



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Obtención de un biosurfactante para el recobro mejorado de petróleo

Maricelly Martínez Aguilar

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Escuela de Procesos y Energía

Medellín, Colombia

2014

Obtención de un biosurfactante para el recobro mejorado de petróleo

Maricelly Martínez Aguilar

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ingeniería de Petróleos

Director:

Título Ph.D. en Ingeniería Pedro Nel Benjumea Hernández

Línea de Investigación:

Recobro Mejorado de Petróleo

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación de Yacimientos de Hidrocarburos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Minas, Escuela de Procesos y Energía

Medellín, Colombia

2014

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida y darme esta gran oportunidad de demostrar mis conocimientos y habilidades como Ingeniera y como persona.

A mis familiares: A mi padre Jorge Isaac Martínez por darme la oportunidad de estudiar y por confiar en mí cada día, por ser el mejor padre del mundo y que gracias a su esfuerzo soy lo que soy en este momento.

A mi madre Luz Myriam Aguilar por ser una hermosa mamá y darme todos los valores que se necesitan para ser una gran persona. A mi abuela Ana Hilda Robles por ser una mujer luchadora y emprendedora por enseñarme tantos valores y ayudarme en los momentos más difíciles.

A mi segunda madre Aleyda Aguilar por ser la persona incondicional en todos los días de mi vida por ser mi gran apoyo y amiga. A mi hermana María Jose Prado por brindarme el apoyo y la motivación de salir adelante con este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A Pedro Benjumea por ser una gran persona por sus valores y sus motivaciones, por brindarme la oportunidad de demostrar las ganas de trabajar y de sacar adelante el proyecto, también a Farid Cortés por su confianza y por brindarme su apoyo en todo momento.

A Karina Motato y al Instituto de Productos Lácteos de Asturias por la colaboración en cuanto a la identificación de las cepas ácido lácticas, así mismo por brindarme la confianza por la utilización de sus bacterias.

Al Doctor Marcos Tótola por haberme brindado la posibilidad de compartir con su grupo de Investigación y compartir todos sus conocimientos en la Universidad Federal de Vicosá en Brasil.

A Pericles Fernandes por abrirme las puertas, por su ayuda, por brindarme su amistad y colaboración. A Marcela Camacho y Laura Pantoja por abrirme las puertas y ser mi gran apoyo en Vicosá.

A mis amigos Cesar Augusto Mora, Juan David Aristizabal, Camilo Franco, Luz Arley Espinosa, David Angel por brindarme su amistad y su apoyo en los momentos difíciles.

A Johana Betancur, Veronica y Maria Isabel Gaviria por su confianza al brindarme las cepas ácido lácticas y dedicación en Tecnoparque. A José Daniel Arenas y Angélica Rosario por el apoyo en la realización de los experimentos.

A Ana Cecilia Caro por ayudarme en realizar los análisis de HPLC en el laboratorio del SENA de Petregal por su carisma y disposición.

A Sergio Lopera por haberme brindado las instalaciones del Laboratorio de Yacimientos para realizar los experimentos. A Luisana Cardona, Yuber Rodriguez, Maria del Mar Posada y Andrés Varon por su amabilidad y disposición con las pruebas del laboratorio de Petroleos.

A Alexander Correa por su colaboración en el diseño de experimentos y por brindarme su apoyo, además de su carisma y disposición.

A Tecnoparque y SENA de Pedregal por brindarme las instalaciones y los recursos necesarios para realizar el proyecto.

Al grupo de Investigación de yacimientos de Hidrocarburos de la Universidad Nacional de Colombia por brindarme el apoyo económico y la utilización de sus instalaciones.

Resumen

En este proyecto de investigación se obtiene un biosurfactante y se evalúa su uso en recobro mejorado de petróleo. El biosurfactante se produjo a partir de la fermentación de biomásas residuales utilizando bacterias de *Lactobacillus fermentum*, aisladas de suero láctico de diferentes regiones de Colombia. A partir de un estudio preliminar, en el cual se examinaron 18 cepas para detectar bacterias productoras de biosurfactante, se seleccionaron tres de estos microorganismos (LAC05, LAC10 y LAC12) para llevar a cabo el proceso de obtención del biosurfactante. Los experimentos se realizaron a 37°C, la cual fue seleccionada entre cinco temperaturas (31, 34, 37 y 40°C), como la óptima para crecimiento de las bacterias ácido lácticas.

Para optimizar la producción del biosurfactante se utilizó un esquema factorial (3x2x4) aleatorizado con tres replicas correspondiente a tres cepas microbianas, dos fuentes de carbón (melaza y suero) y cuatro formulaciones de medios de cultivo, en los cuales se variaron las concentraciones de nitrógeno, hierro y fosforo. La tensión superficial de los medios de cultivo se seleccionó como variable respuesta del diseño de experimentos. La combinación de variables que permitió minimizar la tensión superficial del medio de cultivo se obtuvo con la bacteria LAC12, la melaza y el medio M2. Al biosurfactante obtenido se le determinó su concentración crítica micelar y su balance lipofílico-hidrofílico (HLB). Adicionalmente, el biosurfactante se caracterizó por medio de Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC: High Performance Liquid Chromatography).

La factibilidad técnica del biosurfactante para ser usado en procesos de recobro mejorado de petróleo se evaluó mediante el montaje de una prueba de desplazamiento usando un empaque de arena. El biosurfactante obtenido demostró ser efectivo en el recobro de petróleo ya que aumentó en un 18% la producción de petróleo en comparación con el petróleo recuperado con una inyección convencional de agua.

Palabras Clave: Recobro mejorado, Bacterias ácido lácticas, Fermentación, Biomasa residual, Biosurfactante.

Abstract

In this research project, a biosurfactant is produced and its use in enhanced oil recovery is evaluated. The biosurfactant was produced from the fermentation of residual biomasses using *Lactobacillus fermentum* bacteria, isolated from whey coming from different regions of Colombia. From a preliminary study, in which 19 strains were examined in order to detect biosurfactant producing bacteria, three of these microorganisms (LAC05, LAC10 y LAC12) were selected for carrying out the biosurfactant production process. All experiments were performed at 37°C. This temperature was selected among five values (31, 34, 37 y 40°C), as the optimum temperature for maximizing the growing of the lactic acid bacteria.

Biosurfactant production was optimized by means of a (3x2x4) randomized factorial scheme with three replicates. The factors taken into account were three strains, two carbon sources (molasses and whey) and four culture media formulations in which the concentrations of iron, nitrogen and phosphorus were varied. Superficial tension of the culture media was selected as response variable. Minimization of the superficial tension of the culture media was achieved when the LAC12 bacterium, the molasses and the culture medium M2 were combined.

Key biosurfactante properties such as its Critical Micelle Concentration (CMC) and its Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) were determined. Additionally, the biosurfactante was characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).

The technical feasibility of application of the biosurfactant in enhanced oil recovery processes was evaluated by means of a displacement test using a sand pack. Biosurfactant was effective in enhanced oil recovery due to is increasing recovery factor in 18%.

Keywords: Enhanced oil recovery, acid lactic bacteria, Fermentation, Residual Biomass, Biosurfactant,

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Abstract	X
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	17
Introducción	21
1. Generalidades	23
1.1 Objetivos de la Investigación	23
1.1.1 Objetivo General.....	23
1.1.2 Objetivos Específicos.....	23
1.2 Hipótesis	24
1.3 Justificación.....	24
2. Marco Teórico y Estado del Arte	27
2.1 Biosurfactantes.....	27
2.1.1 Clasificación de acuerdo con su naturaleza química.....	28
- Lípidos:	28
- Hidratos de carbono:.....	28
- Aminoácidos:	29
- Glucolípidos:	29
- Lipopéptidos:	29
2.1.2 Clasificación de acuerdo con su peso molecular.....	30
- Bajo Peso molecular:	30
- Alto peso molecular:	30
2.1.3 Clasificación de acuerdo a su carga iónica	33
2.1.4 Producción de Biosurfactantes	33
2.1.5 Detección y cuantificación de los Biosurfactantes.....	34
2.1.6 Propiedades fisicoquímicas	35
- Concentración Crítica Micelar (CMC)	35
- Balance hidrofílico lipofílico (HLB)	36

2.2	Métodos de Recobro Mejorado de Petróleo.....	36
2.2.1	Clasificación.....	37
2.2.2	Inyección de surfactantes.....	39
2.2.3	Evaluación del Proceso de Recobro Mejorado de Petróleo.....	40
3.	Materiales y Métodos	41
3.1	Identificación y detección de las Bacterias.....	41
3.2	Optimización de la producción de Biosurfactantes.....	43
3.3	Producción en Biorreactor	44
3.4	Caracterización del Biosurfactante.....	45
3.4.1	Determinación de HLB [88] [103]	45
3.4.2	Análisis de tamaño de gota	46
3.4.3	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	46
3.4.4	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia o High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	46
3.5	Prueba de desplazamiento (inyección de biosurfactante)	46
3.5.1	Propiedades de los fluidos y de la arena	47
3.5.2	Prueba de Tensión Interfacial.....	48
3.5.3	Prueba de Compatibilidad	48
3.5.4	Protocolo de la Prueba de Desplazamiento.....	49
4.	Resultados y Discusión	51
4.1	Identificación y detección de las bacterias ácido lácticas	51
4.2	Optimización de la producción de Biosurfactantes.....	54
4.3	Caracterización del Biosurfactante.....	56
4.3.1	Determinación de HLB	56
4.3.2	Análisis de tamaño de gota	57
4.3.3	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	59
4.3.4	Resultados de la Cromatografía líquida de Alta eficacia (HPLC)	61
4.4	Prueba de inyección de Biosurfactante	63
4.4.1	Tensión Interfacial [117].....	63
4.4.2	Prueba de Compatibilidad	64
4.4.3	Prueba de Desplazamiento	66
5.	Conclusiones.....	69
6.	Bibliografía	73
A.	Anexo: Resultados Tensión Superficial.	85
B.	Anexo: Dilución Crítica Micelar (DMC)	89
C.	Anexo: Tamaños de Gota	97
D.	Anexo: Prueba de compatibilidad	101

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Estructura química de un Rhamnolípido producido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [22].....	29
Figura 2. Estructura química de la surfactina producida por <i>Bacillus subtilis</i> [16]	30
Figura 3. Representación gráfica de la concentración crítica micelar (CMC)	35
Figura 4. Clasificación de los métodos de Recobro mejorado de Petróleo [90].....	38
Figura 5. Esquema de la inyección de surfactante para el recobro de petróleo.	39
Figura 6. Esquema de recuperación de petróleo en EOR.....	40
Figura 7. Biorreactor de 14 Litros marca New Brunswick.	45
Figura 8. Proporciones de mezcla surfactante diluido/crudo utilizados para la prueba de compatibilidad.	49
Figura 9. Esquema del montaje de prueba de desplazamiento con biosurfactante.....	50
Figura 10. Curvas de crecimiento para las bacterias ácido lácticas a) LAC05, b) LAC10 y c) LAC 12 a diferentes temperaturas: (Δ) 31°C, (\circ) 34°C, (\square) 37°C y (x) 40°C.	53
Figura 11. Gráfica de efectos principales.....	54
Figura 12. <i>Tamaño de gotas promedio en micras para las diferentes emulsiones. Los valores con (\square) representan el tiempo inicial y (\diamond) representan el tiempo final.</i>	58
Figura 13. Diagrama del tamaño de gota con tolueno, agua y biotratamiento a 25°C.....	59
Figura 14. Espectro FTIR del biosurfactante obtenido de las células de la cepa LAC12 de <i>Lactobacillus fermentum</i> en medio M2 a 37°C y 200 rpm.	60
Figura 15. Estimativo de la estructura molecular del biosurfactantes producidos por especies <i>Bacillus spp</i> , <i>Lactobacillus spp</i> [116].	60
Figura 16. Cromatograma de HPLC para Biosurfactante convencional (Sigma 98% pureza) a 100 ppm.	61
Figura 17. Curva de calibración para el biosurfactante convencional la cual es función del Área total y de la concentración de la muestra.	62
Figura 18. Cromatograma de HPLC para Biosurfactante a partir de <i>Lactobacillus fermentum</i> obtenido a 37°C, 200 rpm, utilizando como fuente de carbono Melaza durante tres días.	62
Figura 19. Resultados de Prueba de tensión interfacial entre Biosurfactante y crudo.....	63
Figura 20. Resultados obtenidos en el tiempo inicial y tiempo final para la prueba de compatibilidad con una concentración de biosurfactante de 500 ppm	65

