017; Nayak *et al.*, 2020). La banda en 1228 cm⁻¹ corresponde a la vibración del enlace C-O de los ésteres (Parthipan *et al.*, 2017). La banda de absorción que se encuentra a 1047 cm⁻¹ es característica del resto polisacárido (Nayak *et al.*, 2020). A partir de estos resultados, se puede decir que la naturaleza química del biosurfactante es de tipo lipopéptido.

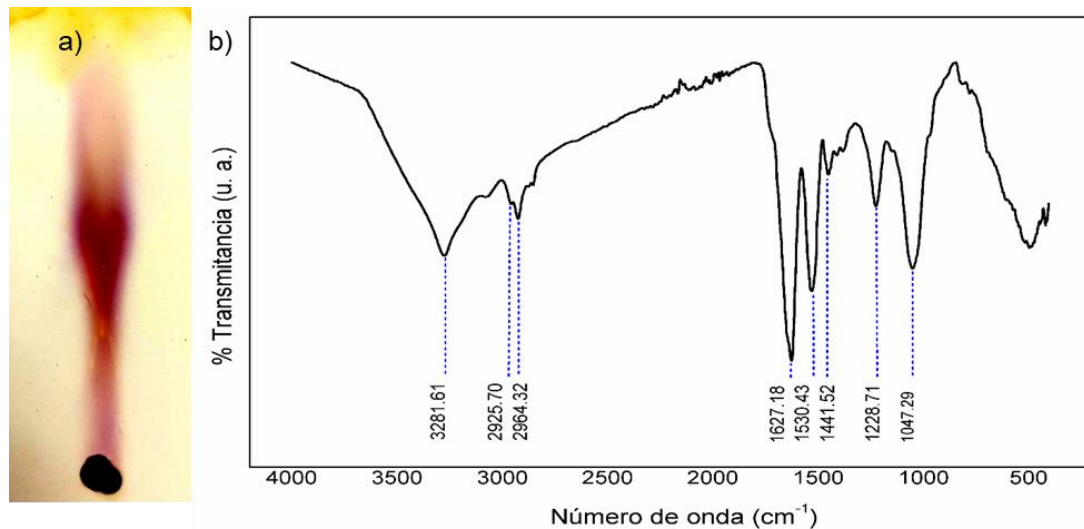


Fig. 2. Identificación de lípidos polares. a) Por capa fina, el resultado fue positivo para lipopéptidos. b) Grupos funcionales por FT-IR del biosurfactante producido por la cepa *A. baumannii* (CC1).

Fig. 2. Polar lipid identification. a) Thin layer chromatography was positive for lipopeptides. b) FT-IR functional groups of the biosurfactant produced by the *A. baumannii* strain (CC1).

3.3.2 Índice de refracción, pH, densidad y peso molecular promedio

El índice de refracción del biosurfactante puro fue de 1.349 a una temperatura de 27 °C. El pH del biosurfactante producido por la cepa bacteriana CC1 fue de 6.5, mientras que su densidad fue de 0.925 g/cm³. Ojeda *et al.* (2016) reportaron un pH entre 6.0 y 6.5, adicionalmente, Ohadi *et al.* (2017) encontraron un pH entre 5 y 8.5 para el crecimiento óptimo, lo cual maximiza la producción del biosurfactante. Su peso molecular se determinó mediante el índice de saponificación, que tuvo un valor de 173 mg/L, y se obtuvo un peso molecular promedio de 972.8 g/mol, que corresponde a un peso molecular bajo (<1500 g/mol). Los biosurfactantes de bajo peso molecular, como los lipopéptidos, se consideran buenos reductores de la tensión superficial del agua (Citarasu *et al.*, 2021).

3.4 Determinación de la capacidad emulsionante y estabilidad del biosurfactante

La capacidad emulsionante disminuyó conforme aumentó la concentración de NaCl. Para 1 % de NaCl la capacidad emulsionante fue del 90 %, para el 3 % de NaCl la capacidad emulsionante fue del 70 %. La variación de la estabilidad de la emulsión está determinada por la concentración de NaCl (Ojeda-Morales *et al.*, 2016). La capacidad emulsionante fue de 60 % y la estabilidad de la emulsión fue de 65 minutos.

3.5 Identificación de la cepa bacteriana: pruebas bioquímicas API 20 E, tinción de Gram y tamaño de la célula

Para el estudio taxonómico de la cepa bacteriana se utilizó el análisis fenotípico del sistema API 20E (Logan & Berkeley, 1984) como se muestra en la figura 3.



Fig. 3. Identificación por pruebas bioquímicas API E20 de la cepa bacteriana CC1.

Fig. 3. Identification by API E20 biochemical tests of the bacterial strain CC1.

La galería API 20E constó de 20 microtubos que contenían los sustratos deshidratados de las pruebas bioquímicas tradicionales. Los resultados positivos fueron: utilización del citrato (+) acetoína (+), fermentación de la glucosa (+), oxidación de melobiosa (+) y L-arabinosa (+). Estos datos fueron procesados en el software VCGD para la identificación del microorganismo, de ello se obtuvo que con un 92.8 % de posibilidad se trata de *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*. De acuerdo con la tinción de Gram es una bacteria Gram negativa, lo que coincidió con lo reportado por Ohadi *et al.* (2017). Las micrografías electrónicas revelaron que la cepa tiene forma de bacilo con un tamaño promedio de $1.2 \pm 1 \mu\text{m}$, lo cual concuerda con lo reportado por Salazar de Vegasa & Nieves (2005) y por Almasaudi (2018). Además, el crecimiento de cepa en un rango de temperatura de 40-50 °C fue positivo en un biorreactor con medio Kim y OD600 nm = 0.3, el ensayo arrojó un crecimiento ($t_{1h,40^\circ\text{C}}-t_{72h,40^\circ\text{C}}$, UFC/mL) de $1.23 \times 10^6-1.87 \times 10^8$, ($t_{1h,45^\circ\text{C}}-t_{72h,45^\circ\text{C}}$, UFC/mL) de $1.75 \times 10^6-1.1 \times 10^8$ y ($t_{1h,50^\circ\text{C}}-t_{72h,50^\circ\text{C}}$, UFC/mL) $1.32 \times 10^5-1.87 \times 10^6$, y de acuerdo Nemec *et al.* (2011) *A. baumannii* es la única

Acetobacter que crece en este intervalo de temperatura. Con base a lo anterior, se confirma la capacidad de la bacteria de fermentar el carbono de los carbohidratos presentes en el citrato, la acetoína y azúcares, como fuentes principales de energía (Madigan *et al.*, 2017). La importancia de realizar las pruebas de API 20 E, fue el estudio de la actividad metabólica del género de la Acinetobacter.

