RESTAURACIÓN BIOLÓGICA DE UN SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE UN HONGO PETROFÍLICO PRODUCTORES DE BIOSURFACTANTE

López-Pérez, Perla[1], Ojeda-Morales, Marcia E.[1], Hernández-Rivera, Miguel A.[1], Gómez-Jiménez, Sulma G.[1], Córdova-Bautista, Yolanda[1]*

[1]División Académica de Ingeniería y Arquitectura, Laboratorio de Biotecnología, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Cunduacán-Jalpa de Méndez Kilómetro 1, La Esmeralda, C. P. 86690, Cunduacán, Tabasco, México

**marcia.ojeda@ujat.mx*

Área de participación: **Ingeniería Química**

Resumen

El petróleo es la base de la economía de numerosos países, su producción se localiza principalmente en el Golfo de México, siendo el territorio tabasqueño el más importante. Aunado a su producción están los siniestros ambientales. Para minimizar su impacto se han realizado estudios con base en microorganismos petrofílicos, siendo las cepas fúngicas los menos estudiados. Por lo tanto, en esta investigación fue evaluado un hongo petrofílico, con la facultad de sintetizar biosurfactantes para optimizar una biorremediación. En condiciones *in-vitro*, se caracterizó un petróleo de la región con base en NOM-016-CRE-2016, y mediante una batería de técnicas analíticas como: método de agar base-sangre, gota colapsada, índice y capacidad de emulsión, se evaluó la producción de biosufactantes. Los resultaron evidenciaron que el *Aspegillus sp* degradó el 61% del petróleo en un suelo vertisol durante 9 semanas, mientras que, la máxima producción de biosurfactante fue al tercer día de establecer el experimento.

Palabras clave: *Aspergillus, biorremediación, biosurfactante, petróleo.*

Abstract

Oil is the basis of the economy of many countries, its production is mainly located in the Gulf of Mexico, with the Tabasco territory being the most important. In addition to its production, there are environmental disasters. To minimize its impact, studies have been carried out based on petrophilic microorganisms, with fungal strains being the least studied. Therefore, in this research, a petrophilic fungus was evaluated, with the ability to synthesize surfactants to optimize bioremediation. Under *in-vitro* conditions, an oil from the region based on NOM-016-CRE-2016 was characterized, and by means of a battery of analytical techniques such as: blood-based agar method, collapsed drop, index and emulsion capacity, the production of biosurfactants was evaluated. The results showed that *Aspegillus sp* degraded 61% of the oil in a vertisol soil for 9 weeks, while the maximum production of biosurfactant was on the third day of establishing the experiment.

Key words: *Aspergillus, bioremediation, biosurfactant, petroleum.*

Introducción

Los estados de Tabasco y Campeche se convirtieron en importantes productores de petróleo en México, en los cuales se descubrieron grandes yacimientos de crudo que fortalecieron la producción de petróleo de la empresa paraestatal Petróleos Mexicanos (PEMEX), convirtiendo temporalmente

al territorio mexicano en uno de los mayores productores y exportadores a nivel mundial entre los años 60´s y 80´s [1].

Los campos petroleros con mayor capacidad de producción se localizan en el Golfo de México y en parte del litoral. Sin embargo, en tierra, las principales zonas productoras se encuentran ubicadas en el sureste del país, especialmente en territorio tabasqueño [2]. Derivado de la explotación, transporte y procesamiento del petróleo y sus derivados, las actividades de este sector se encuentran relacionadas con impactos negativos sobre el medio ambiente, y esto ha provocado contaminación en cuerpos de agua y en suelos [3]. Así como, la salud y la economía de los campesinos y agricultores que viven de estas actividades primarias [4].

