

# Producción de un tensoactivo biológico

## Production of a biological surfactant

*N. Gladys Rosero\**, *Fanny Dugarte\*\**, *Astrid Lorely Pimienta\**, *María Piedad Díaz\**,  
*Freddy G. Carvajal\**

### RESUMEN

En este artículo se resume el estudio realizado en el Instituto Colombiano del Petróleo (ICP), para escalar desde el laboratorio hasta la planta piloto, un proceso para la producción de biosurfactante tipo ramnolípido. Mediante el examen de las condiciones de activación del microorganismo y del diseño del medio de cultivo se establecieron condiciones que en forma sistemática disparan el mecanismo productor del microorganismo y permiten incrementar la productividad del biosurfactante. Se demostró la alta eficiencia de este aditivo biológico en aplicaciones, tales como biodegradación de hidrocarburos en medios salinos, control de la corrosión y recuperación de crudo a partir de lodos de fondos de tanques de almacenamiento.

Palabras clave: Biosurfactantes, biorremediación, control de corrosión, recuperación de hidrocarburo.

### ABSTRACT

This paper summarizes the scale up work performed at the Colombian Petroleum Institute on a process to produce at pilot plant level a biosurfactant of the rhamnolipid type. By examination of both the activation conditions of the microorganism and design aspects of the broth, a stable condition was achieved which consistently triggers the production mechanisms and thus it was obtained a significant increment in biosurfactant productivity. The biological surfactant exhibited high efficiency in applications such as hydrocarbon biodegradation in saline environments, corrosion inhibition, and crude oil recovery from storage tank bottom sludges.

Key words: Biosurfactant, bioremediation, corrosion control, oil recovery.

### INTRODUCCIÓN

Es indiscutible el trascendental papel que desempeñan en la industria las sustancias con actividad superficial; la demanda mundial de tensoactivos en el año 2000 fue de 10,5 millones de toneladas (Dubos *et al.*, 2000). En este mercado, los biosurfactantes se encuentran en forma incipiente debido a que se requiere vencer ciertas barreras económicas y tecnológicas. Sin embargo, cada vez son mayores las oportunidades para la producción biotecnológica de aditivos; por una parte, surgen necesidades de especificidad que solamente pueden suplir los aditivos biológicos, y por otra parte, se incrementan las restricciones ambientales que obligan a que el costo ambiental sea tenido en cuenta (Banat, 1995; Bognolo, 1999; Díaz, 1991).

En el ICP se han desarrollado tecnologías que en unos casos buscan el mejor aprovechamiento del crudo y la reducción de la descarga de hidrocarburos, y en otros casos permiten realizar la biorremediación de suelos y de cuerpos de agua impactados por ataques a la infraestructura petrolera. El empleo de productos tensoactivos constituye una alternativa que mejora la eficiencia de procesos ya desarrollados; sin embargo, los aditivos que se apliquen deben ser productos inocuos al medio ambiente, por lo cual se planteó investigar en el desarrollo de un tensoactivo biológico. En correspondencia con esto, se realizó el estudio de un proceso para la producción de un biosurfactante tipo ramnolípido (RL), denominado Tensobiol®

\* Instituto Colombiano del Petróleo, Fax: (0976) 44 54 44. e-mail: nrosero@ecopetrol.com.co

\*\* Ambicoop Ltda.

ICP, valorando su eficiencia en varias de las aplicaciones previstas.

Una vez seleccionada la cepa productora, se iniciaron estudios a escala laboratorio con el objeto de conocer los parámetros de crecimiento y rendimiento, teniendo en cuenta diversas condiciones nutricionales y ambientales, además de los fenómenos de transferencia de masa. El resultado de este primer estudio permitió determinar que la producción del biosurfactante se da como metabolito secundario cuando el medio de cultivo mantiene limitada la concentración de la fuente de nitrógeno.