3.6 Toxicidad y concentración letal media del biosurfactante

El impacto del biosurfactante sobre la lombriz roja californiana *E. foetida* se estableció en el laboratorio. Cuando las lombrices se expusieron a concentraciones del biosurfactante entre 10000 y 70000 ppm, el peso de los especímenes se mantuvo prácticamente constante, pero entre 70000 y 80000 ppm se registró una caída acelerada del peso de las lombrices (figura 4). Se realizó el análisis Probit para evaluar la probabilidad de pérdida de peso de acuerdo a la concentración del biotensioactivo (χ^2 ; $\alpha > 0.05$) y se encontró que en el bioensayo establecido no existe probabilidad de pérdida de peso en el intervalo de 10000 a 40000 ppm.

En cuanto al valor de la concentración letal media (CL_{50}), éste fue calculado con una confiabilidad del 95 %, equivalente a 89702 ppm de biosurfactante. La estimación de este valor, proporcionó datos de la función de probabilidad ($r^2=0.99$) y una determinada

carga de exposición. En la figura 5 se muestra la correlación entre la variable independiente (concentración de biosurfactante) y la variable dependiente (mortalidad de la población de *E. foetida*).

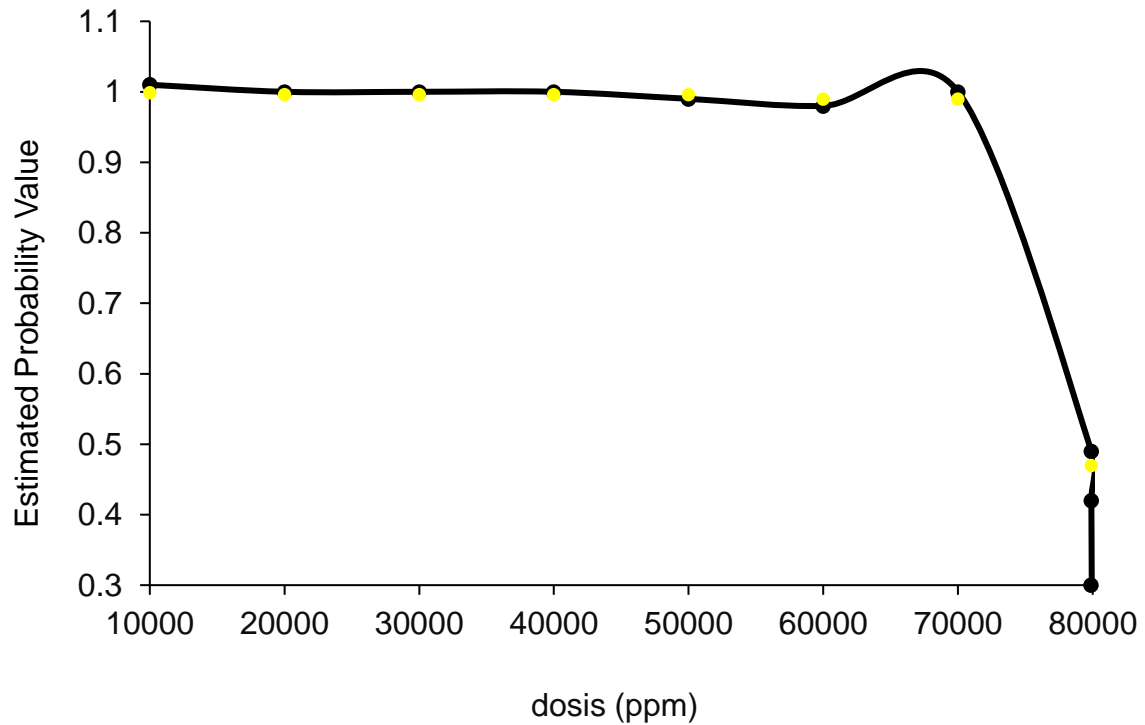


Fig. 4. Estimación de pérdida de peso de *E. foetida* como una función de la concentración del biosurfactante producido por *A. baumannii* CC1. (●) Probabilidad estimada y (●) probabilidad observada.

Fig. 4. Estimated weight loss of *E. foetida* as a function of concentration of the biosurfactant produced by *A. baumannii* CC1. (●) Estimated probability and (●) observed probability.

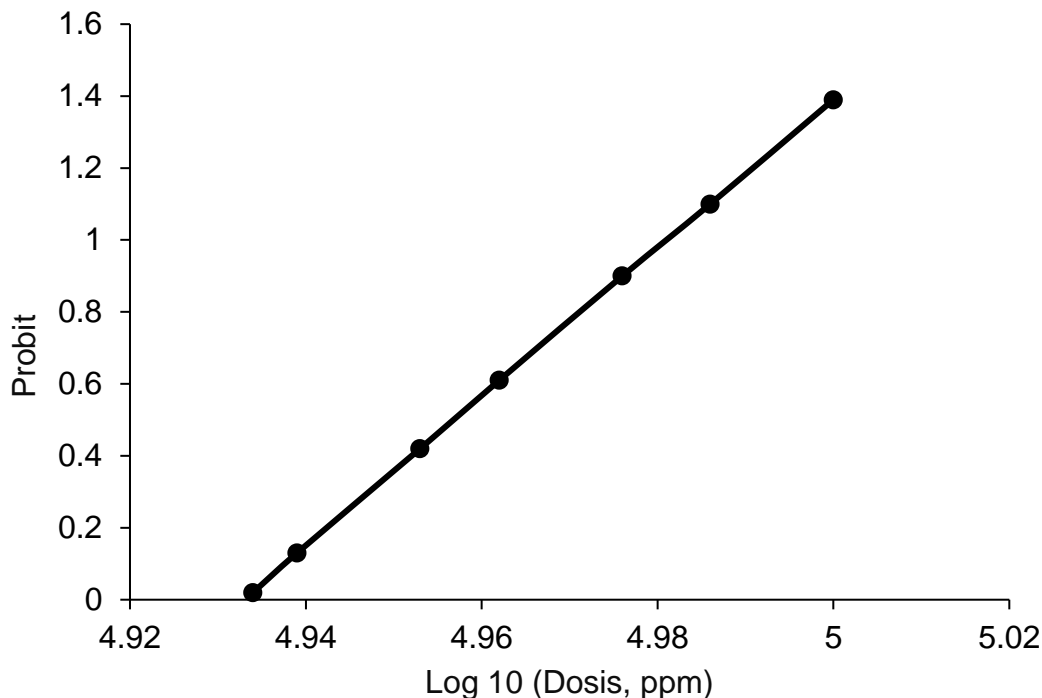


Fig. 5. Concentración letal media (CL₅₀) del biosurfactante producido por *A. baumannii* CC1 mediante análisis Probit en *E. foetida*. Ecuación de predicción $y=20.276x-100.02$, $r^2=0.9999$.

Fig. 5. Median lethal concentration (LC₅₀) of the biosurfactant produce by *A. baumannii* CC1 by Probit analysis on *E. foetida*. Prediction equation $y=20.276x-100.02$, $r^2=0.9999$.