Figura 21. % de recobro de petróleo en la primera etapa de inyección de agua y en la segunda etapa de inyección de biosurfactante.....	66
Figura 22. Tensión superficial del medio de cultivo sin células M1 suplementado con melaza para a) la bacteria LAC05, b) LAC10 y c) LAC12 en función de la dilución de los medios de cultivo, fermentados por 3 días, 37°C y 200 rpm.	89
Figura 23. Tensión superficial del medio de cultivo sin células M2 suplementado con melaza para a) la bacteria LAC05, b) LAC10 y c) LAC12 en función de la dilución de los medios de cultivo, fermentados por 3 días, 37°C y 200 rpm.	90
Figura 24. Tensión superficial del medio de cultivo sin células M3 suplementado con melaza para a) la bacteria LAC05, b) LAC10 y c) LAC12 en función de la dilución de los medios de cultivo, fermentados por 3 días, 37°C y 200 rpm.	91
Figura 25. Tensión superficial del medio de cultivo sin células M4 suplementado con melaza para a) la bacteria LAC05, b) LAC10 y c) LAC12 en función de la dilución de los medios de cultivo, fermentados por 3 días, 37°C y 200 rpm.	92
Figura 26. Tensión superficial del medio de cultivo sin células M1 suplementado con suero para a) la bacteria LAC05, b) LAC10 y c) LAC12 en función de la dilución de los medios de cultivo, fermentados por 3 días, 37°C y 200 rpm.	93
Figura 27. Tensión superficial del medio de cultivo sin células M2 suplementado con suero para a) la bacteria LAC05, b) LAC10 y c) LAC12 en función de la dilución de los medios de cultivo, fermentados por 3 días, 37°C y 200 rpm.	94
Figura 28. Tensión superficial del medio de cultivo sin células M3 suplementado con suero para a) la bacteria LAC05, b) LAC10 y c) LAC12 en función de la dilución de los medios de cultivo, fermentados por 3 días, 37°C y 200 rpm.	95
Figura 29. Tensión superficial del medio de cultivo sin células M4 suplementado con suero para a) la bacteria LAC05, b) LAC10 y c) LAC12 en función de la dilución de los medios de cultivo, fermentados por 3 días, 37°C y 200 rpm.	96
Figura 30. Resultados obtenidos en el tiempo inicial y tiempo final para la prueba de compatibilidad con una concentración de biosurfactante de 900 ppm.....	102
Figura 31. Resultados obtenidos en el tiempo inicial y tiempo final para la prueba de compatibilidad con una concentración de biosurfactante de 90 ppm.....	103
Figura 32. Resultados obtenidos en el tiempo inicial y tiempo final para la prueba de compatibilidad con una concentración de biosurfactante de 10 ppm.....	104

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Surfactantes de bajo peso molecular.....	31
Tabla 2. Surfactantes de alto peso molecular.....	32
Tabla 3. Características de emulsiones de acuerdo a su número de HLB.....	36
Tabla 4. Correlaciones de HLB y los respectivos usos de los agentes emulsificantes.	36
Tabla 5. Composición de Medio MRS	41
Tabla 6. Composición de los diferentes medios para la optimización de la producción de biosurfactantes.....	44
Tabla 7. Propiedades de los fluidos.....	47
Tabla 8. Propiedades del empaque de arena Berea.....	48
Tabla 9. Screening potencial de producción de biosurfactantes de las bacterias ácido lácticas.....	52
Tabla 10. Análisis de Varianza entre los factores.....	54
Tabla 11. Parámetros para el modelo cubico especial para el tamaño de gota.....	59
Tabla 12. Algunas propiedades de diferentes biosurfactantes obtenidos a partir de microorganismos [124].....	64
Tabla 13. Resultados de Prueba de compatibilidad para la concentración de biosurfactante.....	65
Tabla 14. Valores de tensión superficial de los sobrenadantes al utilizar melaza como medio de cultivo, inoculados con tres bacterias (LAC05, LAC10 y LAC 12) en respuesta a la variación de la formulación del medio de cultivo y fuente de carbono al 1%, después de 3 días a 37°C y 200 rpm.....	85
Tabla 15. Valores de tensión superficial de los sobrenadantes al utilizar suero como medio de cultivo, inoculados con tres bacterias (LAC05, LAC10 y LAC 12) en respuesta a la variación de la formulación del medio de cultivo y fuente de carbono al 1%, después de 3 días a 37°C y 200 rpm.....	86
Tabla 16. Tamaño de Gota de emulsiones a diferentes tamaños de gota al tiempo inicial.....	97
Tabla 17. Tamaño de Gota de emulsiones a diferentes tamaños de gota al tiempo final.....	99
Tabla 18. Resultados de Prueba de compatibilidad para la concentración de biosurfactante e 900 ppm.....	101
Tabla 19. Resultados de Prueba de compatibilidad para la concentración de biosurfactante de 90 ppm.....	103
Tabla 20. Resultados de Prueba de compatibilidad para la concentración de biosurfactante de 10 ppm.....	104

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>OW</i>	Oil in Water
<i>W/O</i>	Water in Oil
<i>Sor</i>	Saturation oil residual
<i>EOR</i>	Enhanced Oil recovery
<i>SAGD</i>	Steam assisted gravity drainage
<i>ASP</i>	Alkali-Surfactant-Polymer flooding
<i>MRS</i>	Man Rogosa Sharpe
<i>HLB</i>	Balance Hidrofílico-Lipofílico
<i>PN</i>	Punto de Nube
<i>CMC</i>	Concentración micelar crítica
<i>BATH</i>	Bacterial Adhesion to Hydrocarbon
<i>TLC</i>	Thin Layer Chromatography
<i>HPLC</i>	High performance liquid chromatography
<i>FTIR</i>	Fourier transformed infrared spectroscopy
<i>NCBI</i>	National center for Biotechnology Information
<i>BLAST</i>	Basic Local Alignment Search Tool
<i>PBS</i>	Phosphate buffered saline
<i>EE</i>	Estabilidad de la emulsión
<i>FO</i>	Fase Aceite
<i>FT</i>	Fase de Tratamiento
<i>EM</i>	Emulsión
<i>ES</i>	Espuma

Introducción

El petróleo es la fuente de energía primaria más importante a nivel mundial y gracias a este recurso natural y no renovable ha sido posible mejorar la calidad de vida de las sociedades modernas. Por condiciones técnicas y económicas es ampliamente conocido que un gran porcentaje del petróleo originalmente en el sitio (reservas recuperables) permanece en el yacimiento después de utilizar los métodos convencionales de recobro. Lo que normalmente se logra en los mejores escenarios es recuperar un porcentaje máximo de petróleo del 40-45% en las etapas de recuperación primaria (uso de la energía natural del yacimiento) y secundaria (inyección de agua). El porcentaje restante se queda en el yacimiento, razón por la cual se hace necesario aplicar tecnologías de recobro mejorado para incrementar el factor de recobro.

Este proyecto está enfocado a producir un biosurfactante a partir de tecnologías limpias. La propuesta de investigación e innovación busca mejorar la viabilidad económica de los proyectos de recobro químico mediante la producción de tratamientos de más bajo costo. Se busca disminuir los costos de producción a partir del uso de biomásas residuales, las cuales van a servir como fuente de carbono (sustrato) de las bacterias productoras del biosurfactante.

En Colombia, y prácticamente en toda América Latina, con algunas excepciones en Brasil, la mayoría de los compuestos utilizados en los tratamientos de recobro químico normalmente se importan de Estados Unidos y Europa. En muchas ocasiones se usan compuestos de muy alta pureza, prácticamente de grado alimenticio, lo cual contribuye a elevar sus costos. La propuesta es evaluar la producción de biosurfactantes a partir de materias primas de amplia disponibilidad local como es el caso de biomásas residuales obtenidas en el beneficio de productos agrícolas como la caña de azúcar. A partir del biosurfactante obtenido es posible diseñar diferentes tratamientos para tratar de incrementar el factor de recobro de petróleo. Dichos tratamientos se deben evaluar en laboratorio mediante protocolos especialmente diseñados para reproducir al máximo las condiciones de los yacimientos. Se deben usar medios porosos con longitudes y características petrofísicas adecuadas, así como fluidos representativos.

1. Generalidades

En este capítulo se presentan los objetivos, la hipótesis y la justificación del trabajo investigativo.

1.1 Objetivos de la Investigación

1.1.1 Objetivo General

Obtener un biosurfactante y evaluar la viabilidad técnica de su uso en procesos de recobro mejorado de petróleo.

1.1.2 Objetivos Específicos

- **Objetivo específico No. 1:** Evaluar la factibilidad de producción de biosurfactantes a partir de bacterias ácidos lácticas nativas.
- **Objetivo específico No. 2:** Determinar las condiciones óptimas para la producción de un biosurfactante a escala de laboratorio a partir de biomasas residuales (melaza y suero) utilizando bacterias de *Lactobacillus fermentum*.
- **Objetivo específico No. 3.** Evaluar la viabilidad técnica de la utilización del biosurfactante en procesos de recobro mejorado de petróleo.

1.2 Hipótesis

Es posible obtener un biosurfactante a partir de la fermentación de biomásas residuales, usando bacterias ácido lácticas aisladas de suero láctico, para ser utilizado en procesos de recobro mejorado de petróleo.

1.3 Justificación

El petróleo es la fuente de energía más importante a nivel mundial y su disponibilidad le ha permitido a muchos países desarrollar altos estándares de vida. Teniendo en cuenta que actualmente los combustibles fósiles abastecen más del 85% de la energía mundial y que gran parte de las reservas de petróleo identificadas permanecen en el yacimiento como petróleo residual, se hace cada vez más importante el desarrollo de procesos de recobro mejorado de petróleo que sean técnica, económica y ambientalmente viables.

El recobro mejorado o *enhanced oil recovery* (EOR), se aplica ya sea después de la recuperación primaria o después de la recuperación secundaria con el objetivo de recuperar porcentajes significativos del denominado petróleo residual. El objetivo de los métodos de recobro mejorado, tanto en crudos pesados como en livianos, es reducir la saturación de petróleo en el yacimiento hasta valores considerablemente más bajos que el valor de la saturación residual de petróleo (S_{or}), o sea aquella saturación de petróleo remanente en el yacimiento después de la recuperación primaria y secundaria.

Este proyecto está enfocado a producir un biosurfactante a partir de tecnologías limpias, como son las rutas biotecnológicas, que se pueda usar para incrementar el factor de recobro de yacimientos de petróleo. La propuesta de investigación e innovación busca mejorar la viabilidad económica de los proyectos de recobro químico mediante la producción de tratamientos de más bajo costo. Se busca disminuir los costos de producción a partir del uso de biomásas residuales, las cuales se utilizarán como la fuente de carbono (sustrato) de las bacterias productoras del biosurfactante. Dichos residuos (biomasa residual) son de fácil consecución en Colombia y por tener un contenido alto de sacarosa (melaza) y lactosa (suero) constituyen un medio adecuado para el crecimiento de cepas productoras de biosurfactantes

A partir del biosurfactante obtenido se busca diseñar tratamientos para tratar de incrementar el factor de recobro de petróleo. Dichos tratamientos se deben evaluar en laboratorio mediante protocolos especialmente diseñados para reproducir al máximo las condiciones de los yacimientos de petróleo. Se deben usar medios porosos con longitudes y características petrofísicas adecuadas, así como fluidos representativos.

En Colombia, y prácticamente en toda América Latina, con algunas excepciones en Brasil, la mayoría de los compuestos utilizados en los tratamientos de recobro químico normalmente se importan de Estados Unidos y Europa. Una innovación, como la que se propone en este trabajo investigativo, podría contribuir al desarrollo de una industria nacional para el suministro de compuestos químicos a la industria petrolera, y a que se produzcan más barriles de petróleo en un contexto de producción más limpia.

2. Marco Teórico y Estado del Arte

En este capítulo se presentan fundamentos teóricos relacionados con el concepto de biosurfactante, su obtención, caracterización y utilización. También se hace referencia a los procesos de recobro mejorado de petróleo, enfatizando en el denominado recobro químico y en la inyección de surfactantes.