El incremento en la productividad fue evaluado con el manejo de mayores densidades bacterianas, y se obtuvo la información necesaria para estimar los costos de producción industrial del biosurfactante. Paralelamente se evaluó la efectividad de este producto biológico en la biorremediación de hidrocarburos, en la recuperación de hidrocarburos de lodos de fondos de tanques de almacenamiento y como inhibidor de corrosión. También se comparó su eficiencia frente a tensoactivos de origen químico.

## METODOLOGÍA

Después de realizar el aislamiento de varias cepas productoras de biosurfactante, se seleccionó un medio de cultivo base y las condiciones fisicoquímicas para la producción del RL. Se evaluaron diferentes fuentes de carbono, tales como glucosa, querosene, glicerol, propilenglicol, parafina y aceite vegetal. (Pimienta *et al.*, 1997; Rosero *et al.*, 1998). Posteriormente se optimizó el rendimiento del proceso, mediante el examen de las condiciones de activación del microorganismo y del diseño del medio de cultivo.

### Microorganismo

Entre las cepas productoras de biosurfactantes, pertenecientes al cepario del ICP, se seleccionó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ICP 70 para el escalado del proceso. El microorganismo se mantuvo preservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  en viales de 2 ml con glicerol al 20%. La reproducibilidad de la capacidad de la cepa, para producir biosurfactante, se logró una vez se estandarizó un procedimiento de activación de la cepa criopreservada antes de cada inoculación, para lo cual se probaron varias estrategias: (a) inocula-

ción del microorganismo en erlemeyers de 125 ml con 50 ml de medio salino de producción (MSP), de la siguiente composición: 7 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 3 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,1 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , elementos con trazas de hierro y calcio, y 1 % de aceite vegetal como fuente de carbono; (b) inoculación del microorganismo en 50 ml de caldo nutritivo y posterior recultivo en medio MSP, y (c) inoculación en caldo nutritivo, recultivo en caldo nutritivo, y luego dos recultivos consecutivos en medio MSP con 1 % de aceite vegetal. En todos los casos el microorganismo se incubó a  $32^{\circ}\text{C}$  y 140 r.p.m. por 24 horas. Una vez realizada la estrategia de activación del inoculo, el experimento se preparó adicionando 5 ml del cultivo anterior en 50 ml de medio MSP con 2% de aceite vegetal como fuente de carbono. Todos los ensayos de producción del biosurfactante se realizaron a  $32^{\circ}\text{C}$  y 140 r.p.m. durante 120 horas, después de lo cual se evaluó la concentración de RL por el método del ácido tioglicólico (ATG) (Whistier y WoKrom, 1962).

### Parámetros de rendimiento

Los resultados previos indicaron que el biosurfactante es un metabolito secundario que se produce durante látase estacionaria de crecimiento, y que el nitrógeno es uno de los elementos de mayor influencia sobre la productividad del biosurfactante (BS). Se llevaron a cabo evaluaciones para conocer la influencia de estos factores en el proceso de producción.

Para establecer el rendimiento del nitrógeno en biomasa se realizaron experimentos utilizando el medio MSP modificado con 2,1% de aceite vegetal como fuente de carbono. La concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se varió entre 0,8 y 2 g/L para obtener relaciones de C/N entre 40 y 100. Los experimentos se llevaron a cabo en las condiciones antes descritas, con tiempo de proceso de 60 horas. La biomasa se monitoreó por la técnica de peso seco (Madigan, Martinko y Parker, 1997), el nitrógeno por el método Nessler (APHA, 1992) y el RL por el método del ácido tioglicólico.

El factor de rendimiento de la biomasa en biosurfactante se determinó a partir de los resultados de producción realizados anteriormente, utilizando tres fuentes de carbono. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando el medio MSP y 4% de glicerol (contenido de carbono en el glicerol: 40%), 1,89% de parafina (85% de carbono) o 2,15% de aceite vege-

tal (contenido de carbono: 75%). Se utilizaron volúmenes de trabajo de 400 ml en erlenmeyers de 2 L con baffles. Los erlenmeyers se incubaron a 32°C y 140 r.p.m. durante 120 horas.