Debido a los daños que provoca la contaminación del petróleo, se han desarrollado diversos métodos para tratar estos contaminantes, los cuales pueden ser físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos [5] [2]. Los tratamientos biológicos se basan en el uso de ciertos microorganismos (bacterias y hongos) capaces de degradar al petróleo, al utilizarlos como fuente de energía [6], muchas veces el petróleo no se encuentra biodisponible, para facilitar la disponibilidad del petróleo entrampado entre los microporos del suelo, es necesario investigar microorganismos capaces de producir sustancias biosurfactantes, que reduzcan la tensión superficial y modifiquen la mojabilidad del suelo facilitando su separación. Los biosurfactantes son compuestos no tóxicos y amigables con el medioambiente, dado que, son compuestos biodegradables [7]. La elección del biosurfactante para la biorremediación de suelos contaminados con petróleo debe tener en cuenta las características del suelo a tratar, las propiedades del propio biosurfactante, así como también, a los microorganismos degradadores de petróleo [8]. Se ha reportado [9] que ciertos hongos, como los hongos del género *Aspergillus sp y Monocillium sp* poseen la capacidad de degradar hidrocarburos del petróleo en suelos y agua [10] e incluso que remedian un suelo contaminado con petróleo hasta un 80% más rápido y moléculas más pesadas (C20≥), por lo que, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la producción de un biosurfactante producido por una cepa fúngica petrofílica con potencial aplicación en la remediación de suelos contaminados con petróleo.

Metodología

Obtención de la muestra

El petróleo crudo se obtuvo de la batería de separación del Campo Giraldas, propiedad de Petróleos Mexicanos (PEMEX), y ubicada en el poblado San Manuel, Huimanguillo, Tabasco.

Caracterización del petróleo crudo

Las propiedades determinadas fueron con base en [11]. Densidad API y gravedad específica (método ASTM D5002-19) empleando un densímetro digital de tubo oscilante DMA 4100M, marca Anton Paar, mientras que, para la determinación del azufre total se aplicó el método ASTM 5453-19a mediante un espectrómetro fluorescente con analizador automático para análisis de azufre total modelo NSX-2100V (Configuración de azufre con detector SD-210) marca Mitsubishi Chemical Analytech.

Etapa 1. Aislamiento de cepas fúngicas

Para la reproducción y crecimiento de hongos filamentosos presentes en el petróleo, una muestra de 100 µL se colocó en cajas de Petri con agar papa dextrosa (PDA) previamente esterilizado (16 psig, 15 min) [12]. El petróleo fue extendido por toda la placa en condiciones axénicas con apoyo de un asa drigalski; las cajas de Petri inoculadas se depositaron en una estufa de cultivo marca Thermo scientific a 60 °C durante 5 d hasta la expresión de las colonias fúngicas.

Etapa 2. Identificación de hongos petrofílicos

Para comprobar que los hongos expresados en PDA eran capaces de degradar petróleo, se utilizaron dos técnicas a) Método de papel filtro impregnado con petróleo. Para esto, se preparó un volumen de 250 mL de agar-agar, y se esterilizó en calor húmedo (16 psig, 15 min). El medio estéril fue vertido en cajas Petri, y una vez solidificado; en el centro de la caja se colocó un cuadrado de 2x2 cm de papel filtro poro medio e impregnado con petróleo crudo estéril. Posteriormente, con ayuda de un sacabocado, se extrajo una rodaja (1±0.1 cm) de cada hongo en el PDA, y se colocó en el centro del papel filtro [13]. Las cajas Petri fueron llevadas a incubación en una estufa de cultivo marca Thermo scientific [14] hasta la expresión los posibles hongos petrofílicos. b) Degradación de petróleo en suelo. Para cuantificar el hidrocarburo degradado, y en condiciones de laboratorio; un suelo tipo vertisol [15] se procesó de acuerdo con [3] y contaminó a 50,000 ppm con petróleo crudo (Tabla 1). Posteriormente, en condiciones estériles, las unidades experimentales fueron inoculadas con caldo que contenía las cepas fúngicas seleccionadas del método del papel filtro. Una muestra de 20 g del suelo contaminado fue sustraída cada 72 h y analizada con base en [16]; esto con el objetivo de determinar la remoción de hidrocarburos de fracción pesada (HFP). El bioensayo se estableció por 6 d.

Evaluación de características microscópicas y macroscópicas de las UFC fúngicas

Tinción de cepas fúngicas.