Las lombrices de tierra son importantes en el microambiente suelo, son adaptables y resistentes. Su actividad mejora la aireación del suelo y mejora el transporte y distribución de los microorganismos, potenciando el contacto entre estos y sustratos como los hidrocarburos, eliminando los contaminantes (Lin *et al.*, 2018). Mulligan *et al.* (2021) describieron el efecto de biosurfactantes ramnolípidos y lipopéptidos en el crecimiento de la lombriz de tierra con el fin de degradar metales pesado e hidrocarburos, sin embargo, la determinación de la dosis letal media es importante porque los biosurfactantes en la actualidad son caros e producir (Mohanty *et al.*, 2021) por lo que el uso excesivo generará pérdidas económicas y efectos tóxicos sobre la lombriz roja. De acuerdo con Varjania y Gnansounou (2017) la producción de biosurfactantes depende del tipo de aceite y del microorganismo que lo use como fuente de carbono, por lo que la determinación de la toxicidad del biosurfactante debe ser considerada y calculada de acuerdo a las condiciones experimentales que se tengan.

3.7 Tensión superficial y concentración micelar crítica

La medición de la tensión superficial permite visualizar aplicaciones potenciales de los biosurfactantes. El biosurfactante sintetizado por la cepa *A. baumannii* resultó efectivo para disminuir la tensión superficial del agua grado HPLC desde 72 mN/m hasta 40 mN/m. La figura 6 muestra la reducción de la tensión superficial de la cepa *A. baumannii* (CC1). Por otro lado, la Concentración Micelar Crítica (CMC) del biosurfactante producido por *A. baumannii* fue de 0.0518 mM.

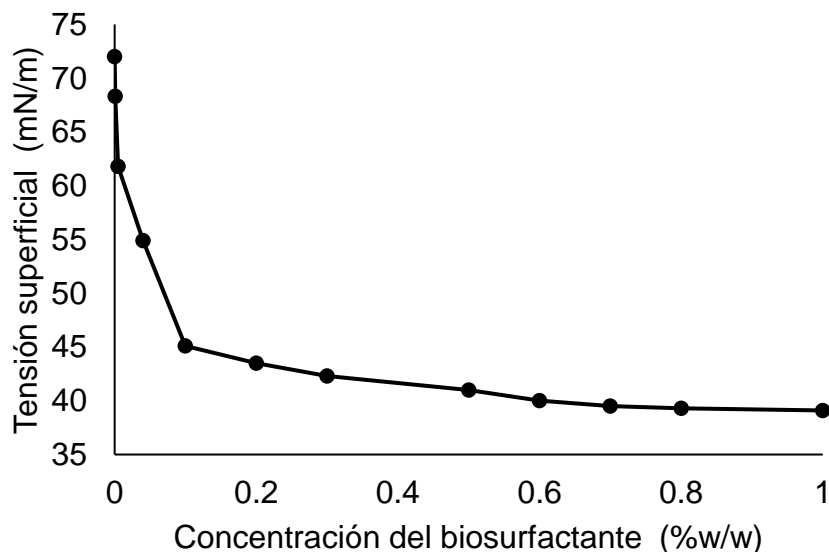


Fig. 6. Efecto de la concentración del biosurfactante sintetizado por *A. baumannii* (CC1) sobre la tensión superficial del agua, en mN/m.

Fig. 6. Effect of the concentration of the biosurfactant synthesized by *A. baumannii* (CC1) on the surface tension of water, in mN/m.

4. DISCUSIÓN

Los microorganismos del suelo son de gran importancia. Intervienen en la fertilidad del suelo, modifican características químicas como pH, conductividad, salinidad, lo mismo que en el ciclo de nutrientes. Las bacterias fijadoras de nitrógeno juegan un rol importante en el crecimiento de las plantas, así como en diferentes actividades metabólicas. Fijan el nitrógeno atmosférico en formas asimilables como el NH_3 y NH_4 . Cuando son de vida libre son consideradas no simbióticas, y cuando co-existen en asociación con fabáceas y otras plantas vasculares de diferente familia se les conocen como simbióticas; a este último grupo pertenece la cepa CC1, la cual fue aislada de la rizósfera de plantaciones de *T. cacao*. Esta clase de microorganismos han sido ampliamente reportados, incluyendo los géneros *Frankia*, *Rhizobium*, *Cyanobacteria*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Acetobacter* y *Nostoc* (Girigiri *et al.*, 2020; Umar *et al.*, 2020; Saeed *et al.*, 2021).

Por otro lado, el fósforo es el segundo nutriente de mayor importancia en el metabolismo bacteriano, y solamente el 0.1 % del fósforo total está disponible en el medio ambiente para su asimilación. Cuando un suelo es alcalino, el fósforo es inmovilizado por cationes de Ca^{2+} y Mg^{2+} , el mismo efecto sucede con el Fe^{3+} y el Al^+ cuando el suelo es ácido (Alaylar *et al.*, 2020). Ciertas cepas bacterianas como

Rhizobium, *Pseudomonas* y *Bacillus* se consideran como solubilizadoras de fósforo, lo cual hacen por mineralización del fósforo orgánico; sin embargo, aproximadamente el 50 % de las bacterias conocidas son solubilizadoras de fósforo, entre las que destacan *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Serratia* y *Beijerinckia*. Estos microorganismos modifican el pH del ambiente produciendo un número variable de ácidos orgánicos e inorgánicos a través del mecanismo conocido como mineralización de la rizósfera (Kalayu, 2019; Younas *et al.*, 2021). La cepa *A. baumannii* fue capaz de fijar nitrógeno y solubilizar fósforo. Esta capacidad realza su importancia a nivel ecológico.

Las condiciones de crecimiento microbiano son especialmente importantes en cepas productoras de biosurfactantes debido a los costos de producción. Por ejemplo, Gutsohn, (2017) y Sari *et al.* (2019) estudiaron el crecimiento de *Bacillus subtilis* con diferentes fuentes de carbono, donde la glucosa generó el mejor rendimiento, 15 g/L y 420 mg de biosurfactante, en comparación con fuentes como el almidón, sacarosa y glicerol. Sin embargo, el uso de glucosa puede ser contraproducente desde el punto de vista económico, además de que es una fuente de carbono que no se encuentra en estado puro en la naturaleza, como la sacarosa, que puede encontrarse en otros sustratos como los residuos agroindustriales (Gutsohn, 2017; Sari *et al.*, 2019). Por otro lado, Heryani & Putra (2017) hicieron mención del uso de la sacarosa para optimizar la producción de surfactina con *Bacillus* sp.

La cepa *A. baumannii* también usó glucosa como fuente de carbono. De acuerdo con la composición del medio Kim, la cantidad de glucosa fue menor: 2 g/L; sin embargo, este medio contiene otras fuentes de carbono como el extracto de carne (0.2 g/L) y el extracto de levadura (5 g/L). Las fuentes de carbono y nitrógeno son esenciales para promover una máxima producción de biosurfactantes, y el efecto de la proporción entre ambos elementos modifica la producción de biosurfactantes, como ocurrió con *Bacillus subtilis* a una proporción de C:N entre 3 y 9. Pero también con una C:N de 11 y 12.3 los resultados han sido notables (Fonseca *et al.*, 2007; Abas *et al.*, 2013). Incluso con una C:N de 12 se obtuvieron rendimientos de 0.72 g/L empleando 30 g/L de glucosa en *Bacillus pumilus* 21R (Heryani & Putra, 2017).