2.1 Biosurfactantes

Los surfactantes son sustancias complejas de naturaleza anfílica que pueden disminuir la tensión superficial entre una fase dispersa y una continua [1]. La palabra surfactante es una contracción de las palabras inglesas "*surface-active substance*", las cuales indican que son sustancias con una fuerte tendencia a migrar hacia superficies o interfases. Cuando a una solución se le añade surfactante, éste empieza por adsorberse a las interfases disponibles, luego su concentración en forma mono-molecular aumenta hasta que se forman las primeras micelas.

Los surfactantes poseen una gran variedad de aplicaciones industriales como emulsificantes, desemulsificantes, agentes humectantes, formadores de espuma, detergentes, etc. Su utilización en biorremediación de suelos y recobro mejorado de petróleo cada vez gana más importancia [2] [3] [4].

Debido a la demanda creciente de surfactantes por diferentes industrias, se ha aumentado considerablemente su producción mediante síntesis química. La necesidad de obtener productos amigables con el medio ambiente y los rápidos avances en la biotecnología, en cuanto a la producción de metabolitos a gran escala, han impulsado la búsqueda de alternativas para disminuir la contaminación del medio ambiente generada a partir de la producción masiva de surfactantes químicos. En este contexto, el término biosurfactante se ha venido utilizando para describir sustancias anfipáticas producidas por diferentes tipos de microorganismos.

A pesar del inmenso potencial de los biosurfactantes, su uso sigue siendo limitado, debido a su alto costo de producción y los bajos rendimientos en los procesos de producción. Sin embargo el uso de sustratos más económicos, métodos nuevos de procesamiento hacen más viable la producción de biosurfactantes [5] [6] [7]. Entre las materias primas más económicas usadas para la producción de biosurfactante se encuentran aceites de origen vegetal, sustancias de almidón, queso, suero de leche y biomásas residuales [8] [9].

Los biosurfactantes se pueden clasificar de acuerdo a tres criterios: naturaleza química, peso molecular y carga iónica de la parte activa de la molécula.

2.1.1 Clasificación de acuerdo con su naturaleza química

Las membranas celulares están compuestas por compuestos anfipáticos, los cuales están ensamblados entre una estructura bicapa con las moléculas hidrofílicas orientadas hacia la parte externa de la membrana y las moléculas hidrofóbicas en la parte interna. La membrana contiene materiales como proteínas, polisacáridos y colesterol pero la estructura primaria debe su forma a la agregación de sustancias tensoactivas [10]. Los biosurfactantes están conformados por los siguientes compuestos:

- Lípidos:

Se utilizan para denotar un grupo químicamente heterogéneo de sustancias que son insolubles en agua pero solubles en disolventes como cloroformo, hidrocarburos o alcoholes. Los lípidos se clasifican en tres grupos principales: Lípidos simples, los cuales incluyen grasas saturadas, aceites insaturados y en su molécula solo poseen carbono, hidrógeno y oxígeno. Los lípidos complejos son los fosfolípidos o fosfoglicéridos, de estructura similar a las grasas, pero conteniendo fósforo y nitrógeno. Los lípidos derivados incluyen los lípidos como los esteroides, carotenoides, prostablandinas y vitaminas liposolubles [11].

- Hidratos de carbono:

Son aldehídos o cetonas con múltiples grupos hidroxilo. Constituyen la mayor parte de la materia orgánica de la tierra debido a sus funciones importantes en todas las formas de vida. Los carbohidratos sirven como almacén de energía, combustible y metabolitos intermediarios. Los azúcares como la ribosa y la desoxirribosa forman parte del ARN y DNA. Carbohidratos como los polisacáridos son elementos estructurales en las paredes celulares de bacterias y plantas. Los carbohidratos se constituyen a base de monosacáridos, moléculas pequeñas que contienen de tres a nueve átomos de carbono y varían en tamaño y en la configuración estereoquímica de uno o más centros asimétricos [12].

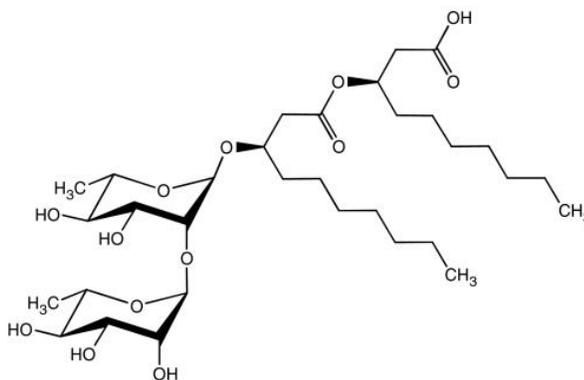
- Aminoácidos:

Son moléculas que poseen un grupo amino $-NH_2$ y un grupo carboxilo $-COOH$ unidos al mismo átomo de carbono. Los aminoácidos se encuentran habitualmente en las proteínas. Los aminoácidos se diferencian entre sí por el grupo R. Las características estructurales y químicas de los grupos R son las que le adjudican diferentes propiedades a cada uno de los aminoácidos y, por lo tanto, determinan su función dentro de una proteína ya constituida [13].

- Glucolípidos:

Son componentes importantes de las membranas celulares los cuales están unidos a lípidos en el exterior de la membrana plasmática y en el interior de algunos organelos [14]. Consisten en sacáridos como la glucosa, manosa, galactosa, ácido glucurónico, ramnosa y sulfato de galactosa combinados con una cadena alifática o ácidos hidroxialifáticos. Los glucolípidos más conocidos son los ramnolípidos, trehalípidos y soforolípidos [15]. La estructura química de un Rhamnolípidido se muestra en la siguiente figura:

Figura 1. Estructura química de un Rhamnolípidido producido por *Pseudomonas aeruginosa* [16].



- Lipopéptidos:

Son moléculas que consisten en una porción de ácido graso unido a una cadena de péptidos. Los lipopéptidos exhiben diversas actividades biológicas como: actividad superficial, anti-celulares, anti-enzimática. Los géneros bacterianos *Bacillus* (Gram positiva) (Figura 2) y *Pseudomonas* (Gram Negativa) han recibido la mayor atención

Tabla 1. Surfactantes de bajo peso molecular.

Surfactantes	Microorganismo productor	Referencia
		Rendell et al. (1990) [19]
Rhamnolipido	<i>P. aeruginosa</i>	Sim et al. (1997) [20] Lang and Willbrandt (1999) [21]
	<i>Pseudomonas</i> spp.	Arino et al. (1996) [22] Parra et al. (1989) [23]
Lipidos de trehalosa	<i>R. erythropolis</i>	Ristau and Wagner (1983) [24] Kim et al. (1990) [25] Lang and Philip (1998) [26]
	<i>Arthrobacter</i> sp.	Li et al. (1984) [27]
	<i>Mycobacterium</i> sp.	Cooper et al. (1989) [28] Inoue and Itoh (1982) [29]
Soforolipidos	<i>T. bombicola</i>	Davila et al (1997) [30]
Lipidos de glucosa	<i>A.borkumensis</i>	Yakimov et al. (1997) [31] Abraham et al. (1998) [32] Cutler and Light (1979) [33]
	<i>C. bogoriensis</i>	Neu and Poralla (1990) [34]
Viscosin	<i>P. fluorescens</i>	
Surfactin	<i>B. subtilis</i>	Arima et al. (1968) [35]
	<i>B. velezensis</i>	Wei and Chu (1998) [36]

Tabla 2. Surfactantes de alto peso molecular.

Surfactante	Microorganismo productor	Referencia
RAG-1 emulsan	<i>A. calcoaceticus</i> RAG-1	Rosenberg et al. (1979a) [37]
BD4 emulsan	<i>A. calcoaceticus</i> BD413	Kaplan and Rosenberg (1982) [38]
Alasan	<i>A. radioresistens</i> KA53	Navon-Venezia et al. (1995) [39]
Glycoprotein	<i>Antartic bacterium</i>	Gutierrez et al. (2007) [40]
Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i> A2	Rosenberg (1993) [41]
Mannan-lipid-protein	<i>C. tropicalis</i>	Kaeppli et al. (1984) [42]
Liposan	<i>C. lipolytica</i>	Cirigliano and Carman (1984) [43]
Emulsan 378	<i>P. fluorescens</i>	Persson et al. (1988) [44]
Glycoprotein	<i>Myroides</i> sp.	Maneerat et al. (2006) [45]
Protein complex	<i>M. thermoautotrophium</i>	De Acevedo and McInerney (1996) [46]
Insecticide emulsifier	<i>P. tralucida</i>	Appaiah and Karanth (1991) [47]
Thermophilic emulsifier	<i>B. stearothermophilus</i>	Gunjar et al. (1995) [48]
Acetylheteropoly saccharide	<i>S. paucimobilis</i>	Ashtaputre and Shah (1995) [49]
PM-factor P. marginalis Burd and Ward (1996)	<i>P. marginalis</i>	Burd and Ward (1996) [50]
Extracellular polysaccharide	<i>Pseudomonas putida</i> ML2	Bonilla et al. (2005) [51]

2.1.3 Clasificación de acuerdo a su carga iónica

Los surfactantes en general se clasifican de acuerdo con su carga iónica en las siguientes categorías [52]:

- **Agente aniónico:** Contiene moléculas cargadas negativamente, con grupos como los carboxilatos, surfonatos, sulfato o fosfato, combinado con una cadena hidrocarbonada hidrófoba. Si la cadena es corta son hidrosolubles y actúan en sistemas no acuosos.
- **Agente Catiónico:** Agente con moléculas cargadas positivamente, con grupos como los amonios ternarios o cuaternarios, están compuestos por una molécula lipofílica y otra hidrofílica,
- **Agentes no iónicos:** Agentes neutros con grupos como alcoholes, azúcares, o ácidos carboxílicos. No se disocian en iones hidratados en medio acuoso.
- **Agentes iónicos:** Son agentes que se ionizan cuando se encuentran en solución, el grupo hidrófobo se carga positivamente y pueden llegar a proporcionar ciertas propiedades como la humectación, emulsificación y formación de espuma [53].
- **Agentes Zwitteriónicos:** Son aquellas sustancias en donde la molécula puede contener cargas tanto positivas y negativas. Estos agentes pueden llegar a mostrar sensibilidad a cambios de pH, se pueden comportar como sustancias aniónicas a pH alcalinos y catiónicas a pH ácidos.

2.1.4 Producción de Biosurfactantes

Existen varias patentes de producción de biosurfactantes dependiendo del tipo de microorganismo productor y de la naturaleza del biotensoactivo. Velraeds et al. [62] mostraron que la liberación de biosurfactante por cepas de *Lactobacillus* es máxima cuando las células se encuentran en la fase estacionaria. Además la producción de biosurfactante puede ser estimulado por el crecimiento de las células microbianas en condiciones de crecimiento limitantes [55].

La producción de biosurfactantes se ve afectado por factores como la fuente de carbono [56]. Este factor tiene gran influencia en la síntesis del biosurfactante tanto como por inducción o represión [57]. Por ejemplo el sustrato más común para la fermentación con

bacterias ácido lácticas es el suero [58] [59] [60]. Otro sustrato utilizado es la melaza, un subproducto de la industria azucarera, el cual es usado para la alimentación animal y para la producción de etanol y levadura [60]. La fuente de nitrógeno es un factor importante para la fermentación de las bacterias ácido lácticas [62] [63], también el pH [64] [65], la agitación, el oxígeno y la temperatura [66].

La recuperación de los biosurfactantes depende principalmente de su carga iónica, solubilidad y localización (intracelular, extracelular o ligadas a la pared celular) [4]. Los compuestos intracelulares requieren mayores costos en la recuperación, debido a que se debe realizar una lisis celular por medios mecánicos o enzimáticos antes de la purificación [67].

Existen varios métodos para extraer los biosurfactantes algunos de ellos son: ultra-centrifugación [68], ultra-filtración [69], precipitación con ácido o sal [70] y extracción por solvente [71]. Los compuestos orgánicos como el cloroformo y metanol son los más efectivos para el proceso de extracción ya que se ajustan a la polaridad de la molécula de biosurfactante [72].

2.1.5 Detección y cuantificación de los Biosurfactantes

Uno de los métodos utilizados para la detección de biosurfactantes en diferentes tipos de bacterias es el método llamado colapso de gota o "*drop-collapse*". Éste método es rápido y se utiliza para detectar biosurfactantes en presencia de medios de cultivo. En esta prueba se toma una gota de suspensión celular y se traslada a una superficie cubierta de aceite. Si las gotas contienen biosurfactantes, éstas colapsan, de no ser así, permanecen estables [73] [74]. Otros métodos utilizados son: la hemólisis en agar sangre [75, 76], adhesión bacteriana a hidrocaburos (BATH) [77, 78], ensayo de propagación de aceite o "oil spreading assay" [79, 80], ensayo de emulsificación [81], tensión superficial entre otros [82].