La técnica de microcultivo se utilizó para la identificación de las estructuras filamentosas de las UFC sobrevivientes de la etapa 1. El procedimiento utilizado fue con base en lo reportado por [12]. En condiciones estériles, en una placa de Petri vacía se colocó una varilla de vidrio en U, y sobre ella un portaobjeto. Posteriormente, un fragmento de medio de cultivo sólido de PDA estéril (0.5 x 0.5 cm) fue extraído, y colocado en el centro de la superficie del portaobjetos. Por otra parte, las esporas de la cepa fúngica desarrollada fueron obtenidas con ayuda de un asa de inoculación, y se depositaron en los bordes del fragmento de PDA estéril [14]. Posteriormente, un cubreobjeto estéril se colocó sobre el fragmento inoculado con las esporas del hongo, y se añadió de 1-2 mL de agua glicerinada (agua:glicerina, 1:1 v/v) estéril en el fondo de la placa para mantener humedad. La caja Petri con el microcultivo se cerró y llevó a incubación en una estufa de cultivo Thermo scientific durante 72 h. Las cepas fúngicas petrofílicas fueron analizadas en un microscopio electrónico de barrido (MEB) marca JEOL modelo JSM-6010LA, con la finalidad de observar el aparato reproductor.

Batería de técnicas analíticas para inferir cualitativamente la presencia de biosurfactante sintetizados por hongos filamentosos

Para determinar el tiempo de máxima producción de biosurfactantes y disminuir los costos de producción, se estableció en condiciones *in vitro,* un bioensayo que constaba de una jarra kettler con el caldo productor de biosurfactantes (agua destilada:nitrofoska; 1:1) (Figura 1). El caldo con masa fúngica fue muestreado para separar la biomasa y el sobrenadante, libre de células, se sometió a ensayos analíticos e inferir el tiempo en el que se registrara la mayor producción de biosurfactantes. Las técnicas analíticas fueron: *a) Obtención del caldo libre de células para determinación de propiedades biotensioactivas.* Se obtuvieron muestras de 10 mL cada 24 h desde el tiempo 0 hasta 120 h, las cuales fueron centrifugadas a 5,000 rpm por 40 min a 28±1°C, con el fin de precipitar las células microbianas, y generar así un caldo crudo que contuviera los biosurfactantes (entre otros productos metabólicos). El sobrenadante fue extraído y almacenad

punto, se preparó el agar base sangre de acuerdo con [13], con ayuda de un sacabocado (1 cm^2) se

extrajo una porción del agar, dejando un agujero en forma de pozo. El número de cavidades fue en función de los tiempos de toma de muestra. Cada uno de estos pozos fueron inundados completamente con el caldo crudo libre de células (1±0.1 mL). Como control se usó medio de cultivo sin cultivar; después de 72 h de incubación a 29±1 °C se observaron las cajas Petri, y se registró la hemólisis por pozo con base en la formación de un halo, y cuya área fue medida por técnicas de fotogrametría. Para la obtención imágenes se utilizó la técnica de fotogrametría, con ayuda del software FIJI de ImageJ win-32, versión 1.44°. *c) Gota colapsada.* Para esta prueba se colocaron 40 mL 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. Como control se empleó el biosurfactante con base en alfa-limoneno, con nombre comercial de Ecoterra BS. d) *Índice de emulsión (IE_{24}).* En un tubo de ensayo de (10 x 1.5 cm)., se mezclaron 2 mL de caldo libre de hongos y 2 mL de petróleo tipo istmo, y con ayuda de un vórtex se mezclaron los volúmenes por 2 min. Posteriormente, la emulsión se dejó en reposo por 24 h evitando su exposición directa a la luz solar. El cálculo % (porcentaje) fue el resultado de la división de la altura de la emulsión entre la altura total de la mezcla, multiplicado por 100 [13]. Como sistema control se usó caldo libre de células sin cultivar. d) *Capacidad de emulsión*. Este parámetro se determinó a 30 ± 1°C, y fue una modificación del método propuesto por [17]. Para determinar la capacidad de emulsión, se prepararon diferentes concentraciones de soluciones acuosas de NaCl (%) (1, 3, 6, 9, 12 y 15); 1 mL de cada solución se agregó a un tubo de ensayo que contenía 2.0 mL de biosurfactante, en un sistema cerrado y presión atmosférica (14.7 lb*ing-^{2}); el contenido se agitó vigorosamente durante 30 s y 500 rpm en un mezclador vórtex modelo Barnstead marca Thermolyne. Luego, se añadieron diferentes volúmenes (mL) de petróleo a cada tubo de ensayo: 0.2 (10 % de capacidad de emulsión), 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0 (100 %) y se agitó nuevamente. Se añadió petróleo a cada tubo hasta que se observó una fracción de petróleo en la capa superior del líquido. El volumen total de aceite usado se dividió por el volumen de la fase acuosa y se multiplicó por 100, y el resultado se informó como el porcentaje de capacidad emulsionante. Todas las mediciones se repitieron tres veces para obtener el valor promedio.