### Planta piloto

La producción del BS a nivel piloto se evaluó en sistemas lote y lote alimentado, en un reactor de tanque agitado (TA) de 30 litros de capacidad, el cual cuenta con facilidades de esterilización con vapor *in situ*. Adicionalmente, la etapa de producción de biomasa se evaluó en un reactor tipo Airlift de 3,5 litros. En los cultivos lote en TA se utilizó medio MSP modificado con 4 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (equivalente a 0,8 g/L de nitrógeno), 2 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 4,2% de aceite vegetal como fuente de carbono. El pH del medio se mantuvo en 6,5 utilizando NaOH 5N. La aireación se realizó mediante inyección de aire industrial durante las primeras cuatro horas de proceso. Posteriormente se reemplazó el aire por oxígeno industrial con el fin de reducir el nivel de espuma generada, controlando el valor de oxígeno disuelto OD en 2 mg/L. Las corridas se llevaron a cabo entre 120 y 160 horas. En el reactor tipo Airlift se realizaron evaluaciones para la producción de biomasa; no se evaluó la producción del BS, dada la imposibilidad técnica de controlar la espuma. Para obviar este problema, se diseñó y construyó un sistema mecánico de control de espuma. El sistema se probó con 3,2 litros de un medio que contenía 10 g/L de biosurfactante y con inyección de 4 L/minuto de aire industrial. Todos los biorreactores se instrumentaron con registro y control de temperatura, pH y oxígeno disuelto.

Los costos de producción del biosurfactante se estimaron proyectando al nivel industrial los rendimientos obtenidos en la planta piloto, considerando para ello fermentadores tipo Airlift con rompimiento mecánico de espuma (Rosero *et al.*, 2001).

### Aplicaciones

El biosurfactante se evaluó en procesos de biorremediación de aguas salinas contaminadas con hidrocarburos, control de corrosión y recuperación de hidrocarburo a partir de lodos de tanques de almacenamiento de crudo.

La biodegradación de hidrocarburos se evaluó utilizando el consorcio MPD-M en una matriz acuosa

sintética que contenía 30 g/L de NaCl y 1 % de crudo Total Alwyn (Díaz, 2000; Díaz, Grigson y Burgess, 2000); se adicionaron 50 mg/L de ingrediente activo (IA) del biosurfactante o del tensoactivo químico Emulgrosón-ICP<sup>MR</sup> (EM). Experimentos sin tensoactivo y abióticos fueron utilizados como controles. Los experimentos se llevaron a cabo a 32°C, 140 r.p.m. durante 20 días. El hidrocarburo residual se extrajo y cuantificó de acuerdo con los procedimientos descritos por Díaz (2000).

Para la recuperación de hidrocarburos se utilizó un lodo procedente de un tanque de almacenamiento de crudo, el cual presentó una viscosidad de 1000 cP a 25°C, un contenido de agua, sólidos y crudo de 10, 30 y 60%, respectivamente. El procedimiento consistió en formar emulsiones inversas de baja viscosidad con concentraciones de RL entre 125 y 250 mg/L de ingrediente activo (IA) o de aditivos químicos (K y P) en concentraciones de 500 y 1000 mg/L. La etapa siguiente consistió en romper la emulsión y separar el aceite (Mendoza, 2000).

En cuanto a la prueba como inhibidor de corrosión, se realizó una valoración electroquímica, determinando la velocidad de corrosión por el método de curvas TAFEL. Se hicieron las pruebas a dos temperaturas (30°C y 60°C) con probetas de acero al carbono y calomel como electrodos de trabajo y referencia, respectivamente. El electrolito estaba constituido por agua de grifo, 10 g/L de NaCl. Se evaluaron dos concentraciones del BS: 200 y 80 mg/L y 80 mg/L de un inhibidor comercial tipo aniónico D (el proveedor sugería dosificaciones entre 20 y 100 mg/L). Se burbujeó 5 ml/minuto de CO<sub>2</sub> industrial durante 15 minutos (Rosero *et al.*, 1998).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Activación del microorganismo