La fuente de N más usada es el nitrato de amonio (NH_4NO_3) y es de origen inorgánico, pero el medio Kim ocupa fuentes orgánicas de nitrógeno. El extracto de levadura ha sido reportado como uno de los sustratos más recomendados para estimular la extracción de biosurfactantes; cada 100 g de extracto de levadura tiene 35.17 g de carbono y 25.69 g de nitrógeno, y otros elementos (% masa): O (30.7), P (1.81), S (0.89) y K (6.669) (Martínez-Trujillo *et al.*, 2015). En tanto el extracto de carne tiene 37.48 g de carbono y 25.01 g de nitrógeno por cada 100 g, y una proporción adicional de (% masa): O (31.1), Na (2.1), P (0.77), S (0.62), Cl (1.28) y K (2.44). Además, otros oligoelementos presentes en el medio Kim estimulan el crecimiento de los microorganismos. La peptona caseína (que forma parte del medio caldo nutritivo) es una fuente alternativa de aminoácidos como el triptófano mientras que el extracto de levadura contiene azúcares y aminoácidos como ácido glutámico y vitamina B (biotina). Y en lo que respecta al extracto de carne, éste es especialmente rico en vitamina B (Cheng *et al.*, 2018). Esta composición le permite al medio Kim tener una relación C:N = 2.1, lo cual lo capacita para ser un medio apto para la producción de biosurfactantes. Los biosurfactantes son biodegradables y de toxicidad baja (Safdel *et al.*, 2017; Varjani, 2017). Por lo tanto, es importante estimar el tiempo promedio donde la producción del

biosurfactante es más alta, debido al costo de los materiales empleados en su síntesis y purificación (Jahan *et al.*, 2020).

El resultado positivo de la prueba de hemólisis indicó una β -hemólisis. No obstante, esta prueba no es concluyente, porque otras sustancias como bioácidos y enzimas proteolíticas pueden provocar lisis celular y dar un falso positivo. El ensayo hemolítico sugiere la probable presencia de sustancias surfactantes (Joy *et al.*, 2017; Datta *et al.*, 2018).

Otra prueba que apoya la hemólisis es la de la gota colapsada. Este método se basó en la pérdida de la tensión superficial del agua que colapsa sobre una superficie hidrofóbica como el parafilm, se consideró una prueba confiable (Ray *et al.*, 2021) y el tamaño de la gota es función de la actividad del biosurfactante. En este experimento, la cepa CC1 mostró un diámetro de gota mayor hacia las 72 h de cultivo. Esta prueba se complementó con la de dispersión de aceite, que tiene el mismo principio que la gota colapsada (Ray *et al.*, 2021; Montoya Vallejo *et al.*, 2021). La tensión interfacial entre el caldo crudo libre de células y la película de petróleo se rompe por la presencia de sustancias surfactantes. La zona de aclaramiento ocurrió entre las 72 y 96 h, cuyo diámetro fue mayor a los 5 mm.

Los biosurfactantes son sintetizados por una amplia diversidad de organismos. Tienen estructuras únicas, así como una funcionalidad especializada, lo que significa que se producen cuando se tienen necesidades metabólicas altamente específicas. Koim-Puchowska *et al.* (2021) realizaron un estudio donde comprobaron que el uso de glucosa es muy eficiente en el rendimiento de biosurfactantes. El medio Kim también usa glucosa, enriquecido con otras fuentes de carbono como extracto de levadura y de carne. El hecho de que un microorganismo prefiera una u otra fuente de nutrientes depende de su necesidad por alguna vitamina o aminoácido específico. Y aunque estos investigadores encontraron que el extracto de carne no influye mucho en una cepa de *Bacillus subtilis natto* BS19, los requerimientos suelen variar. En un estudio sobre producción de surfactina, *Bacillus subtilis* prefirió dos fuentes distintas de nitrógeno: NH_4NO_3 y triptona. Esto puede deberse a los requerimientos de la cepa en el momento de su asimilación (Das & Mukherjee, 2007).

La extracción del biosurfactante suele ser un proceso de alto costo por los materiales que emplea. El proceso de extracción por solvente se basa en mezclar, transferir y separar dos fases inmiscibles y de diferente densidad. La precipitación con acetona se fundamenta en el cambio de polaridad. Son utilizados como agentes precipitantes mezclas de solventes orgánicos o los compuestos independientes, en los cuales el biosurfactante es poco soluble o no soluble. Sin embargo, requiere un elevado tiempo de permanencia debido a que la separación es lenta, generando un aumento de existencia, lo que implica un aumento de costo (Almazán, 2000).

El metabolismo bacteriano es muy importante en la producción de un biosurfactante, de modo que los valores de rendimiento suelen ser variables. Por ejemplo, Durval *et al.* (2020) obtuvieron hasta 4.7 mg/L usando medio mineral salino a partir de una cepa de *Bacillus subtilis*. Sin embargo, un rendimiento menor se obtuvo con *Bacillus safensis* J2 en un medio mineral salino, pero adicionado con NH_4NO_3 y NaNO_3 , tan sólo se extrajo 0.92 mg/L (Das y Kumar, 2019). Con *Bacillus tequilensis* MK 729017 en medio Luria-Bertani, el rendimiento fue de 7.4 mg/L, lo que puede deberse a que este medio es altamente rico en extracto de levadura y peptona (Datta *et al.*, 2018). En esta investigación, con la cepa CC1 cultivada en medio Kim se obtuvo un rendimiento de

2.21 g/L. La optimización del rendimiento puede llevarse a cabo con otras fuentes de nutrientes de más bajo costo.

Pérez Vargas *et al.* (2010) y Pérez Vargas *et al.* (2017) reportaron la producción de ramnolípidos sintetizados por *Pseudomonas*. Algunos *Bacillus* y *Pseudomonas* tienen la capacidad de colonizar las raíces de plantas y protegerlas en contra de patógenos. Como consecuencia, estas bacterias pueden clasificarse como rizobacterias promotoras del crecimiento. Sus metabolitos causan este efecto de biocontrol y promueven el crecimiento de las plantas. Esos metabolitos secundarios han sido identificados como lipopéptidos cíclicos que tienen la capacidad de mostrar actividad surfactante (Bombeke, 2021).