Estos métodos tienen ventajas y desventajas, por ejemplo para el ensayo de hemólisis en agar sangre las cepas que son hemolíticas se creen que son productoras de biosurfactantes, pero existen otros factores de virulencia que pueden lisar las células de la sangre, también los biosurfactantes con bajo nivel de difusión en el agar pueden ser no capaces de lisar las células de la sangre. Así que los resultados del ensayo hemolítico no son tan confiables. Los ensayos más confiables son los de colapso de gota, propagación de aceite y prueba de tensión [83].

Para la cuantificación de los biosurfactantes comúnmente se utiliza la cromatografía de capa fina o thin layer chromatography (TLC). Éste es un método simple usado para detectar la presencia de lipopéptidos [84]. La técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia o *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) es un excelente método

para la separación de biosurfactantes de tipo péptidos/lipopéptidos [85]. La técnica de cromatografía de fase reversa permite la separación de cada estructura péptido/lipopéptido con base en la polaridad. Los productos separados son detectados en un espectrofotómetro-UV para la respectiva medición de la absorbancia y cada pico se mide usando un colector de fracciones para un mejor análisis de su estructura. Al acoplar el HPLC con un espectrofotómetro se puede obtener información preliminar del peso molecular de cada componente [86]. La Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) se puede usar para identificar tipos de bandas químicas (grupos funcionales) y poder conocer los componentes en los biosurfactantes [87].

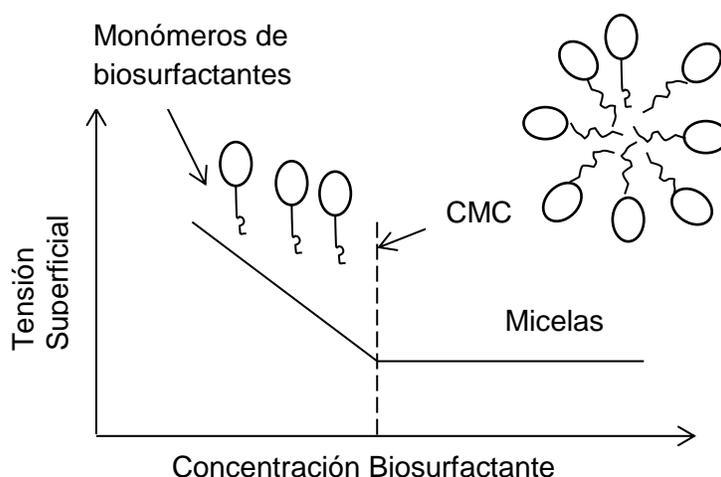
2.1.6 Propiedades fisicoquímicas

Las propiedades más importantes de los surfactantes son la concentración crítica micelar y el balance hidrofílico-lipofílico (HLB):

- Concentración Crítica Micelar (CMC)

Para determinar la concentración crítica micelar se halla la tensión superficial variando la concentración de surfactante. La concentración crítica micelar nos indica cual es la concentración mínima a la cual aparecen las primeras micelas [88]. En la figura 3 se muestra la representación gráfica de la concentración crítica micelar.

Figura 3. Representación gráfica de la concentración crítica micelar (CMC) [89]



- Balance hidrofílico lipofílico (HLB)

El HLB es una medida que indica si un biotensioactivo produce emulsiones agua en aceite o emulsiones aceite agua. Esta propiedad se puede usar para determinar la aplicabilidad de los biosurfactantes. Los emulsificantes con bajo valor HLB son lipofílicos y estabilizan emulsiones agua en aceite. Los emulsificantes con alto valor HLB tienen el efecto contrario y tienen una mejor solubilidad en agua [90].

A los emulsificantes de carácter lipofílico se les asigna un número bajo de HLB (menor a 9.0), y a los emulsificantes hidrofílicos un número alto de HLB (por encima de 11.0) [88]. En la tabla 3 se pueden observar las características de las emulsiones de acuerdo a su número de HLB. En la Tabla 4 se muestran los diferentes usos de los biosurfactantes de acuerdo con el rango de valores de HLB.

Tabla 3. Características de emulsiones de acuerdo a su HLB [91]

Características de la emulsión	Rango de HLB
No es dispersable en el agua	1-4
Poca dispersión	3-6
Dispersión lechosa después de agitación	6-8
Dispersión lechosa estable	8-10
Dispersión translúcida a clara	10-13
Solución clara	13+

Tabla 4. Uso de biosurfactantes en función del valor de HLB [91]

Rango HLB	Uso
4-6	Emulsificante W/O
7-9	Agentes humectables
8-18	Emulsificante O/W
13-15	Detergente
10-18	Solubilizantes

2.2 Métodos de Recobro Mejorado de Petróleo

La implementación de tecnologías para mejorar el factor de recobro de yacimientos de petróleo es una necesidad sentida en la industria petrolera. El recobro mejorado o *enhanced oil recovery* (EOR), se aplica ya sea después de la recuperación primaria o después de la recuperación secundaria con el objetivo de recuperar porcentajes significativos del denominado petróleo residual.

2.2.1 Clasificación

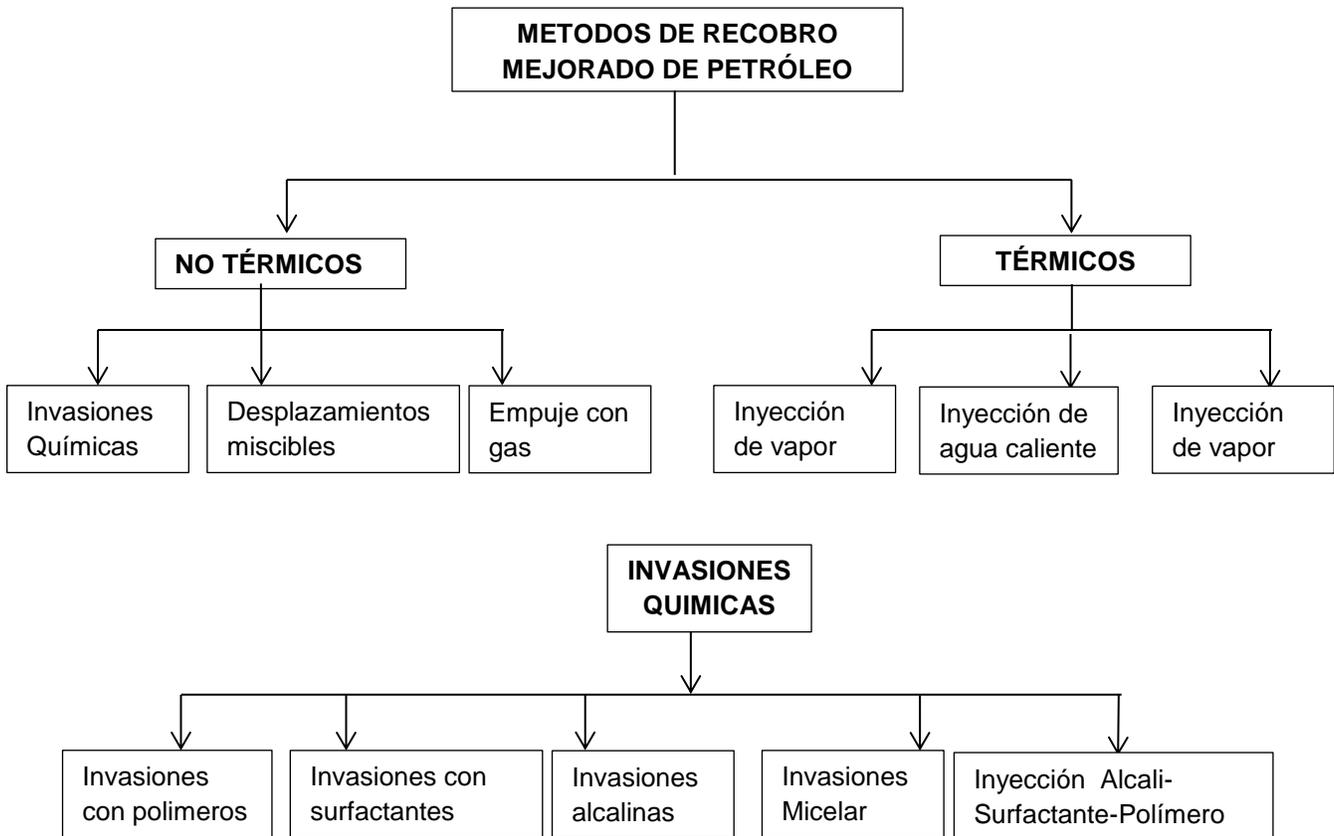
En términos generales, los métodos de recobro mejorado se pueden clasificar en dos categorías amplias: térmicos y no térmicos como se muestra en la Figura 4. Los métodos térmicos se han probado desde los años 1950s y se han concebido para aplicarse fundamentalmente en yacimientos de crudos pesados. El objetivo fundamental de estos métodos es suministrar calor al yacimiento para lograr una reducción considerable de la viscosidad del crudo y así mejorar su movilidad. Otros mecanismos que pueden contribuir a mejorar el factor de recobro son la expansión de los fluidos y la roca, la vaporización de los componentes más volátiles del crudo y la ruptura o *cracking* de compuestos de alto peso molecular. Entre las tecnologías de recobro térmico de petróleo se pueden mencionar: inyección de agua caliente o vapor, inyección cíclica de vapor, drenaje por gravedad asistido por vapor (SAGD: *steam assisted gravity drainage*) y combustión *in situ*.

En principio, los métodos no-térmicos son más adecuados para incrementar el factor de recobro de yacimientos de crudos convencionales. Sin embargo, también constituyen una herramienta tecnológica válida para yacimientos de crudos pesados moderadamente viscosos (crudos con viscosidades menores a los 2000 mPas, los cuales son menos sensibles a cambiar su viscosidad con temperatura) con características desfavorables para los métodos térmicos (yacimientos pequeños, de bajo espesor (menor a 10 m), ubicados a profundidades considerables (mayor a 1000 m), con permeabilidades absolutas muy bajas y saturaciones de agua connata altas). De acuerdo con Selby, Alikhan y Farouq Ali [92] cerca de la mitad de los yacimientos de crudos pesados en explotación no son adecuados para implementar métodos de recobro térmico.

Los métodos no-térmicos buscan incrementar el factor de recobro mejorando la relación de movilidad o disminuyendo la tensión interfacial. Debido a su alta viscosidad, los crudos pesados exhiben baja movilidad (cociente entre la permeabilidad efectiva al fluido y su viscosidad), lo cual hace que el desplazamiento del crudo por parte de un fluido menos viscoso (agua o gas) sea ineficiente, como consecuencia de una desfavorable relación de movilidad (movilidad del fluido desplazante mayor que la movilidad del fluido desplazado). La relación de movilidad afecta la eficiencia de desplazamiento tanto a nivel microscópico (nivel de poro) como a nivel macroscópico (barrido areal y vertical). Mientras mayor sea la relación de movilidad, mayor es la posibilidad de que el fluido desplazante se canalice dejando atrás una mayor cantidad de petróleo residual. En crudos de alta viscosidad el fenómeno de canalización puede ser más crítico, necesitándose mayores volúmenes de fluido desplazante para obtener una saturación residual de petróleo dada. De otro lado, una disminución en la tensión interfacial permite vencer más fácilmente las fuerzas capilares y por lo tanto incrementar la eficiencia de barrido a nivel microscópico.

Entre los métodos no-térmicos aplicados tanto a crudos pesados como livianos se tienen: desplazamientos miscibles con gas, desplazamientos inmiscibles con gas, y los denominados métodos de recobro químicos (*chemical flooding*). Los métodos químicos, como su nombre lo indica, utilizan una formulación o tratamiento químico como fluido desplazante, el cual promueve una disminución en la relación de movilidad y/o una disminución en la tensión interfacial (un aumento en el denominado número capilar). Estos métodos se clasifican en diferentes categorías dependiendo del agente químico utilizado: inyección de polímeros (*polymer flooding*), inyección de surfactantes (*surfactant flooding*), inyección alcalina (*alkaline flooding*), inyección de micelares (*micellar flooding*) e inyección ASP (*alkali-surfactant-polymer flooding*).