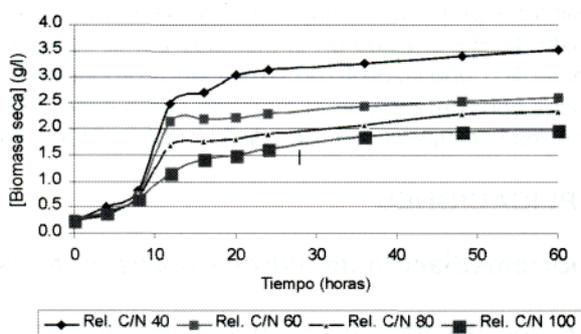
En la tabla 1 se encuentran los datos correspondientes a la evaluación de la influencia del tipo de activación de la cepa, sobre la productividad del biosurfactante. Los mejores resultados se obtuvieron cuando la cepa se recultivó dos veces en caldo nutritivo y dos veces en medio MSP con aceite vegetal como fuente de carbono. Este procedimiento se adoptó para todas las evaluaciones posteriores utilizando la fuente de carbono de interés.

**Tabla 1.** Condiciones de activación.

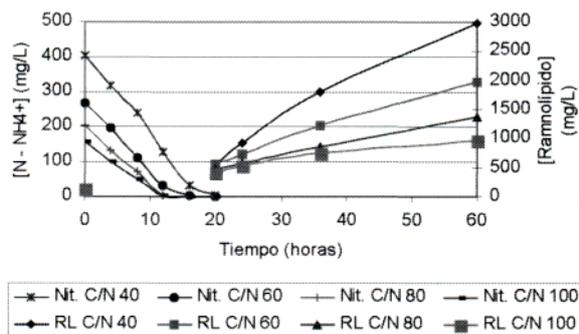
Lote criopreservado	[RAMNOLÍPIDO] (mg/L)		
	Condición 1	Condición 2	Condición 3
	MSP	1CN/1MSP	2CN/2MSP
1	1608	2700	5190
2	1918	3100	5000
3	712	3654	4510

### Factores de rendimiento

Las figuras 1 y 2 presentan el crecimiento bacteriano y la cinética de consumo de nitrógeno y producción de RL para las diferentes relaciones C/N estudiadas.



**Figura 1.** Crecimiento de biomasa.



**Figura 2.** Consumo de nitrógeno y producción de RL.

Cuando la concentración de nitrógeno desciende a valores de 100 mg/L, se empieza a producir el RL en forma significativa. La mayor productividad se obtuvo en el experimento con la relación C/N 40, alcanzando 3 g/L de biomasa a las 20 horas de proceso y 3 g/L de RL a las 60 horas. La mayor velocidad de producción del tensioactivo (50 mg/L\*h) se obtuvo en el período comprendido entre las 20 y 60 horas de pro-

ceso. El rendimiento del nitrógeno en biomasa  $Y_{x/N}$  fue 7,5 g de biomasa por cada gramo de nitrógeno.

En la tabla 2 se presentan los valores promedio de los rendimientos de la biomasa en biosurfactante, obtenidos a partir de diferentes fuentes de carbono.

**Tabla 2.** Rendimiento de diferentes sustratos.

Sustrato	g RL/g biomasa
Glicerol	0,45
Parafina	1,2
Aceite	1

Se observa que con el glicerol se obtuvo el menor rendimiento, lo cual puede atribuirse al hecho de que se trata de un sustrato soluble. Se ha reportado que las fuentes de carbono insolubles incentivan la activación del mecanismo metabólico de producción del biosurfactante, ya que la célula requiere este tipo de compuestos para asimilar el carbono del medio. El mayor rendimiento de biomasa en producto se obtuvo con la parafina; sin embargo, éste no difiere significativamente del obtenido con aceite vegetal, y debido a que la utilización de la parafina exige una etapa de presolubilización de la misma, se optó por seleccionar para las pruebas de planta piloto el aceite vegetal como fuente de carbono.