Zhou *et al.* (2020) obtuvieron la producción de biosurfactantes a partir de la cepa *Acinetobacter junii*. El análisis de FT-IR y cromatografía en capa fina indican la presencia de un biosurfactante con base en lipopéptidos, coincidente con *Acinetobacter baumannii* CC1, quien también es productora de biosurfactantes lipopéptidos. Ohadi *et al.* (2018) identificaron también a *Acinetobacter* como productora de biosurfactante y degradadora de petróleo. Del mismo modo, también identificaron lipopéptidos a partir de *A. baumannii* con el objetivo de degradar diferentes fracciones de petróleo. El petróleo crudo contiene aproximadamente 35 % de *n*-alcanos, 35 % de hidrocarburos aromáticos y 30 % de alcanos ramificados, cuya ecotoxicidad es la principal amenaza al ambiente, por lo que resulta de importancia que existan microorganismos como *A. baumannii* (CC1) que son capaces de utilizar petróleo como fuente de energía. En este sentido Zhang *et al.* (2021) reportaron a *Acinetobacter baumannii* como cepa hidrocarbonoclasta y productora de biosurfactantes, siendo capaz de remover hasta el 70 % de las tres fracciones mencionadas.

La identificación de la especie, de acuerdo con los análisis API 20, corresponde con lo reportado por Gupta *et al.* (2020), que determinaron la producción de un biosurfactante glicolípido producido por *Acinetobacter baumannii* BJ5 con la capacidad de degradar hidrocarburos complejos como el pireno. En otra investigación, Constantiniu *et al.* (2004) identificaron *A. baumannii* y *A. lwoffii* siendo positiva a la formación de catalasa, fermentación de la glucosa y utilización de citratos, y ha sido identificada como un cocobacilo, lo cual coincide con los resultados de las micrografías electrónicas, catalasa positiva, fermentación de la glucosa y utilización de citratos también por Raut *et al.* (2020). Restrepo-Correa *et al.* (2017) reconocieron al género *Acinetobacter* como bacteria fijadora de nitrógeno y solubilizadora de fósforo, en especial a *Acinetobacter calcoaceticus*. Adicionalmente, Al-Hadithi *et al.* (2017) aislaron cepas de *Acinetobacter* (*lwoffii* y *calcoaceticus*) a partir de suelos contaminados con hidrocarburos, ambas cepas mostraron capacidad para producir surfactante y degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos. Estos microorganismos con capacidades metabólicas apropiadas son fundamentales en los procesos de biorremediación, respondiendo a la presencia de hidrocarburos contaminantes dentro de las primeras horas de contacto, exhibiendo tasas de degradación más altas que aquellos microorganismos que no tuvieron contacto previo con petróleo, utilizando las largas cadenas de hidrocarburos como fuentes de energía o degradándolas a través de procesos de co-metabolismo.

La probabilidad de pérdida de peso de las lombrices de tierra fue más pronunciada para concentraciones mayores. La probabilidad de que la población pierda peso a 80000 ppm es del 60 %. Los biotensioactivos pueden tener actividad antimicrobiana y es probable que los microorganismos produzcan moléculas tales como agentes

antagonistas para ganar ventaja con el sustrato en las comunidades microbianas, proceso conocido como amensalismo. El biosurfactante obtenido, además de tener actividad superficial podría tener aplicaciones farmacológicas como en la inhibición de la formación de fibrina, lisis de eritrocitos, antitrombóticos e hipocolesterolémico y propiedades antivirales. Los lipopéptidos pueden ser tóxicos cuando tienen la habilidad de solubilizar la bicapa lipídica de la membrana celular (Citarasu *et al.*, 2021).

Los biosurfactantes producidos por la especie *A. baumannii* producen emulsiones aceite en agua, por lo que se facilita la transferencia de petróleo desde la superficie del sistema hasta el seno del mismo. De esta manera, se incrementa la biodisponibilidad de la fuente de carbono, por lo que un proceso de biorremediación puede requerir menor tiempo. La determinación de la formación de micelas en el seno de una solución en donde el disolvente es de origen polar, es una propiedad importante que puede determinar la concentración mínima requerida de un surfactante, lo que puede ayudar a minimizar costos y tiempo en la realización de un proceso biotecnológico. Los lipopéptidos al ser compuestos anfifílicos y tener una doble afinidad, tienen la capacidad de producir micelas, lo que incrementa la solubilidad de compuestos hidrófobos. La importancia de la determinación de la CMC radica en no utilizar una concentración del biosurfactante más alta que la necesaria, esto a su vez permite que la microflora y microfauna no se vean afectadas negativamente debido a las características antimicrobianas que presentan los biotensioactivos (Ojeda-Morales *et al.*, 2016). La CMC representa un intervalo de concentraciones, ya que no es un valor absoluto debido a que en realidad es una fase de transición que ocurre gradualmente.

A modo de conclusiones, los biosurfactantes son moléculas anfifílicas producidos por bacterias como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Nitrobacter*, entre otros microorganismos. La cepa bacteriana CC1 es una bacteria petrofilica, productora de biosurfactante, gram negativa, fijadora de nitrógeno y solubilizadora de fósforo. De acuerdo a las pruebas de cromatografía en capa fina y FT-IR es productora de un biosurfactante lipopéptido. Con base en los resultados obtenidos en el análisis de toxicidad se observó que *E. foetida* presentó una pérdida de peso a partir de 50000 ppm de concentración del biosurfactante. Se requieren más estudios sobre bacterias nitrificantes productoras de biosurfactantes dada su importancia en la fertilidad del suelo y como parte de reciclaje de nutrientes del mismo.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Abas M. R., Kader A. J. A., Khalil M. S., Hamid A. A. & Mohd M. H. 2013. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 by using treated palm oil mill effluent (pome) as fermentation media. *In* International Conference on Food and Agricultural Sciences. 55: 87-93. October 2013, Singapore. <https://doi.org/10.7763/IPCBEE.2013.V55.17>.

Aiman U., Aneeqa Z., Hasina W., Meh P. S., Muneer A. Q., Afshan H. N., Zulfiqar A. M. & Safia A. 2021. Low-cost production and application of lipopeptide for bioremediation and plant growth by *Bacillus subtilis* SNW3. *AMB Express*. 11: 165. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01327-0>.

Ajona M. & Vasanthi P. 2021. Bioremediation of petroleum contaminated soils – A review. *Materials Today: Proceedings*. 45(7): 7117-7122. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.01.949>.

Alaylar, B., Egamberdieva D., Gulluce M., Karadayi M. & Arora N. K. 2020. Integration of molecular tools in microbial phosphate solubilization research *in* agriculture perspective. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 36: 93. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02870-x>.

Al-Hadithi, H. T., Al-Razzaq E. A. & Fadhil G. F. 2017. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Acinetobacter* species isolated from ecological sources. *Journal of Environmental Biology*. 38(5): 785-789. <https://doi.org/10.22438/jeb/38/5/MRN-422>.

Almasaudi S. B. 2018. *Acinetobacter spp* as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 25(3): 586-596. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.009>.

Almazán V., González J. M., Pérez J. J., Dieguez F., Villaverde M. J., Pérez G., Joseph N., & Gan R. 2000. Purificación e identificación de la naturaleza química de un tensioactivo producido por *Pseudomonas aeruginosa* cepa Ido-330. *Revista Biología*. 14(2): 172-177.