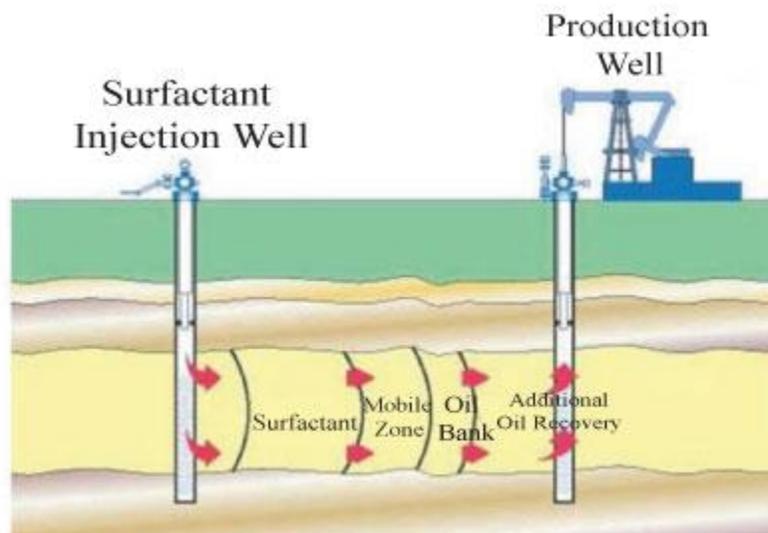
Figura 4. Clasificación de los métodos de Recobro mejorado de Petróleo [93].



2.2.2 Inyección de surfactantes

Con la inyección de surfactantes se busca incrementar el factor de recobro mediante la reducción de la tensión interfacial, lo cual permite movilizar aceite residual hacia los pozos como se muestra en la figura siguiente [94]:

Figura 5. Esquema de la inyección de surfactante para el recobro de petróleo.



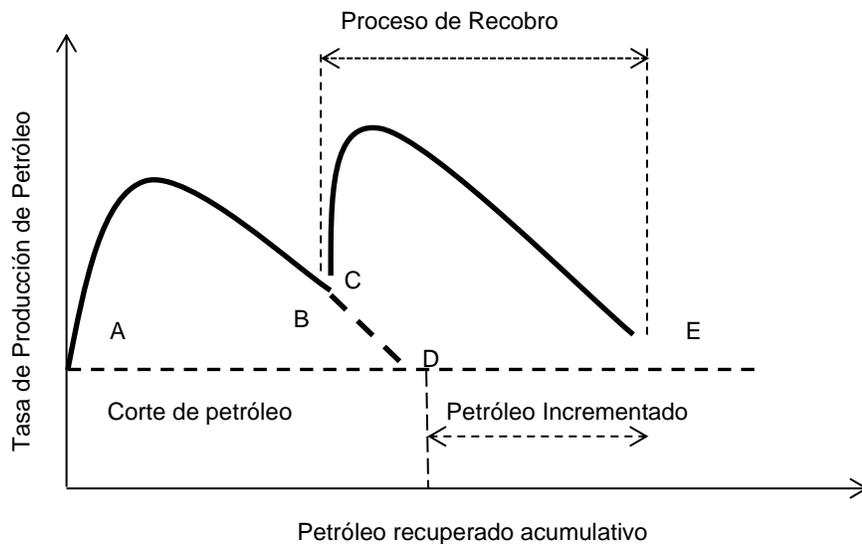
Los siguientes son los mecanismos que permiten aumentar el recobro con la inyección de surfactantes: (1) generación de bajos valores de tensión interfacial entre el aceite y la solución inyectada de agua, (2) la emulsificación o microemulsificación del crudo atrapado, (3) la reducción de las propiedades reológicas en la interfase aceite y la solución inyectada y (4) control de humectabilidad de la roca para optimizar el desplazamiento de aceite [95].

Los surfactantes más empleados en el recobro mejorado de petróleo son sulfonatos de petróleo, los cuales se pueden utilizar en un amplio intervalo de temperaturas. Por lo general se emplean sulfatos oxialquilados en combinación con sulfonatos de petróleo [96]. La mayoría de estos surfactantes poseen altos costos, razón por la cual se han sumado esfuerzos para hallar alternativas que permitan abaratar su producción.

2.2.3 Evaluación del Proceso de Recobro Mejorado de Petróleo.

La manera más efectiva de evaluar un proceso de recobro de petróleo es determinando el factor de recobro. La Figura 6 muestra el esquema de recuperación de petróleo para un proceso de recobro mejorado.

Figura 6. Esquema de recuperación de petróleo con proceso EOR [97]



El petróleo producido acumulado en D es la recuperación final de petróleo, sino se inicia un proceso de recobro en B. El aceite acumulado en E es el aceite recuperado al final del proceso de recobro. Por lo tanto, la diferencia del aceite acumulado entre E y D es el aceite incremental recuperado [97].

Los criterios de selección para los procesos de recobro han sido reportados por varios investigadores [98] [99] [100]. Los parámetros más críticos que pueden afectar un proceso de recobro químico son la temperatura de yacimiento, salinidad de la formación, contenido de arcilla y viscosidad del aceite.

3. Materiales y Métodos

3.1 Identificación y detección de las Bacterias

Las bacterias ácido lácticas fueron proporcionadas por el laboratorio de biotecnología de Tecnoparque SENA nodo Medellín y fueron aisladas y caracterizadas por el grupo de investigación BioAli de la Universidad de Antioquia. Las bacterias se encuentran almacenadas en medio MRS y glicerol a -70°C . En la Tabla 5 se muestra la composición del medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) suministrado por MERCK.

Tabla 5. Composición de Medio MRS

Composición	Concentración del medio
Peptona	18 g/L
Extracto de Levadura	4 g/L
Glucosa	20 g/L
Tween 80	1 ml/L
Fosfato dipotasio de hidrógeno	2 g/L
Citrato triamonio	2 g/L
Acetato de sodio anhidro	3 g/L
Sulfato de magnesio $7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g/L
Sulfato de magnesio anhidro	0,034 g/L

*pH final 6.2 ± 0.2

La identificación de las bacterias se llevó a cabo en el Instituto de Productos Lácteos de Asturias, España. Los ADN de las bacterias seleccionadas se analizaron mediante PCR (Polymerase chain reaction: técnica molecular en el que se obtiene un número de copias de un fragmento de ADN) amplificando el gen para la posterior secuenciación de la región 16s ribosomal. Las secuencias de los aislados de las bacterias ácido lácticas de suero costeño se editaron desde el cromatograma y analizadas por NCBI (National Center for Biotechnology Information) y BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Se tomaron inicialmente 18 cepas: LAC01, LAC02, LAC03, LAC04, LAC05, LAC06, LAC07, LAC08, LAC09, LAC10, LAC12, LAC15, LAC16, LAC17, LAC18, LAC19, LAC20, LAC21. El supernadante de cada una de las cepas fue evaluado por las técnicas cualitativas de colapso de gota, hemólisis en agar sangre y las técnicas cuantitativas de porcentaje de hidrofobicidad y tensión superficial [73] [74]. Las bacterias se incubaron en medio MRS a una temperatura de 37°C y una velocidad de agitación de 200 rpm por 3 días. Se determinó la producción de biosurfactantes utilizando el sobrenadante y las células centrifugadas a 12000 g por 20 minutos lavadas con solución buffer de PBS (NaCl 8 g/L; KCL 0,2 g/L; Na₂HPO₄ 1,44 g/L; KH₂PO₄ 0,24 g/L) [101]. Los resultados fueron positivos para aquellas gotas que el diámetro superaban el diámetro de gota del control negativo (agua destilada). En este caso se utilizó como control positivo el surfactante Tween 80. Se midió la tensión superficial a las cepas que obtuvieron un resultado positivo con un tensiómetro KRUSS por medio del método de levantamiento del anillo.

La prueba de adherencia bacteriana a hidrocarburos (Bacterial Adhesion To Hydrocarbons) se utilizó para evaluar la hidrofobicidad de la pared celular bacteriana [102]. La prueba de hidrofobicidad se llevó a cabo como lo describe Ronsenberg [103]. La suspensión acuosa de células bacterianas se mezcla con un hidrocarburo bajo condiciones controladas. Se tomaron las células y se lavaron con una solución de PBS. Con una micropipeta se tomó una muestra de 1 ml de células suspendidas y se midió la absorbancia en el espectroscopio de UV-visible. En un tubo de ensayo se tomaron 4 ml de las células suspendidas en PBS y se le agregó 1 ml de tolueno, se agitó durante 2 minutos en un agitador vortex y se dejó en reposo durante 15 minutos. La fase acuosa se removió con una micropipeta y se midió la disminución de la absorbancia de la luz de la fase acuosa. Si las células son hidrofóbicas, se adhieren a la fase apolar de los hidrocarburos. Si las células son hidrófilas, permanecen en la fase polar. El porcentaje de hidrofobicidad se determinó con la siguiente ecuación [104]:

Ecuación 1

$$\% \text{ de Adherencia Bacteriana a Hidrocarburos} = \left(1 - \frac{A_f}{A_i}\right) * 100$$

Donde A_f es la absorbancia final obtenida de la fase acuosa después de la mezcla, A_i es la absorbancia inicial de la fase acuosa.

3.2 Optimización de la producción de Biosurfactantes

Las tres bacterias previamente seleccionadas se almacenaron en tubos eppendorf de 1,5 ml a -70°C y se inocularon en un frasco de 250 ml, al cual se agregaron 50 ml de medio MRS. La densidad óptica del medio de cultivo se ajustó a 600 nm a un valor de 0,1 u.a. Las bacterias fueron inoculadas a diferentes temperaturas (31, 34, 37, 40°C) con agitación de 200 rpm y sin aireación. El crecimiento bacteriano se determinó midiendo la absorbancia por medio de un espectrofotómetro de UV-visible a 600 nm cada hora durante 24 horas.

Para la optimización de la producción de los biosurfactantes se realizó un esquema factorial ($3 \times 2 \times 4$) aleatorizado con tres replicas correspondiente a tres cepas microbianas, dos fuentes de carbón (melaza y suero) y cuatro formulaciones de medios de cultivo, a los cuales se les varió las concentraciones de nitrógeno, hierro y fosforo como se muestra en la Tabla 6. La tensión superficial de los medios de cultivo se seleccionó como variable de respuesta del diseño de experimentos. Para cada característica evaluada se realizó un análisis de varianza por el *test* de F con un 5% de probabilidad. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa Minitab 15.

La concentración micelar crítica se determinó graficando los valores de la tensión superficial de las diluciones de las células y sus sobrenadantes con agua destilada. Se realizó con dos repeticiones para cada cepa bacteriana.

Se realizó la fermentación de cada una de las cepas en cada uno de los medios por 18 horas a la temperatura óptima. Los medios fueron inoculados con un volumen de inóculo ajustado para obtener una densidad óptica de 0,01 u.a. Al observarse que la absorbancia empieza a decaer se adicionaron el suero (50 g/L de Lactosa) y la melaza (20 g/L de sacarosa). El crecimiento bacteriano fue obtenido por lectura de densidad óptica a 600 nm cada 24 horas durante 3 días.

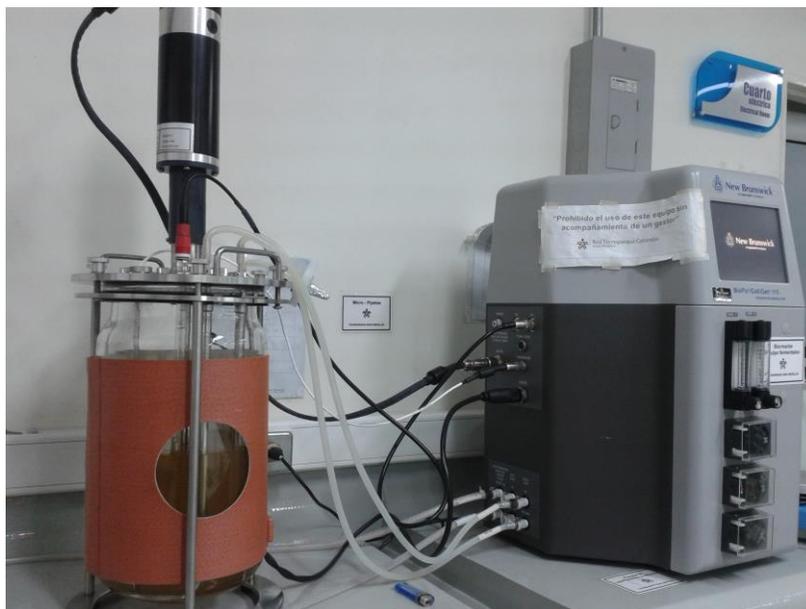
Tabla 6. Composición de los diferentes medios para la optimización de la producción de biosurfactantes.