### Pruebas piloto

La tabla 3 resume los resultados de productividad promedio obtenidos en diferentes pruebas de planta piloto, correspondientes a cultivo por lote y lote alimentado. Se incluyó la etapa de producción de biomasa que se experimentó en el biorreactor Airlift.

**Tabla 3.** Resumen de productividad en planta piloto.

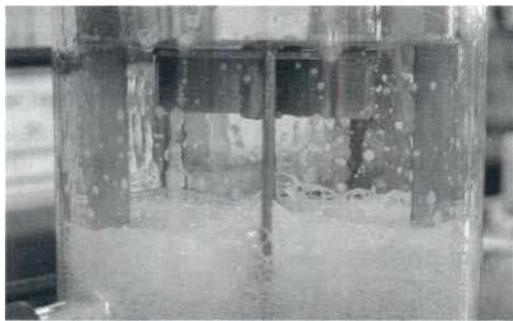
Biorreactor	Bm (g/L)	N (g/L)	$V_p$ (mgRL/L*h)	RL (gRL/L)
Airlift1	3	0,4	NA	NA
Airlift1	7,2	0,81	NA	NA
TA	5	1	60	6,5
TA	8,5	0,81	85	7,85
TA	10	1,5	86	12
TA	11	1,5	100	15

NA: no aplica; Bm: biomasa; N: concentración de nitrógeno;  $V_p$ : velocidad de producción de biosurfactante; RL: tensioactivo.

Las densidades bacterianas logradas en planta piloto superaron significativamente los niveles alcanzados en la etapa de laboratorio. Se observa que la velocidad de producción se incrementa con la densidad bacteriana. El rendimiento promedio del nitrógeno en biomasa obtenido en estas pruebas fue similar al alcanzado en las pruebas de laboratorio. Se lograron rendimientos de biomasa en producto hasta de 1,36 g de RL por cada gramo de biomasa. La mayor acumulación de RL se obtuvo en el experimento que usó 1,5 g/L de nitrógeno.

La fotografía 1 muestra el control de espuma ejercido por el sistema diseñado para tal fin. El máximo nivel de espuma nunca rebasó una distancia de 5 cm bajo el aspa de agitación.

La tabla 4 presenta una proyección estimada de los costos de producción para una planta industrial, considerando los siguientes parámetros requeridos: capacidad de producción: 7.500 litros/mes; concentración de ingrediente activo: 15 g/L., biorreactores tipo Airlift; sa-



Fotografía 1. Control de espuma en el biorreactor Airlift.

**Tabla 4. Costos de producción.**

Elemento	Costo \$/L
Sales	90
Aireación	1.200
Agitación y atemperamiento	2.800
Mano de obra	15
<b>Total</b>	<b>4.090</b>

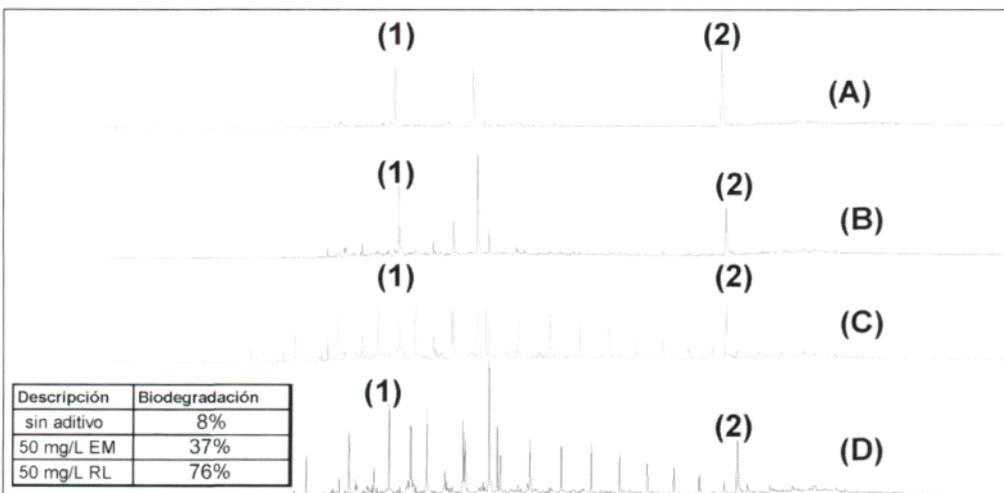
les y aceite vegetal grado comercial en cantidad suficiente para manejar densidades bacterianas de 12 g/L.