Aquiahuatl-Ramos M. A. & Pérez-Chabela M. L. 2004. Manual de prácticas de laboratorio de microbiología general. Universidad Autónoma Metropolitana. Departamento de biotecnología. México. 116 pág.

Ashitha A., Radhakrishnan E. K., Jyothis M. 2020. Characterization of biosurfactant produced by the endophyte *Burkholderia sp.* WYAT7 and evaluation of its antibacterial and antibiofilm potentials. *Journal of Biotechnology*. 313: 1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.03.005>.

Avendaño-Arrazate C. H. 2021. Seminario: El cacao, historia y relevancia para América Latina y el Caribe. La producción del cacao en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). México.

Bao M., Pi Y., Wang L., Sun P., Li Y. & Cao L. 2014. Lipopeptide biosurfactant production bacteria *Acinetobacter sp.* D3-2 and its biodegradation of crude oil. *Environmental Science: Processes & Impacts*. 16(4): 897–903. <http://dx.doi.org/10.1039/c3em00600j>.

Bhosale H. & Khode S. 2021. Bioremediation potential of nitrogen fixing bacteria. *In: Frontiers in life science*, volume III (Rana B., Dharkar N. S., Zodpe S. N. & Nikalje G. C., ed). Bhumi publishing. India.

Bombeke, R. 2021. The role of cyclic lipopeptides in biological control and nitrogen fixation in bean. Faculty of Bioscience engineering, Ghent University.

Carolin C. F., Kumar P. S., Joshiba G. J., Madhesh P. & Ramamurthy R. 2021. Sustainable strategy for the enhancement of hazardous aromatic amine degradation using lipopeptide biosurfactant isolated from *Brevibacterium casei*. *Journal of Hazardous Materials*. 408: 124943. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124943>.

Cassidy D. P. & Hudak A. J. 2001. Microorganism selection and biosurfactant production in a continuously and periodically operated bioslurry reactor. *Journal of Hazardous Materials*. B84: 253-264. [https://doi.org/10.1016/s0304-3894\(01\)00242-4](https://doi.org/10.1016/s0304-3894(01)00242-4).

Cheng Y. H., Zhang N., Han J. C., Chang C. W., Hsiao F. S. H., & Yu Y. H. 2018. Optimization of surfactin production from *Bacillus subtilis* in fermentation and its effects on *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis and growth performance in broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 102(5): 1232–1244. <https://doi.org/10.1111/jpn.12937>.

Citarasu T., Thirumalaikumar E., Abinaya P., Babu M. M. & Uma G. 2021. Biosurfactants from halophilic origin and their potential applications. *In: Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science. Microbially-Derived Biosurfactants for Improving Sustainability in Industry*, (Inamuddin Adetunji C. O., Asiri A. M., eds). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823380-1.00019-8>.

Constantiniu S., Romaniuc A., Iancu L. S., Filimon R. & Tarași I. 2004. Cultural and biochemical characteristics of *Acinetobacter* spp, strains isolated from hospital units. *The Journal of Preventive Medicine*. 12(3-4): 35-42.

Córdova-Bautista Y., Ramírez-Morales E., Ojeda-Morales Marcia E., Martínez-Pereyra, G. (2020). Electricity production and bioremediation from synthetic sugar industry wastewater by using microbial isolate in microbial fuel cell. *Sugar Tech*. (20). 820-829. <https://doi.org/10.1007/s12355-020-00830-1>.

Das A. J. & Kumar R. 2019. Production of biosurfactant from agro-industrial waste by *Bacillus safensis* J2 and exploring its oil recovery efficiency and role in restoration of diesel contaminated soil. *Environmental Technology & Innovation*. 16: 100450. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100450>.

Das K. & Mukherjee A. K. 2007. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochemistry*. 2(8), 1191–1199. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.05.011>.

Datta P., Tiwari P. & Pandey L. M. 2018. Isolation and characterization of biosurfactant producing and oil degrading *Bacillus subtilis* MG495086 from formation water of Assam oil reservoir and its suitability for enhanced oil recovery. *Bioresource Technology*. 270: 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.047>.

Dlamini B., Rangarajan V. & Clarke K. G. 2020. A simple thin layer chromatography based method for the quantitative analysis of biosurfactant surfactin vis-a-vis the presence of lipid and protein impurities in the processing liquid. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 25: 101587. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101587>.

Durval I. J. B., Mendonça A. H. R., Rocha I. V., Luna J. M., Rufino R. D., Converti A. & Sarubbo L. A. 2020. Production, characterization, evaluation and toxicity assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 biosurfactant for marine oil spills bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*. 157: 111357. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111357>.

Fan G., Xu J., Li M., Wei T. & Nassabeh S. M. M. 2020. Implications of hot chemical–thermal enhanced oil recovery technique after water flooding in shale reservoirs. *Energy Reports*. 6: 3088–3093. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2020.11.015>.

Fitriyanti D., Mubarik N. R. & Tjahjoleksono A. 2017. Characterization and identification of phosphate solubilizing bacteria isolate GPC3.7 from limestone mining region. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 58:012016. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/58/1/012016>.

Fonseca R. R., Silva A. J. R., De França F. P., Cardoso V. L. & Sérvulo E. F. C. 2007. Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 137-140:471-486. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-9073-z>.

Girigiri B., Ariole C. N. & Stanley H. O. 2020. Bioremediation of crude oil polluted soil using biofertilizer from nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria. *Journal of American Science*. 16(7): 71-88. <https://doi.org/10.7537/marsjas160720.10>.

Gupta B., Puri S., Thakur I. S. & Kaur J. 2020. Enhanced pyrene degradation by a biosurfactant producing *Acinetobacter baumannii* BJ5: growth kinetics, toxicity and substrate inhibition studies. *Environmental Technology & Innovation*. 19: 100804. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100804>.

Gutsohn A. 2017. Optimization of biosurfactants production by *Bacillus subtilis* B37 isolated from palm oil-contaminated soil. Thesis. University of Natural Resources and Life Sciences Vienna. Austria. 44 p.

Hamilton R. J. & Hamilton S. 1992. *Lipid analysis: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford. New York.

Hamza U. D., Mohammed I. A. & Sale A. 2012. Potentials of bacterial isolates in bioremediation of petroleum refinery wastewater. *Journal of Applied Phytotechnology in Environmental Sanitation*. 1(3): 131-138.

Hentati D., Chebbi A., Mahmoudi A., Hadrich F., Cheffi M., Frikha I., Sayadi S. & Chamkha M. 2021. Biodegradation of hydrocarbons and biosurfactants production by a newly halotolerant *Pseudomonas sp.* strain isolated from contaminated seawater. *Biochemical Engineering Journal*. 166: 107861. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107861>.

Hernández-Rivera M. A., Ojeda-Morales M. E., Martínez-Vázquez J. G., Villegas-Cornelio V. M. & Córdova-Bautista Y. 2011. Optimal parameters for *in vitro* development of the hydrocarbonoclastic microorganism *Proteus sp.* *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 11: 29-43. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162011000100003>.