Evaluación de la degradación de petróleo y reproducción microbiana petrofílica

La extracción de la fracción pesada de petróleo en un suelo contaminado a 50,000 ppm se llevó a cabo por gravimetría (método establecido en la [18]). En una balanza semi-analítica (VE-300, Velab) se pesaron 10 g de suelo contaminado, adicionando 15 g de Na_2SO_4 anhidro A.C.S. La mezcla se trituró hasta estar homogénea; entonces, la mezcla se colocó en un matraz Erlenmeyer (250 mL, CIVEQ) y se le añadieron 30 mL de hexano A.C.S. A continuación, el matraz se introdujo en un baño ultrasónico (LUC-405, Labtech) para un tiempo de sonicación de 20 min, procedimiento de acuerdo a la EPA 3550c. El muestreo se llevó a cabo cada 48 h durante 30 d. Posteriormente, los cálculos para determinar los hidrocarburos de fracción pesada fueron con base en [16].

La cuantificación de las UFC se realizó con base en la [19]. En condiciones asépticas, una muestra de1 mL fue transferida del biorreactor a un tubo de ensayo (20 x 150 mm, marca KIMAX) con 9 mL de agua destilada estéril, y se rotuló como “dilución 10^{-1}; a partir de esta dilución el método se continuó hasta llegar a la dilución 10^{-4}. Posteriormente, un inóculo de 0.1 mL de cada dilución fue transferido a cinco cajas de Petri con medio de cultivo agar dextrosa y papa, y con un asa de digralsky se dispersó uniformemente sobre la superficie del medio hasta sequedad. Las cajas fueron colocadas en bolsas de plástico previamente desinfectadas con alcohol etílico al 70 %, y preservadas en una incubadora biológica a 28 °C por 72 h.

Resultados y discusión

Obtención y caracterización de la muestra de petróleo

Las coordenadas terrestres son 17°39´25´´N 93°21´48´´W. La caracterización de la muestra de petróleo (Tabla 1) proveniente de la batería de separación del Campo Giraldas 1.

Tabla 1. Caracterización del petróleo de la batería del Campo Giraldas a 20 °C

Parámetros	Método	Resultados
Gravedad específica (g.cm^{-3})	ASTM D5002-19	0.8354
Gravedad API 20 °C	ASTM D5002-19	38.02
Azufre total (ppm)	ASTM -5453-19[a]	8 900.16

La clasificación del petróleo lo coloca como tipo Istmo, con base en la nomenclatura del American Petroleum Institute (API).

Aislamiento de cepas fúngicas

La siembra por extensión en placa de la muestra de petróleo en agar papa dextrosa, permitió el desarrollo de 3 cepas de hongos filamentosos, las cuales fueron catalogadas como: HP1, HP2 y HP3 (Figura 1).

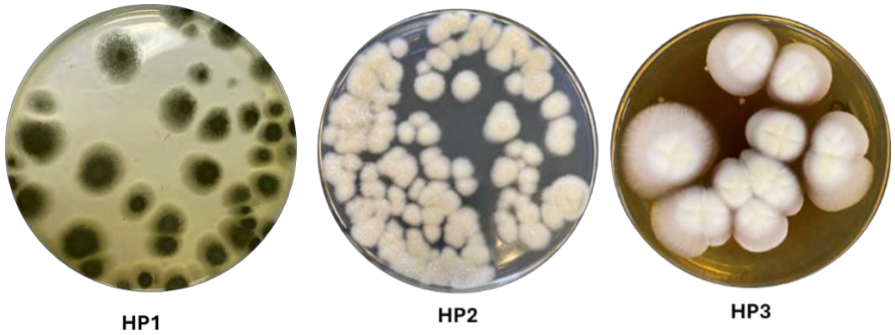


Figura 1. Cepas de hongos filamentosos aislados de la muestra de petróleo crudo procedente del Campo Giraldas, Reforma, Chiapas.

Identificación de hongos petrofílicos

a) Identificación de cepas fúngicas que registraron sobrevivencia en el método de papel filtro impregnado con petróleo. Las cepas fúngicas que registraron sobrevivencia al método fueron HP1 y HP3, las cuales se infiere tienen la capacidad de utilizar al petróleo como única de fuente de carbono. Las cepas fúngicas se clasificaron como HP1 y HP3.