Esta valoración económica constituye solamente una primera aproximación. Se requiere conocer los costos de inversión para la construcción de la planta, para estimar el precio de venta, el cual no deberá rebasar el costo del BS ofrecido en el mercado por la compañía Jeneil (\$11.000/kg de 40 g/L) o de ciertos productos químicos considerados en el mercado como especializados, los cuales son del orden de \$12.000/kg (100% IA).

**APLICACIONES**

**Biorremediación de hidrocarburos en agua**

Los cromatogramas de la figura 3 muestran un incremento significativo en la biodegradación de los alcanos normales y ramificados cuando se usaron tensoactivos en el medio. Si bien el aditivo químico EM favoreció la biodegradación (37%), comparado con el caso en que no había tensoactivo (8%), el biosurfactante superó ampliamente la eficiencia del aditivo químico (76%).



**Figura 3.** Biodegradación de HC con consorcio bacteriano MPD-M. (A) 50 mg/L IA de TB; (B) 50 mg/L IA de EM; (C) sin aditivo; (D) control abiótico

(1) estándar interno Bromo tetradecano; (2) estándar interno esqualeno

### Recuperación de hidrocarburo a partir de lodos de fondos de tanques

La tabla 5 relaciona la viscosidad de las emulsiones obtenidas con el lodo Araguañey.

Se observa que con una dosis de 0,125 g/L fue posible obtener emulsiones de viscosidad similar a la obtenida con dos productos comerciales, referenciados como K y P, de los cuales fue necesario utilizar mayores dosis para formar las emulsiones. Después de 24 horas de decantación se obtuvo, para el caso del biosurfactante, una fase aceitosa con 6% de BSW, una fase acuosa con 13% de hidrocarburo y una fase sólida con 11,5% de hidrocarburo. Las emulsiones obtenidas con los productos comerciales presentaron alta estabilidad, por lo cual, aun después de 48 horas no fue posible obtener una fase de aceite diferenciada. En esta evaluación el biosurfactante permitió recuperar un 40% de HC, cuya característica de BSW podría ser mejorada, incorporando en el proceso una fase de pulimiento.

### Control de corrosión

En la figura 4 se indican las velocidades de corrosión en milésimas de pulgada por año (mpy), estimadas mediante curvas TAFEL, con electrodos de acero carbón sometidos a la acción corrosiva, descrita previamente. Se observa que el biosurfactante inhibe la corrosión causada por CO<sub>2</sub>, a las dos temperaturas evaluadas. Su efectividad es mucho mayor que la del aditivo comercial. Nótese que el producto químico prácticamente no ejerció ningún efecto a la temperatura de 60°C, en tanto que el biosurfactante mantuvo su comportamiento inhibitorio, indicativo de su estabilidad térmica.

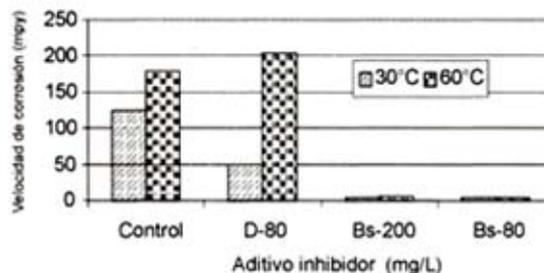


Figura 4. Valoración de inhibición de corrosión (TAFEL).

### CONCLUSIONES

La inestabilidad del microorganismo para producir el biosurfactante fue superada mediante el establecimiento de ciertas condiciones de activación del microorganismo para la preparación del inoculo.