Composición	Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 4
Peptona	18 g/L	5 g/L	5 g/L	10 g/L
Extracto de Levadura	4 g/L	-	3 g/L	3 g/L
Tween 80	1 ml/L	-	1 ml/L	1 ml/L
Fosfato dipotasio de hidrógeno	2 g/L	-	2 g/L	2 g/L
Citrato triamonio	2 g/L	-	2 g/L	2 g/L
Acetato de sodio anhidro	3 g/L	-	3 g/L	3 g/L
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	0,2 g/L	-	0,2 g/L	0,2 g/L
Sulfato de magnesio anhidro	0,034 g/L	-	0,034 g/L	0,034 g/L
Sulfato de hierro II	-	-	0,034 g/L	0,034 g/L
Sacarosa	20 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L
Extracto de carne		3 g/L		
Lactosa		5 g/L		

3.3 Producción en Biorreactor

El preinóculo se fermentó en un *shaker* con medio M2 a 37°C y 200 rpm con la cepa *Lactobacillus fermentum*, LAC 012. El biorreactor y el medio de cultivo se desinfectaron y esterilizaron para una cantidad de 6 Litros. Las condiciones para el biorreactor fueron 37°C, 100 rpm, sin aireación y con un preinóculo de 600 ml. Al medio se agregó la melaza como fuente de carbono y nitrógeno llevándose a cabo la fermentación durante 3 días. El montaje se llevó a cabo en un biorreactor de 14 Litros de marca New Brunswick (Figura 7) proporcionado por el laboratorio de Biotecnología de TecnoParque.

Figura 7. Biorreactor de 14 Litros marca New Brunswick.



La extracción del biosurfactante se llevó a cabo mediante el método de precipitación ácida [105], luego de la fermentación, el caldo de cultivo con células se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos. El supernadante fue acidificado con HCl (6M) hasta llegar a pH=2 y posteriormente se dejó en reposo una noche a 4°C. Para obtener un pellet, el supernadante se centrifugó de nuevo, se lavó con agua a pH=7 y se dejó en la nevera durante 24 horas.

3.4 Caracterización del Biosurfactante

3.4.1 Determinación de HLB [91] [106]

El HLB se determina experimentalmente mezclando un emulsificante desconocido a varias concentraciones con un emulsificante con HLB conocido. Para la mezcla se asume un valor aproximado de HLB igual al "HLB requerido" del aceite, así que el valor de HLB desconocido puede ser calculado de acuerdo con sus características de solubilidad o dispersabilidad.

3.4.2 Análisis de tamaño de gota

Para analizar el comportamiento del biosurfactante en presencia de agua e hidrocarburos, se realizó un análisis de tamaño de gota en donde se realizaron emulsiones de tolueno, biosurfactante y agua a 25°C. Dichas emulsiones se agitaron durante 2 minutos a 10000 rpm. Este análisis permite evaluar la aplicabilidad del biosurfactante en recobro mejorado de petróleo.

3.4.3 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es la técnica más usada para identificar tipos de bandas químicas (grupos funcionales) y poder conocer los componentes en una sustancia desconocida [107]. Los espectros de infrarrojos se llevaron a cabo en el equipo Thermo scientific Smart iTR Nicolet iS10 (localizado en el SENA de Pedregal), todas las medidas consistieron en 5 escaneos, con un rango de numero de onda entre 600 y 4000 cm^{-1} .

3.4.4 Cromatografía Líquida de Alta Eficacia o High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Para realizar la curva de calibración se disolvieron muestras de surfactina purificada en un tampón de elución [Buffer Fosfato 20% y Acetonitrilo 80%] y se obtuvieron concentraciones de 100, 200, 300 y 400 ppm. Se utilizó un cromatógrafo Thermo Scientific (localizado en el SENA de Pedregal) con 1 bomba cuaternaria, columna Zorbax SB-C18 y un detector UltraVioleta PDA. Como fase móvil se utilizó Buffer Fosfato 20% (pH 2, 20mM KH_2PO_4) con un flujo de 1 ml/min. La inyección de la muestra fue de 20 μL y la prueba se llevó a cabo durante 30 minutos a una longitud de onda de 205 nm [108].

3.5 Prueba de desplazamiento (inyección de biosurfactante)

La prueba de inyección de biosurfactante se llevó a cabo utilizando un empaque de arena Berea. Para determinar la concentración adecuada del fluido a inyectar (tratamiento) se hicieron diluciones del sobrenadante en salmuera, y a cada muestra con una concentración dada se le determinó la tensión interfacial y se le hizo un estudio de compatibilidad con un petróleo crudo. El tratamiento a inyectar en la prueba de desplazamiento a condiciones representativas de yacimiento debe ser aquel que permita

lograr la mayor disminución de la tensión interfacial tratamiento/crudo y que además no presente problemas de compatibilidad.

3.5.1 Propiedades de los fluidos y de la arena

Todas las pruebas se llevaron a cabo con crudo Acordionero, el cual se puede clasificar como un crudo pesado (15.3°API), cuya viscosidad a condiciones de yacimiento (192 cp a 75°C) le permite moverse en el espacio poroso (ver tabla 7). La tabla 8 muestra las principales propiedades del empaque construido con la arena Berea.

Tabla 7. Propiedades de los fluidos

Fluido	Descripción
Gravedad API del Crudo	15,3°API
Viscosidad del crudo a 75°C	192 mPas
Salinidad de la salmuera	1000 ppm NaCl
Densidad de la salmuera	0,9 g/cm ³

Tabla 8. Propiedades del empaque de arena Berea

Propiedad	Descripción
Peso Seco (g)	101,4
Peso Saturado (g)	108,18
Volumen Total (cm ³)	50,5
Volumen Poroso (cm ³)	
(peso saturado – peso seco)/densidad del agua	7,5
Porosidad %	
V_p/V_T	15

3.5.2 Prueba de Tensión Interfacial

La prueba de tensión interfacial se llevó a cabo utilizando el biosurfactante a la concentración que se encuentra en el medio de cultivo. El biosurfactante se diluyó a diferentes concentraciones y se puso en contacto con el crudo Acordionero a una temperatura de 75°C. Se midió la tensión entre las dos fases con un tensiómetro marca KRUSS. Se realiza una gráfica de Concentración de biosurfactante *versus* tensión interfacial.

3.5.3 Prueba de Compatibilidad

La prueba de compatibilidad se realizó con el fin de evaluar cualitativamente los posibles efectos negativos sobre el flujo de fluidos en el medio poroso que se pueden generar al mezclar el biosurfactante diluido en salmuera con el crudo, como por ejemplo: generación de emulsiones estables y precipitación de sólidos [109]. Como indica la figura 8, las muestras de surfactante diluido se mezclaron con el crudo en proporciones 20-80, 50-50 y 80-20 a 75°C.

Figura 8. Proporciones de mezcla surfactante diluido/crudo utilizados para la prueba de compatibilidad.



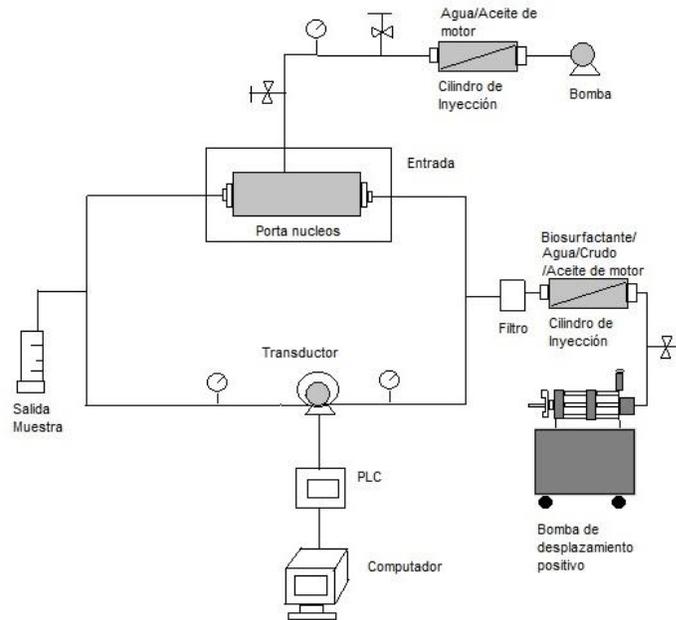
3.5.4 Protocolo de la Prueba de Desplazamiento

En la Figura 9 se muestra el montaje de la prueba de desplazamiento llevada a cabo para determinar el porcentaje de recobro de petróleo mediante la inyección del tratamiento a una tasa de $0,5 \text{ cm}^3/\text{min}$.

La temperatura de la prueba (75°C) es representativa de las temperaturas más comunes en yacimientos de la Cuenca de los Llanos Orientales. Varios estudios confirman la estabilidad de los biosurfactantes bajo condiciones de temperatura aún mayores que la utilizada en este trabajo. Joshi et al [110] reportaron que los biosurfactantes producidos por diferentes cepas de *Bacillus* fueron estables por nueve días a 80°C . Desai y Banat [4] observaron que el tratamiento térmico en algunos biosurfactantes no causó cambio significativos en sus propiedades, a pesar de llevarse al autoclave a 120°C por 15 minutos.

El montaje contiene un portanúcleos (donde se empaca la arena) conectado a una bomba que proporciona la presión de sobrecarga (1000 psia , $6894,75 \text{ kPa}$). Al portanúcleos se le conectan las líneas de fluidos (agua, petróleo y biosurfactante), los cuales se inyectan al medio poroso con una bomba de desplazamiento positivo. Los fluidos se pasan por un filtro para eliminar impurezas y evitar la depositación de finos en la arena. La presión se mide con un transductor que lleva la información a un PLC y al computador. A la salida del portanúcleos se recoge la muestra para determinar la cantidad de petróleo recuperado.

Figura 9. Esquema del montaje de prueba de desplazamiento con biosurfactante



Fuente: Propia

La prueba se llevó a cabo en cinco pasos. En el primer paso el medio poroso se satura completamente con salmuera inyectando 5 volúmenes porosos de agua y se determina la permeabilidad absoluta del sistema. En el segundo paso se inyectan 5 volúmenes porosos de aceite y se calcula la permeabilidad efectiva a dicha fase a saturación residual de agua ($K_{o@Sor}$). En el tercer paso se inyecta nuevamente salmuera para determinar la cantidad de aceite que se logra recuperar con esta inyección. En el cuarto paso se inyectan nuevamente 5 volúmenes porosos de aceite para restaurar el sistema y en el quinto paso se inyectan 5 volúmenes porosos del tratamiento con biosurfactante y se determina la cantidad de aceite recuperado (N_p).

4. Resultados y Discusión

En el siguiente capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos de las pruebas descritas en el capítulo anterior.

4.1 Identificación y detección de las bacterias ácido lácticas

De acuerdo al análisis que se llevó a cabo en el Instituto de Productos Lácteos de Asturias, los aislados fueron identificados como *Lactobacillus fermentum* strain NBRC 15885.

Las 18 bacterias ácido lácticas pertenecientes al laboratorio de biotecnología de Tecnoparque Nodo Medellín fueron evaluadas por medio de un *screening*, en el cual se usó la técnica del colapso de gota y tensión superficial para determinar las bacterias con potencial para producir biosurfactante (ver tabla 9).