El registro del crecimiento radial de las cepas fúngicas durante 48 h se reporta en la Tabla 2.

Tabla 2. Radio de las cepas fúngicas sobrevivientes a la técnica del papel filtro.

Cepa fúngica	Radio (cm) inicial	Radio (cm) 24 h	Radio (cm) 48 h
HP1	0.7	1.4	2.1
HP2	0.5	Sin desarrollo	Sin desarrollo
HP3	0.3	0.5	0.5

b) Verificación de la cepa HP1 como petrofílica. Para esto, se estableció un experimento con un suelo vertisol contaminado a 50,000 ppm con petróleo, con una medida inicial (0 h) y otra final (504 h). Al suelo en estudio se le inoculó la cepa HP1 para verificar su poder de degradación. Los hidrocarburos de fracción pesada (HFP) se presentan en la Figura 2, donde se puede visualizar la relación que existe entre la población microbiana petrofílica HP1 y la degradación de petróleo, a partir de este experimento la cepa HP1 fue caracterizada como petrofílica, al reducir un 15% del petróleo inicial en tres semanas. La cepa HP3 fue desechada debido débil desarrollo en petróleo crudo.

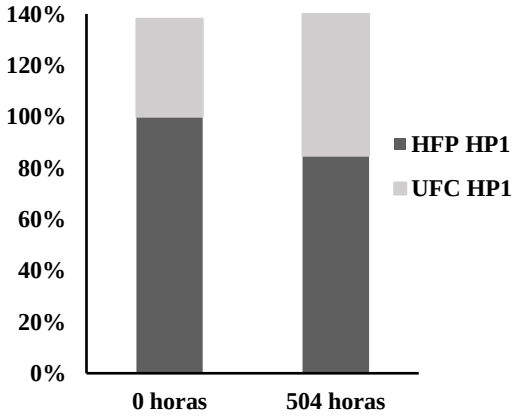


Figura 2. Relación del crecimiento microbiano y la degradación de petróleo crudo en un suelo vertisol a 50,000 ppm de la cepa HP1. Bioensayo establecido por 504 h.

Identificación del género de los hongos petrofílicos

La cepa fúngica petrofílica HP1 pertenece al género *Aspergillus sp* [14], como se muestra en la Figura 3.

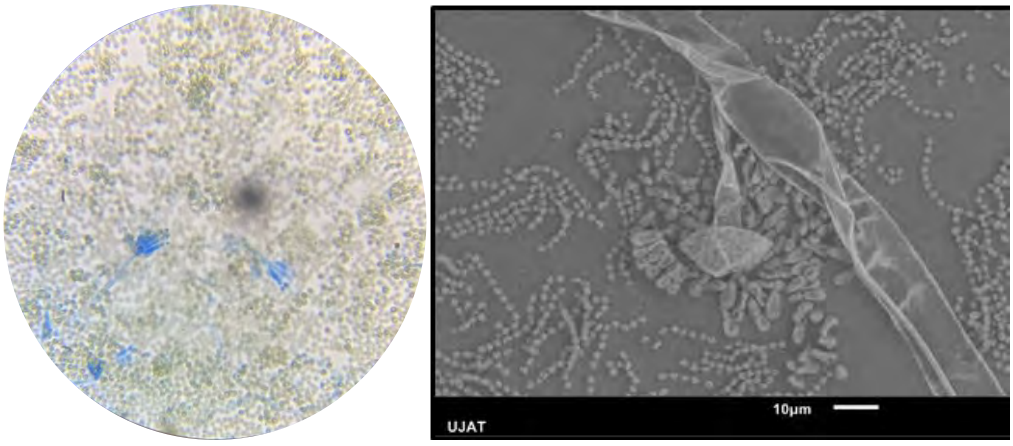


Figura 3. Cepa fúngica perteneciente al género *Aspergillus sp; a) Fotografía en microscopio óptico b) Fotografía en microscopio eléctrico de barrido (MEB).*

La cepa Aspergillus evaluada en esta investigación concuerda con [20], quienes reportaron que las especies del género Aspergillus son capaces de utilizar las diversas fracciones del petróleo (desde los hidrocarburos totales del petróleo hasta las fracciones de resinas y asfaltenos). Además, constituye un complejo de especies de las cuales se ha probado sus propiedades para utilizar petróleo como fuente de carbono. Este género es común encontrarlo en aguas congénitas [21] y ha reportado la degradación de compuestos derivados del petróleo como diésel, gasolina y kerosén. De la misma manera, un estudio realizado por [20] demostró que una cepa de *Aspergillus flavus* fue capaz de degradar cerca del 80 % del petróleo crudo midiendo espectrofotométricamente las tasas de degradación en el medio selectivo bushnell-haas.