Heryani H. & Putra M. D. 2017. Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus sp.* *Electronic Journal of Biotechnology*. 27: 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.03.005>.

Hoang S. A., Sarkar B., Seshadri B., Lamb D., Wijesekara H., Vithanage M., Liyanage C., Kolivabandara P. A., Rinklebe J., Lam S. S., Vinu A., Wang H., Kirkham M. B. & Bolan N. S. 2021. Mitigation of petroleum-hydrocarbon-contaminated hazardous soils using organic amendments: a review. *Journal of Hazardous Materials*. 416:125702. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125702>.

ICCO. International Cocoa Organization. 2020. <https://www.icco.org>, Abiyán, Costa de Marfil, (consultado marzo 19, 2022).

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*. 275:102061. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>.

Joy S., Rahman P. K. S. M. & Sharma S. 2017. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Chemical Engineering Journal*. 317: 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.054>.

Kalayu G. 2019. Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*. 2019: 4917256. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>.

Koim-Puchowska B., Kłosowski G., Drózdź-Afelt J. M., Mikulski D. & Zielińska A. 2021. Influence of the medium composition and the culture conditions on surfactin biosynthesis by a native *Bacillus subtilis* natto BS19 strain. *Molecules*. 26: 2985. <https://doi.org/10.3390/molecules26102985>.

Koutinas M., Kyriakou M., Andreou K., Hadjicharalambous M., Kaliviotis E., Pasiadis D., Kazamias G., Varavvas C. & Vyrides I. 2021. Enhanced biodegradation and valorization of drilling wastewater via simultaneous production of biosurfactants and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas citronellolis* SJTE-3. *Bioresource Technology*. 340: 125679. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125679>.

Kumar A., Kumar Singh S., Kant C., Verma H., Kumar D., Pratap Singh P., Modi A., Drobny S., Singh Kesawat M., Alavilli H., Kant Bhatia S., Dattatraya Saratale G., Ganesh Saratale R., Chung S. & Kumar M. 2021. Microbial Biosurfactant: A new frontier for sustainable agriculture and pharmaceutical industries. *Antioxidants*. 10: 1472. <https://doi.org/10.3390/antiox10091472>.

Lin, Z., Z. Zhen, L. Ren, J. Yang, C. Luo, L. Zhong, H. Hu, Y. Zhang, Y. Li and D. Zhang. 2018. Effects of two ecological earthworm species on atrazine degradation performance and bacterial community structure in red soil. *Chemosphere*.

Logan N. A. & Berkeley R. C. W. 1984. Identification of *Bacillus* strains using the API system. *Journal of general microbiology*. 130: 1871-1882. <https://doi.org/10.1099/00221287-130-7-1871>.

Lopes C.S.C., Teixeira D. B., Braz B. F., Santelli R. E., de Castilho L. V. A., Gomez J. G. C., Castro R. P. V., Seldin L. & Freire D. M. G. 2021. Application of rhamnolipid surfactant for remediation of toxic metals of long and short-term contaminated sites. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 18: 575–588. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-02889-5>.

Madigan M., Martinko J., Dunlap P., & Clark D. 2017. *Biología de los microorganismos*. Pearson Education. Madrid, España.

Marques Alvarez V., Reis Guimarães C., Jurelevicius D., Vieira Araujo de Castilho L., Sampaio de Sousa J., Faria da Mota F., Guimarães Freire D. M. & Seldin L. 2020. Microbial enhanced oil recovery potential of surfactin-producing *Bacillus subtilis* AB2.0. *Fuel*. 272: 117730. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117730>.

Martínez-Trujillo M. A., Membrillo Venegas I., Viguera-Carmona S. E., Zafra-Jiménez G. & García-Rivero M. 2015. Optimization of a bacterial biosurfactant production. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 14(2): 355-362.

Mohanty, S. S., Y. Koul, S. Varjani, A. Pandey, H. H. Ngo, J.-S. Chang, J. W. C. Wong and X.-T. Bui. 2021. A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production. *Microbial Cell Factories*. 20(120):1-13.

Montoya Vallejo C., Flórez Restrepo M. A., Guzmán Duque F. L. & Quintero Díaz J. C. 2021. Production, characterization and kinetic model of biosurfactant produced by lactic acid bacteria. *Electronic Journal of Biotechnology*. 53: 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.06.001>.

Morales-Bautista C. M., Lobato-García C. E., Flores-Jiménez J. & Mendez-Olán C. 2019. Changes in the physical and chemical properties of a soil due to a restoration process applied to a spill of hydrocarbon. *Acta Universitaria*. 29: E2154. <https://doi.org/10.15174/au.2019.2154>.

Morales-Guzmán G., Alarcón A., Ferrera-Cerrato R., Rivera-Cruz M. C., Torres-Bustillos L. G. & Mendoza-López M. R. 2020. Efecto de bacterias emulsificantes en la atenuación de la fitotoxicidad de suelos contaminados con petróleo intemperizado. *Revista de Biología Tropical*. 68(2): 692-703. <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v68i2.39327>.

Mulligan C. N. 2021. Sustainable remediation of contaminated soil using biosurfactants. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 9: 635196. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.635196>.

Nayak N. S., Purohit M. S., Tipre D. R. & Dave S. R. 2020. Biosurfactant production and engine oil degradation by marine halotolerant *Bacillus licheniformis* LRK1. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 29: 101808. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101808>.

Nemec A., Krisova L., Maixnerova M., Van der Reidjen T., Deschaght P., Passet V., Vaneechoutte M., Brisse S., Dijkshoorn L. 2011. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus pittii* sp. nov. (formely *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formely *Acinetobacter* genomic species (13TU)). *Research in microbiology* 162: 393-404.

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>.

OECD. 1984. Earthworm bioassay protocol for soil toxicity screening. Organization for Economic Cooperation and Development. Earthworm, acute toxicity test. Guideline for testing of chemicals. 207: 1-9.

Ohadi M., Dehghannoudeh G., Forootanfar H., Shakibaie M. & Rajaei M. 2018. Investigation of the structural, physicochemical properties, and aggregation behavior of lipopeptide biosurfactant produced by *Acinetobacter junii* B6. *International Journal of Biological Macromolecules*. 112: 712–719. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.209>.

Ohadi M., Dehghannoudeh G., Shakibaie M., Banat I. M., Pournamdari M. & Forootanfar H. 2017. Isolation, characterization, and optimization of biosurfactant production by an oil-degrading *Acinetobacter junii* B6 isolated from an Iranian oil

excavation site. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 12: 1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.08.007>.

Ojeda-Morales M. E., Domínguez-Domínguez M., Hernández-Rivera M. A. & Zavala-Cruz J. 2015. Biosurfactant production by strains of *Azospirillum* isolated from petroleum-contaminated sites. *Water, Air and Soil Pollution*. 226: 401. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2659-0>.