La limitación por nitrógeno induce la producción del biosurfactante tipo ramnolípido, y la velocidad de producción de este último es proporcional a la densidad bacteriana utilizada, la cual se pudo manejar mediante cultivos por lote y lote alimentado.

Es conocido el hecho de que en la formulación de inhibidores de corrosión se han incluido tensoactivos; sin embargo, para aditivos tipo ramnolípido no se ha reportado de manera específica su eficacia en control de corrosión. En este caso se demostró su acción protectora contra la corrosión causada por gas carbónico.

En este estudio se demostró que el biosurfactante incrementó la biodegradación de hidrocarburo en medio salino cuando se usó el consorcio bacteriano MPD-

Tabla 5. Viscosidad a 25°C (cP).

Dosis (g/L)	TENSOACTIVOS					
	K		P		Biosurfactante	
	Viscosidad (Cp)	Estabilidad	Viscosidad (Cp)	Estabilidad	Viscosidad (Cp)	Estabilidad
1	92	B	98	B	82	B
0,5	96	B	105	R	95	B
0,25	103	R	118	M	110	B
0,125	140	M	NA	NA	108	B

M, y fue más eficiente que el tensoactivo químico. Dado su origen natural, este aditivo mejora la biodisponibilidad del sustrato hidrocarbonado, sin inhibir los procesos metabólicos que tienen lugar.

El biosurfactante tiene aplicaciones en las cuales presenta un desempeño sobresaliente en comparación con los productos de origen químico. Si bien en costos aún no es competitivo, en casos donde resulta imprescindible utilizar productos inocuos al medio ambiente es importante realizar pruebas en campo en cuya evaluación se incluyan elementos que permitan cuantificar su beneficio ecológico.

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Colombiano del Petróleo por financiar este proyecto encaminado a desarrollar tecnologías de aplicación en nuestro país.

Un reconocimiento especial a Rafael Gómez y a Sandra Álvarez por su invaluable colaboración en la realización de este trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

- APHA, A., WEEF. 1992. In *Standard methods for the examination of water and waste water* (ed. APHA), pp. 4-75 a 4-80.
- Banat, I. M. 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation. *Bioresource Technology* 51: 1-12.
- Bognolo, G. 1999. Biosurfactants as emulsified agents for hydrocarbons. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 152: 41-52.
- Díaz, M. P. 1991. Estudio preliminar de la aplicación de biosurfactantes en el manejo de crudos pesados. M.Sc. thesis, Universidad Industrial de Santander.
- Díaz, M. P. 2000. Extremely-halotolerant bacterial consortia for the biodegradation of hydrocarbons in contaminated saline environments using free and immobilised cell systems. Ph.D thesis, Heriot-Watt University.
- Díaz, M. P, Grigson, S. J. W. & Burgess, J. G. 2000. Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. *Marine Biotechnology* 2: 522-532.
- Dubos, B., Caliman, J. P, Cerrado, F. & Quencez, P. 2000. Los oleoquímicos en la industria de surfactantes. *Palmas*, 21.
- Madigan, M., Martinko, J. M. & Parker, J. 1997. *Biology of Microorganisms*, eight edition. Prentice-Hall, Inc., USA.
- Mendoza, L. M. 2000. *Rehabilitación y mantenimiento de tanques de la VIT*. Instituto Colombiano del Petróleo, Bucaramanga.
- Pimienta, A. L., Díaz, M. P, Carvajal, F. G. & Grosso, J. L. 1997. Production of biosurfactants (rhamnolipids) by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Colombian sludges. *Ciencia, Tecnología y Futuro* 1: 95-108.
- Rosero, G., Dugarte, F., Díaz, M. P, Pimienta, A. & Moreno, N. 2001. *Producción de Biosurfactantes*. Instituto Colombiano del Petróleo, Piedecuesta.
- Rosero, N. G., Pimienta, A. L., Dugarte, F. & Carvajal, F. 1998. *Producción de biosurfactantes*. Instituto Colombiano del Petróleo, Bucaramanga.
- Whistler, R. & Wolfrom, M. 1962. *Methods in carbohydrate chemistry*, New York.