Técnicas analíticas para determinar la presencia de biosurfactante de hongos filamentosos

En la Tabla 3 se muestra los resultados al aplicar una serie de técnicas analíticas al caldo de cultivo productor de biosurfactante (nitrofoska 1 g*L^{-1} + 1 mL de petróleo crudo estéril) en diversos tiempos.

Tabla 3. Comportamiento de propiedades del caldo con HP1 *Aspergillus sp,* y presencia de biosurfactantes. Los promedios son resultados de tres réplicas de un muestreo obtenido cada 24 h durante 5 d.

Tiempo (h)	**Gota colapsada (tamaño de la gota en cm)**	**Dispersión de aceite (zona de aclaramiento en cm)**	**Índice de emulsión (IE_{24}, %)**	**Capacidad de emulsión %**
0	1.65 ± 0.01	1.02 ± 0.03	0 ± 0	0
24	3.22 ± 0.01	5.78 ± 0.01	45 ± 1.5	20

En la prueba de dispersión de aceite, la cepa de *Aspergillus sp*, registró la formación del halo sobre la capa de petróleo, mostrando la presencia de biotensioactivos. De acuerdo a [22] [23] también reportaron la formación del halo con la cepa *Aspergillus sp*, mencionando que esta se da cuando una molécula anfipática, como los biotensioactivos, entran en contacto con la interfase petróleo y reduce la tensión interfacial, logrando que el petróleo se fragmente en partículas más pequeñas y se solubilice con el agua, dando así la formación de halos en el petróleo. Los resultados concuerdan con un tiempo en que la gota colapsada presenta diámetro máximo de contacto (4.52 ± 0.02), la zona de aclaramiento de petróleo (11.01 ± 0.04 cm), el índica de emulsión de petróleo (86 %) y la capacidad máxima de emulsión (80%).

Por lo que se infiere que a un tiempo de 72 h se tiene la máxima producción de biosurfactante en un medio con nitrofoska e inoculado con la cepa *Aspergillus sp.*

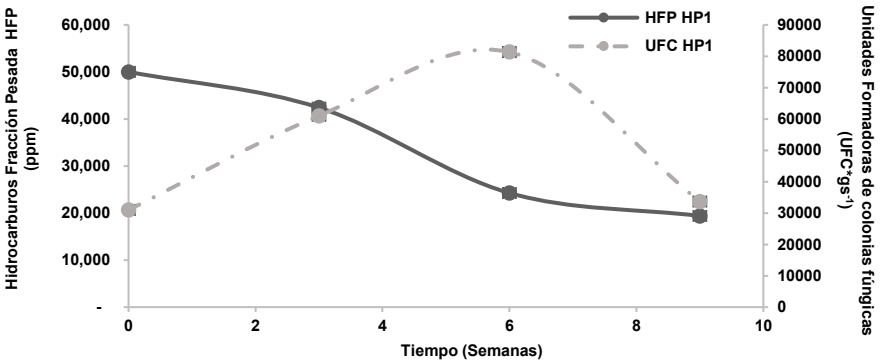


Figura 4. Gráfica representativa del crecimiento poblacional de *Aspergillus ps*, en unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC*gs^{-1}), contra la degradación de Hidrocarburos de Fracción Pesada (HFP). Las barras de error representan el promedio de 3 repeticiones por medición.

Evaluación de la degradación de petróleo y reproducción de población microbiana petrofílica

El hongo HP1 (*Aspergillus sp*) presentó una degradación del 61 % de petróleo en un lapso de 9 semanas, en un suelo vertisol con 50,000 ppm, mientras tanto, el crecimiento poblacional fúngico fue desde 30,667 hasta 81,333 de Unidades Formadoras de Colonias (UFC*gs^{-1}), reflejando un 99 % de crecimiento. Los hongos filamentosos aislados en el suelo vertisol contaminado con petróleo, son considerados heterótrofos tolerantes al petróleo. Los hongos aislados se identificaron fenotípicamente con base en la morfología de la colonia, micelio y estructuras reproductivas, coincidiendo con [14] [20]. Los hongos del género Aspergillus son seleccionados para procesos de biorremediación por alcanzar la mayor concentración en biomasa y la mayor degradación de aceite, además de su baja toxicidad. El aumento de los hongos en el proceso de biodegradación se atribuye a que el hidrocarburo como fuente de carbono puede sostener la población microbiana, entonces, está considerado en el grupo de los hongos con mayor capacidad para reducir los niveles de petróleo en derrames de petróleo.