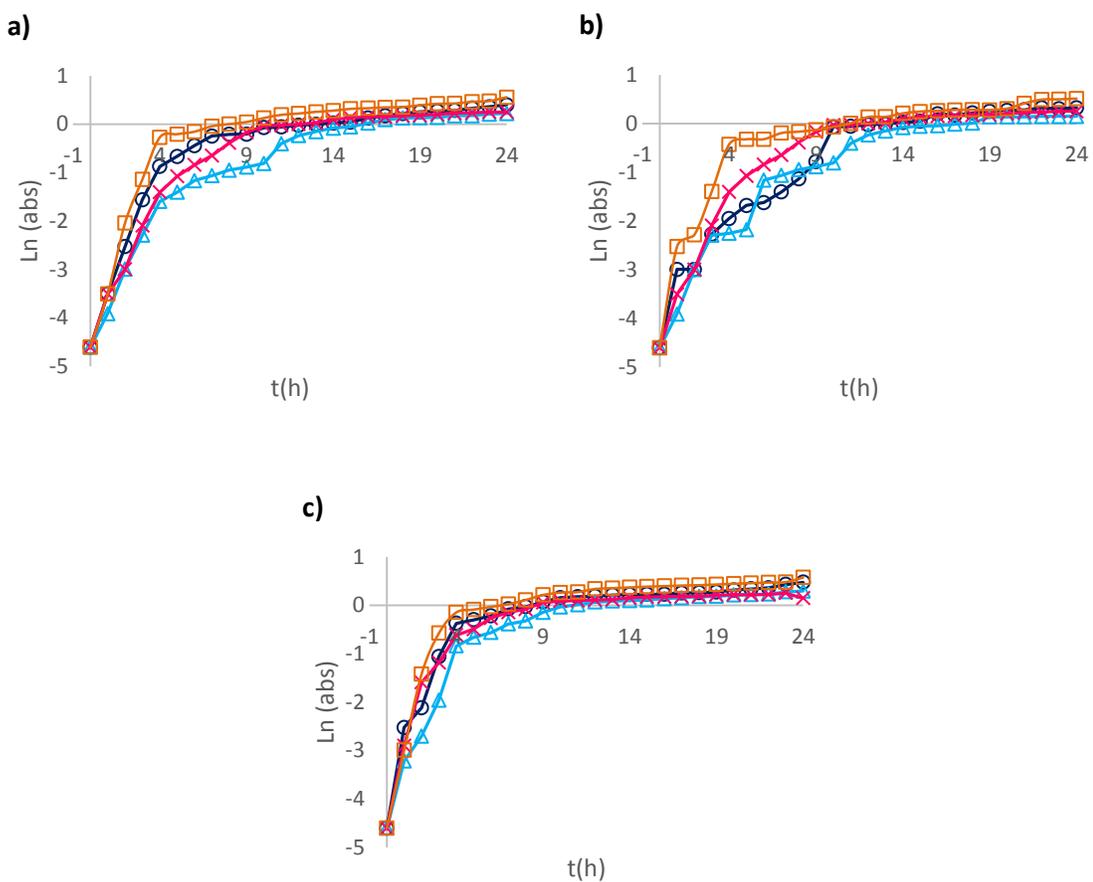
Se seleccionaron tres bacterias (LAC05, LAC10 y LAC12), dada su capacidad de reducir la tensión superficial por debajo de 40 mN/m [108] y su capacidad de superar el diámetro de gota del control negativo (agua destilada) en la prueba de colapso de gota. Aunque adicionalmente se realizó la prueba de porcentaje de hidrofobicidad, esta técnica no es totalmente predictiva a la hora de determinar si las bacterias producen biosurfactantes, ya que determina cualitativamente si las bacterias son afines al aceite, pero no predice la presencia de sustancias tensoactivas.

Tabla 9. *Screening* potencial de producción de biosurfactantes de las bacterias ácido lácticas.

Cepa	% de Hidrofobicidad	Colapso de gota	Prueba tensión (mN/m)
LAC01	20,8	-	41,4
LAC02	25,7	-	49,9
LAC03	1,8	-	47,5
LAC04	8	-	46,6
LAC05	25,2	+	38,2
LAC06	2,3	-	46,6
LAC07	1,6	-	49,6
LAC08	4,5	-	47,7
LAC09	3	-	46,5
LAC10	22,5	+	34,5
LAC12	47,2	+	32,2
LAC15	6,2	-	48,5
LAC16	2,9	-	48,3
LAC17	44,3	-	42,9
LAC18	0,3	-	50,4
LAC19	0,8	-	49,2
LAC20	5,7	-	47,2
LAC21	38,8	-	49,1

La Figura 11 muestra que para las bacterias seleccionadas, la mejor temperatura de crecimiento corresponde a 37°C. Por lo tanto todos los experimentos de fermentación variando los medios de cultivo y utilizando como fuente de carbono suero y melaza se realizaron a dicha temperatura.

Figura 10. Curvas de crecimiento para las bacterias ácido lácticas a) LAC05, b) LAC10 y c) LAC 12 a diferentes temperaturas: (Δ) 31°C, (\circ) 34°C, (\square) 37°C y (\times) 40°C.



4.2 Optimización de la producción de Biosurfactantes

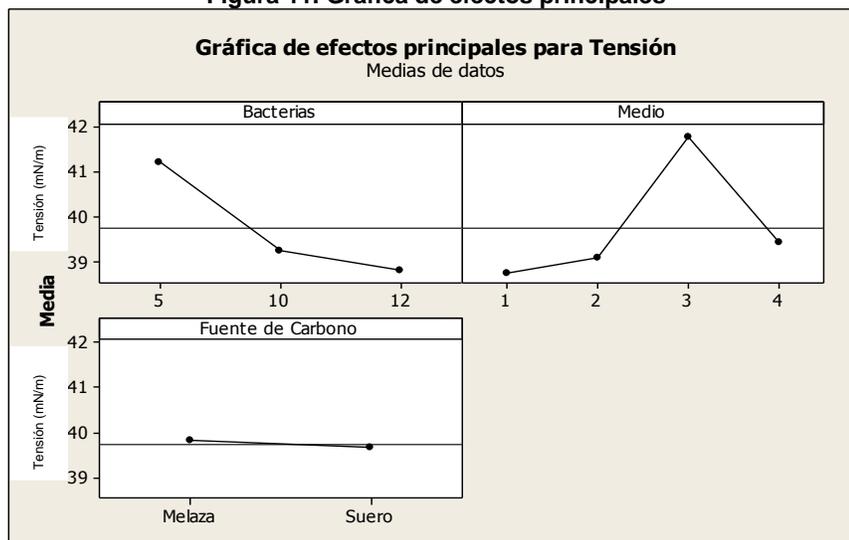
La tabla 10 muestra los resultados del análisis estadístico llevado a cabo en el programa *Minitab 16*. Se puede observar que hay efecto significativo para los factores Bacterias/Medio y Medio/Fuente de Carbono en la producción de biosurfactantes.

Tabla 10. Análisis de Varianza entre los factores.

Fuente	G.L.	SC Sec.	SC Ajust.	MC ajust.	F	P
Bacterias	2	52,695	52,695	26,348	2,81	0,08
Medio	3	67,412	67,412	22,471	2,4	0,093
Fuente de Carbono	1	0,285	0,285	0,285	0,03	0,863
Bacterias*Medio	6	150,958	150,958	25,16	2,68	0,039
Bacterias*Fuente de Carbono	2	17,122	17,122	8,561	0,91	0,415
Medio*Fuente de Carbono	3	92,856	92,856	30,952	3,3	0,037
Bacterias*Medio*Fuente de carbono	6	51,155	51,155	8,526	0,91	0,505
Error	24	224,995	224,995	9,375		
Total	47	657,478				

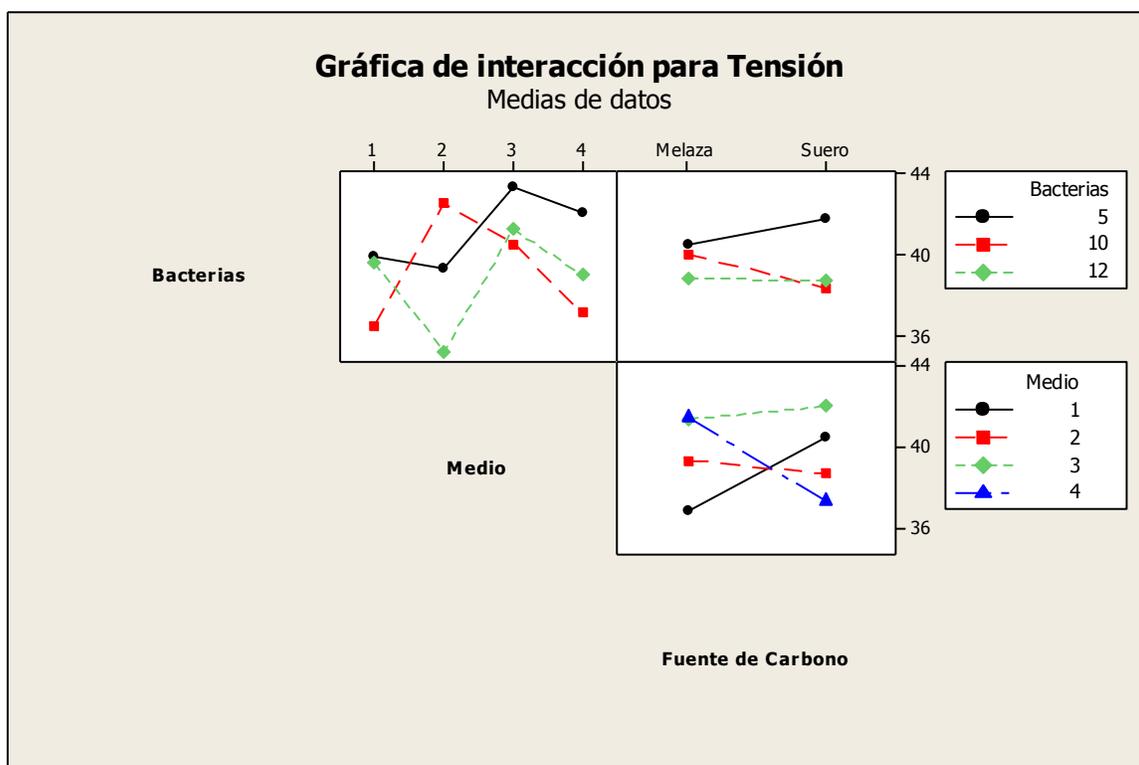
En la figura 11 se observa que no hay efectos principales significativos para los factores cuando se encuentran sin interacciones.

Figura 11. Gráfica de efectos principales



En la figura 13 se puede analizar la interacción entre los factores (bacterias, medio y fuente de carbono). Cuando se tiene la interacción bacterias/medio se puede observar que la variable de respuesta (tensión superficial) tiene valores más bajos para la bacteria 2 y el medio M2. Para la interacción fuente de carbono/medio se observa que se obtienen valores bajos de tensión cuando se utiliza la melaza.

Figura 13. Gráfica de interacción para Tensión



La respuesta de las bacterias cuando se alimentan con las dos fuentes de carbono (melaza y suero) varió de acuerdo con la composición de los medios de cultivo. Se encontraron valores por debajo del control positivo (40 mN/m), confirmando la presencia de compuestos con propiedades tensoactivas como se observa en el ANEXO A: Tabla 14-15. Para la bacteria LAC10 el medio M1 permitió obtener un mejor valor de tensión superficial, teniendo en cuenta que la fuente de carbono era la melaza (ANEXO A: Tabla 14). Estos valores son comparables con resultados obtenidos por L.R. Rodríguez [6], quién utilizó bacterias ácido lácticas (*Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus*) para producir biosurfactantes utilizando suero y melaza como fuente de carbono, obteniendo mejores resultados con la melaza.

Para la bacteria LAC12 el mejor valor de tensión superficial se obtuvo al utilizar el medio M2, independientemente de la fuente de carbono (ANEXO A: Tabla 15). No hubo diferencia significativa entre los medios M1, M2, M3, M4 para la bacteria LAC05 cuando

se utilizó como fuente de carbono la melaza y el suero. Los mejores resultados para la bacteria LAC05 se obtuvieron con el medio M1 con melaza como fuente carbono. Al utilizar extracto de carne y lactosa en el M2, en lugar de utilizar extracto de levadura y otros componentes del M1, se favoreció la producción de sustancias tensoactivas, observándose una disminución en la tensión superficial. Al utilizar suero como fuente de carbono con el Medio M4 se pudo observar disminución en la tensión superficial debido a que fue suplementado con sulfato de hierro II, sustancia que promueve la producción de biosurfactantes [112].

Para el medio M3 se obtuvieron mayores valores de tensión superficial debido a las diferencias en las concentraciones de peptona y extracto de levadura, comparadas con las concentraciones de M1 y M4. La mejor fuente de carbono fue la melaza para todas las bacterias y todos los medios de cultivo (excepto para la bacteria LAC10 con el medio M4 y LAC12 y el medio M2) ya que contiene mayor contenido de azúcares y es un promotor para la producción de sustancias tensoactivas. Los resultados obtenidos brindan avances significativos para la formulación de los medios de cultivo al buscar optimizar la producción de biosurfactantes reduciendo costos de producción.