Ojeda-Morales M. E., Hernández Rivera M. A., Domínguez-Domínguez M., Córdova Bautista Y. & Ojeda Morales U. M. 2016. Propiedades físico-químicas, termodinámicas y biológicas de un biosurfactante con base en lipopéptidos. *Journal CIM*. 4: 640-645.

Ojeda-Morales, M. E., Domínguez-Domínguez, M., Hernández-Rivera, M. A., & Álvarez-Ramírez, J. G. 2016. Biosurfactant Synthesized by *Azospirillum lipoferum* ALM1B2: Characterization and Application for Environmental Protection. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(6)

Onaizi S. A. 2021. Statistical analyses of the effect of rhamnolipid biosurfactant addition on the enzymatic removal of bisphenol A from wastewater. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 32:101929. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101929>.

Parthipan P., Elumalai P., Sathishkumar K., Sabarinathan D., Murugan K., Benelli G. & Rajasekar A. 2017. Biosurfactant and enzyme mediated crude oil degradation by *Pseudomonas stutzeri* NA3 and *Acinetobacter baumannii* MN3. *3 Biotech*. 7(5): 278. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0902-7>.

Pemex. 2022. Centro de Coordinación y Apoyo a Emergencias (CCAEE). www.pemex.com

Pérez Muñoz Y., López Martínez S., Rodríguez Luna A. R., & Ramos Arcos S. A. 2019. Evaluación de impacto socioambiental, por derrame de petróleo de un ducto en Comalcalco, Tabasco. *Journal of Basic Sciences*. 5(15): 134-152. <https://doi.org/10.19136/jobs.a5n15.3574>.

Pérez Vargas J., Anaya Reza O., Chang Solís C. K., Membrillo Venegas I. L. & Calva Calva G. 2010. Producción de biosurfactantes por bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno crecidas en hidrocarburos. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*. 41: 1-9.

Pérez Vargas J., Viguera Carmona S. E., Zamudio Moreno E., Rivera Casado N. A. & Calva Calva G. 2017. Bioremediation of soils from oil spill impacted sites using bioaugmentation with biosurfactants producing, native, free-living nitrogen fixing bacteria. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 33 (Especial Biotecnología e ingeniería ambiental) 105-114. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.esp01.09>.

Profepa. 2020. Informe de actividades 2020. México. 80 pag.

Raut S., Rijal K. R., Khatiwada S., Karna S., Khanal R., Adhikar J. & Adhikari B. 2020. Trend and characteristics of *Acinetobacter baumannii* infections in patients attending Universal College of Medical Sciences, Bhairahawa, Western Nepal: A longitudinal study of 2018. *Infection and Drug Resistance*. 13: 1631–1641. <https://doi.org/10.2147/IDR.S257851>.

Ray M., Kumar V., Banerjee C., Gupta P., Singh S. & Singh A. 2021. Investigation of biosurfactants produced by three indigenous bacterial strains, their growth kinetics and their anthracene and fluorene tolerance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 208: 111621. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111621>.

Restrepo-Correa S. P., Pineda-Meneses E. C. & Ríos-Osorio L. A. 2017. Mechanisms of action of fungi and bacteria used as biofertilizers in agricultural soils: a systematic review. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 18(2): 335-351. https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num2_art:635.

Saeed Q., Xiukang W., Haider F. U., Kučerik J., Mumtaz M. Z., H.olatko J., Naseem M., Kintl A., Ejaz M., Naveed M., Brtnicky M. & Mustafa A. 2021. Rhizosphere bacteria in plant growth promotion, biocontrol, and bioremediation of contaminated sites: A comprehensive review of effects and mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*. 22: 10529. <https://doi.org/10.3390/ijms221910529>.

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>.

Salazar A. M., & Ordoñez C. A. 2013. Aislamiento de identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en el suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. UTP. Trabajo de Grado, Química Industrial. 115p.

Salazar de Vegasa E. Z. & Nieves B. 2005. *Acinetobacter spp.*: aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 25(2): 178-191.

Sari C. N., Hertadi R., Gozan M. & Roslan A. M. 2019. Factors affecting the production of biosurfactants and their applications in enhanced oil recovery (EOR). A review. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 353: 012048.

Semarnat. 2020. Segundo informe de labores, medio ambiente. México. 120 pag.

Speight J. G. 2016. Introduction to enhanced recovery methods for heavy oil and tar sands. Part I. Reservoirs and Reservoir Fluids. Second Edition. Gulf Professional Publishing. U.S.A. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-01296-8>.

Umar W., Ayub M. A., Rehman M., Ahmad H. R., Farooqi Z. U. R., Shahzad A., Rehman U., Mustafa A. & Nadeem M. 2020. Nitrogen and phosphorus use efficiency in agroecosystems. *In: Resources Use Efficiency in Agriculture*, (Kumar S., Meena R. S. & Jhariya M.K., eds). Springer. Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6953-1_7.

Vaidya S., Jain K. & Madamwar D. 2017. Metabolism of pyrene through phthalic acid pathway by enriched bacterial consortium composed of *Pseudomonas*, *Burkholderia*, and *Rhodococcus* (PBR). *3 Biotech*. 7: 29. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0598-8>.

Varjani S. J. 2017. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*. 223: 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>.

Varjania, S. J. and E. Gnansounou. 2017. Microbial dynamics in petroleum oilfields and their relationship with physiological properties of petroleum oil reservoirs. *Bioresource Technology*. 245:1258-1265.

WSDE. Washington State Department of Ecology. 1996. Earthworm Bioassay protocol for soil toxicity screening. Publication No. 96-327.

Younas F., Mustafa A., Farooqi Z. U. R., Wang X., Younas S., Mohy-Ud-Din W., Ashir Hameed M., Mohsin Abrar M., Maitlo A. A., Noreen S. & Hussain M. M. 2021. Current and emerging adsorbent technologies for wastewater treatment: trends, limitations, and environmental implications. *Water* 13, 215. <https://doi.org/10.3390/w13020215>.

Zhang X., Kong D., Liu X., Xie H., Lou X. & Zeng C. 2021. Combined microbial degradation of crude oil under alkaline conditions by *Acinetobacter baumannii* and *Talaromyces* sp. *Chemosphere*. 273: 129666. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129666>.

Zhao X. Z., Liao G. Z., Gong L. Y., Luan H. X., Chen Q. S., Liu W. D., Liu D. & Feng Y. J. 2021. New insights into the mechanism of surfactant enhanced oil recovery: micellar solubilization and in-situ emulsification. *Petroleum Science*. 19: 870-881. <https://doi.org/10.1016/j.petsci.2021.11.014>.

Zhou H., Huang X., Liang Y., Li Y., Xie Q., Zhang C. & You S. 2020. Enhanced bioremediation of hydraulic fracturing flowback and produced water using an indigenous biosurfactant-producing bacteria *Acinetobacter* sp.Y2. *Chemical Engineering Journal*. 397: 125348. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125348>.