Trabajo a futuro

En el tiempo donde se registró el mayor diámetro de gota colapsada, dispersión de aceite y capacidad de emulsión (72 h de haber establecido el experimento), el biosurfactante producido por *Aspergillius sp* deberá ser extraído y purificado del caldo para caracterizarlo. Es decir, determinar propiedades físicas (densidad), químicas (pH, peso molecular), reológicas (tensión superficial, concentración micelar crítica) y toxicidad (CL_{50}), además del Balance Lipofílico e Hidrofílico (HLB) para predecir potenciales aplicaciones en diversas industrias como: la farmacéutica, petrolera, textil, cosmética, entre otras.

Conclusiones

El hongo *Aspergillus sp* tiene el potencial de realizar una biorremediación de petróleo en un suelo tipo vertisol contaminado con 50,000 ppm de petróleo crudo tipo istmo.

La mayor concentración de biosurfactante que se puede obtener en una medio de cultivo nitrofoska:petróleo, 1:1 (m:v) es a las 72 h de haber inoculado *Aspergillus sp* debido a que fue el tiempo en que se registró el mayor diámetro de gota colapsada, dispersión de aceite y capacidad de emulsión en el caldo microbiano.

Referencias

[1] Á. V. Rabelo Avalos, D. E. Ramos Muñoz, M. Á. Díaz Perera y M. A. Mesa Jurado, «El petróleo en Tabasco: propuesta para una periodización,» *Scielo,* vol. 83, n° 1, pp. 129-155, 2021, doi: https://doi.org/10.22201/iis.01882503p.2021.1.60025.

[2] M. d. R. Cantañeda-Chávez, E. Díaz-Torres, J. V. Megchún-García y A. García-Saldaña, «Hydrocarbons and heavy metals in Macuspana, Tabasco, Mexico: key stakeholders,» *Research in Agricultural & Applied Economics,* vol. 14, n° 5, pp. 113-120, 2021, doi: 10.22004/ag.econ.313414.

[3] C. M. Morales-Bautista, C. E. Lobato-García, J. Flores Jiménez y C. Méndez-Olán, «Cambios en las propiedades físicas y químicas de un suelo debido a un proceso de restauración aplicado a un derrame de hidrocarburos,» *Scielo,* vol. 29, n° 1, pp. 1-14, 2019, doi: https://doi.org/10.15174/au.2019.2154.

[4] S. Ruíz Liévano, «La responsabilidad del daño ambiental por derrame de hidrocarburos en suelos en Tabasco, México,» *Revista Ciencias y Humanidades,* vol. XIV, n° 14, pp. 135-160, 2022, doi: https://oaji.net/articles/2022/11095-1659451910.pdf.

[5] S. Mahima, «An inclusive evaluation of soil pollution and remediation by chemical, physical and biological methods,» *Internatinal Journal of Chemical Studies,* vol. 12, n° 4, pp. 5-17, 2024.

[6] J. Ugaz-Hoyos, H. Vega Cruz, S. Iglesias Osores y C. Careño-Farfán, «Biosurfactants in the bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils,» *Scielo Preprintes,* vol. 1, 2020, doi: https://doi.org/10.1590/scielopreprints.642.

[7] A. M. Bohórquez Rodríguez y O. Castiblanco Urrego, «Revisión del uso de biosurfactantes para su implementación en los procesos de recuperación mejorada de petróleo,» *Inventum. Ingenieria, Tecnologia e Investigacion,* vol. 16, n° 31, pp. 4-14, 2021, doi: 10.26620/uniminuto.inventum.16.31.2021.4-14.

[8] J. Ahmad, N. Marsidi, S. R. Sheikh Abdullah, H. Abu Hasan, A. R. Othman, N. ´. Ismail y C. B. Kurniawan, «Integrating phytoremediation and mycoremediation with biosurfactant-producing fungi for hydrocarbon removal and the potential production of secondary resources,» *Chemosphere,* vol. 349, 2024, doi: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140881.

[9] U. Odili, F. Ibrahim, E. Shaibu-Imodagbe y H. Atta, «Comparative Assessment of Crude Oil Degradation by Monocillium sp. and Aspergillus niguer,» *Journal of Applied Sciences and Environmental Management,* vol. 25, n° 5, pp. 815-820, Mayo 2020, doi: https://dx.doi.org/10.4314/jasem.v24i5.13.

[10] A. Maamar, M. E. Lucchesi, S. Debaets, N. Nguyen Van Long, M. Quemener, E. Coton, M. Bouderbala, G. Burgaud y A. Matallah-Boutiba, «Highlighting the Crude Oil Bioremediation Potential of Marine Fungi Isolated from the Port of Oran (Algeria),» *Diversity,* vol. 12, n° 5, pp. 1-19, 2020, doi: https://doi.org/10.3390/d12050196.

[11] Comisión Reguladora de Energía, «NOM-016-CRE-2016. Especificaciones de calidad de los petrolíferos,» 29 08 2016.

[12] M. T. Madigan, K. S. Bender, D. H. Buckeley, W. M. Sattley y S. A. Stahl, Brock Biology of Microorganisms, Pearson Education, 2021.

[13] R. Torres-Custodio, M. Á. Hernández-Rivera, J. D. l. S. López-Lázaro, Y. Córdova-Bautista, J. G. Álvarez-Ramírez, P. Sifuentes-Gallardo y M. E. Ojeda-Morales, «Extraction and characterization of a biosurfactant synthesized by Acinotebacter baumannii,» *Mexican Journal of Biotecnnology,* vol. 8, n° 1, pp. 37-65, 2023, doi: https://doi.org/10.29267/mxjb.2023.8.1.37.

[14] E. W. Koneman, G. W. Procop, D. L. Church, G. S. Hall, W. M. Janda, P. C. Schreckenberger y G. L. Woods, Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology, 7 ed., Wolters Kluwer, L'Hospitalet de Llobregat, 2017.

[15] D. J. Palma-López, R. Jiménez-Ramírez, J. Zavala-Cruz, F. Bautista-Zúñiga, F. Gavi-Reyes y D. Y. Palma-Cancino, «Actualización de la clasificación de suelos de Tabasco, México,» *AGOPRODUCTIVIDAD - Colegio de Posgraduados,* vol. 10, n° 12, pp. 29-35, 2017.

[16] SEMARNAT, «NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación,» 2013.

[17] D. P. Cassidy y A. J. Hudak, «Microorganism selection and biosurfactant production in a continuously and periodically operated bioslurry reactor,» *Journal of Hazardous Materials,* vol. 84, n° 2, pp. 253-264, 2001, doi: https://doi.org/10.1016/S0304-3894(01)00242-4.

[18] «NMX-AA-134-SCFI-2006. SUELOS – HIDROCARBUROS FRACCIÓN PESADA POR EXTRACCION Y GRAVIMETRIA – MÉTODO DE PRUEBA,» 2006.

[19] «NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.,» 1995.

[20] M. A. Al.Dossary, S. A. Abood y H. T. A. Al-Saad, «Biodegradation of Crude Oil Using Aspergillus species,» *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare,* vol. 9, n° 4, pp. 60-64, 2019,doi: 10.7176/JBA.

[21] A. M. Ahmed El-Bondkly y M. M. A. Ahmed El-Gendy, «Bioremoval of some heavy metals from aqueous solutions by two different indigenous fungi Aspergillus sp. AHM69 and Penicillium sp. AHM96 isolated from petroleum refining wastewater,» *Heliyon,* vol. 8, pp. 1-16, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09854.

[22] M. Asgher, S. Arshad, S. A. Qamar y N. Khalld, «Improved biosurfactant production from Aspergillus niger through chemical mutagenesis: characterization and RSM optimization,» *discover Applied Sciences,* vol. 2, n° 966, pp. 1-11, 2020, doi: https://doi.org/10.1007/s42452-020-2783-3.

[23] A. H. Khan y S. Tanveer, «Biosurfactant-producing Aspergillus, Penicillium, and Candida Performed Higher Biodegradation of Diesel Oil than a Non-producing Fungal Strain,» *Appl Biochem Microbiol,* pp. 282-289, 2023, doi: https://doi.org/10.1134/S0003683823030109.