Para la obtención de las Figuras 22-29 mostradas en el ANEXO B se realizaron las diluciones a una de las tres réplicas de los medios de cultivo utilizados con las tres cepas microbianas y las variaciones de fuente de carbono teniendo en cuenta el mejor valor de tensión superficial.

La dilución micelar crítica (DMC) es el factor por el cual la concentración efectiva excede la concentración micelar crítica (CMC) y osciló entre 0,005% y 0,25%. A partir de esa dilución, ocurre el rompimiento de las micelas de los biosurfactantes. El biosurfactante en los medios se encuentra en una concentración de 400 a 20000 veces por encima de su concentración micelar crítica. Los biosurfactantes que son eficientes tienen una concentración micelar crítica baja, la cual significa que es necesario utilizar menos biosurfactante para disminuir la tensión superficial [4].

4.3 Caracterización del Biosurfactante

4.3.1 Determinación de HLB

Para encontrar el balance hidrofílico-lipofílico se realizaron mezclas a diferentes concentraciones de un surfactante conocido como el Tween 80 con HLB igual 15 y el biosurfactante con HLB desconocido, la mezcla se agitó durante 2 minutos en un vortex. Al realizar la mezcla se observó una emulsión estable sin observar separación de fases y

con un color claro con un HLB de 10. Para encontrar el HLB del Biosurfactante se procedió a utilizar la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 2} \quad HLB(\text{mezcla}) = HLB(\text{Tween 80}) * \text{Fracción Tween 80} + HLB(\text{Biosurfactante}) * \text{Fracción Biosurfactante}$$

$$13 = 15 * 0.4 + HLB(\text{Biosurfactante}) * 0,6$$

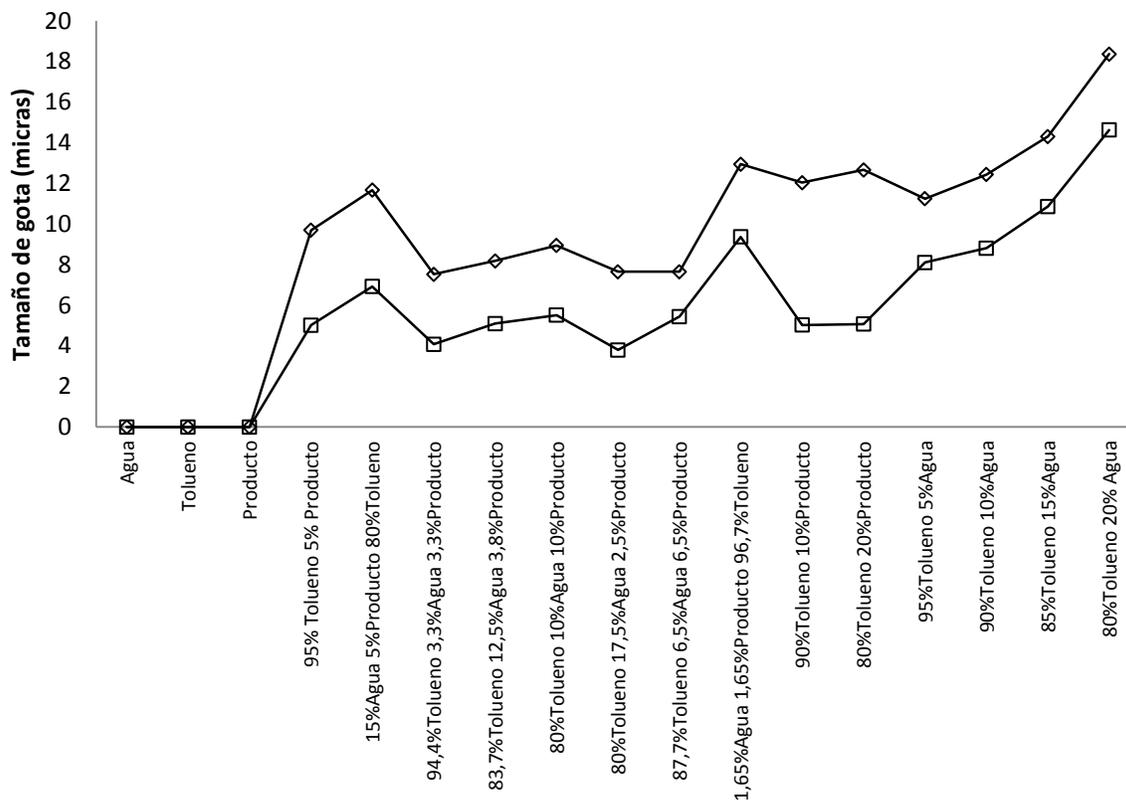
$$HLB(\text{Biosurfactante}) = 11$$

De acuerdo con la Tabla 4 el biosurfactante obtenido se puede considerar como un emulsificante de aceite en agua y se puede utilizar como solubilizante.

4.3.2 Análisis de tamaño de gota

En las Tablas 16 y 17 del ANEXO C se muestran las fotografías del tamaño de gota en función de la concentración del biosurfactante, tolueno y agua al tiempo inicio y al tiempo final de prueba. En la Figura 12 se puede observar un comportamiento creciente del diámetro de gota a medida que se aumenta la concentración del biotratamiento en las emulsiones. Este comportamiento denominado *Ostwald Ripening* o engrosamiento de las gotas es un mecanismo de desestabilización de emulsiones que ocurre principalmente en emulsiones con gotas muy finas. El engrosamiento de las gotas se basa en el transporte y solubilidad de la fase dispersa en la fase continua [113]. Las emulsiones aceite en agua se estabilizan principalmente por interacciones electrostáticas. La fuerza iónica de la fase continua tiene una fuerte influencia en el potencial zeta de las gotas de aceite por lo tanto controla las interacciones electrostáticas, influenciando la estabilidad de la emulsión [114].

Figura 12. Tamaño de gotas promedio en micras para las diferentes emulsiones. Los valores con (□) representan el tiempo inicial y (◇) representan el tiempo final.

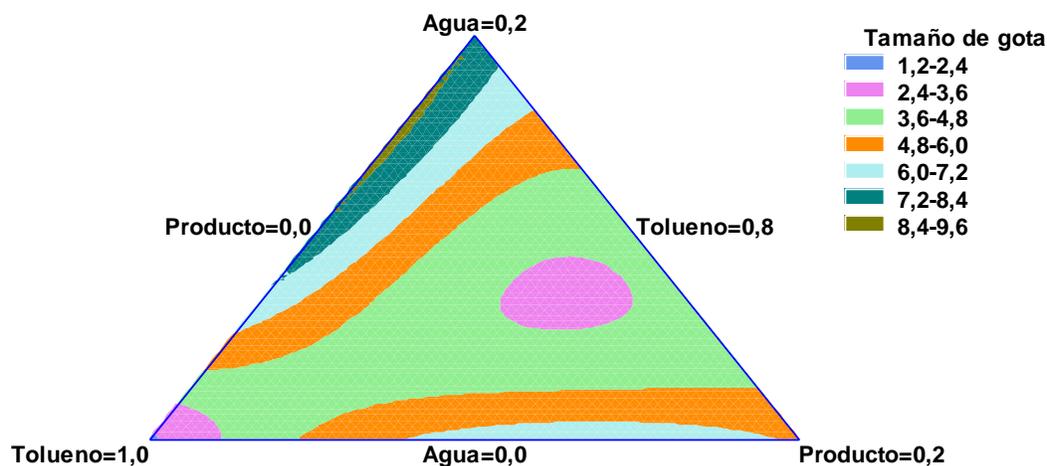


La distribución del tamaño de gota en un proceso de emulsificación es el resultado de la competencia de dos procesos opuestos, el rompimiento de las gotas y la coalescencia de las gotas. El resultado de la emulsión depende de cuatro factores principales: (1) condiciones en el dispositivo de mezcla, (2) relación de viscosidad, (3) fracción de volumen de las fases de aceite y agua, y (4) tipo y concentración de emulsionante usado.

En la Figura 13 se muestran las superficies de respuesta obtenidas con el programa STATGRAPHICS y se observa que el mayor tamaño de gota se obtiene al disminuir la cantidad de biosurfactante y aumentar la cantidad de tolueno en la fase acuosa.

En esta zona se obtuvieron los mayores tamaños de gota con valores entre 8,4 y 9,6. Se puede observar que al agregar el biosurfactante a la mezcla aceite agua se disminuyen los tamaños de gota. Por lo tanto se puede predecir una alta probabilidad de que no existan problemas de taponamiento de los poros si se presentan este tipo de emulsiones.

Figura 13. Diagrama del tamaño de gota con tolueno, agua y biotratamiento a 25°C.



En la tabla 11. Se presentan los parámetros estimados que describen el tamaño de gota mediante el modelo cubico especial. Este modelo predice la variable de respuesta cuando R^2 se encuentra entre 0.78 y 0.86.

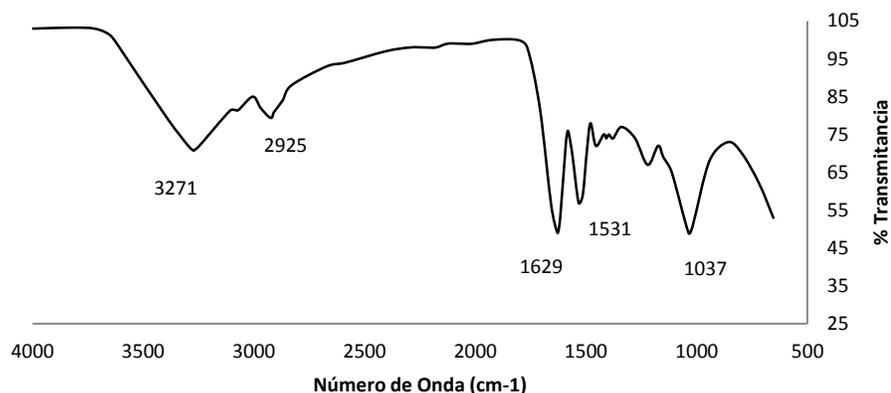
Tabla 11. Parámetros para el modelo cubico especial para el tamaño de gota.

Sistema	Parámetros							
	B_1	B_2	B_3	B_{12}	B_{13}	B_{23}	B_{123}	R^2
Biotratamiento a 25°C	4,07105	0,633679	6,81102	6,46062	- 6,27401	20,2	- 115,949	80,34

4.3.3 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

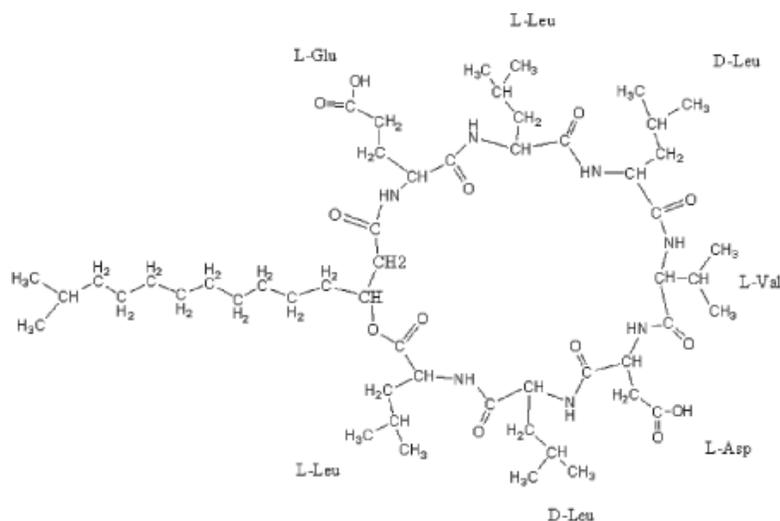
La composición molecular del biosurfactante se analizó mediante la técnica del infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR). En la Figura 14 se puede observar el espectro del biosurfactante de la cepa LAC12 de *Lactobacillus fermentum*. Los resultados se compararon con datos de infrarrojo obtenidos para la producción de biosurfactantes con diferentes cepas microbianas.

Figura 14. Espectro FTIR del biosurfactante obtenido de las células de la cepa LAC12 de *Lactobacillus fermentum* en medio M2 a 37°C y 200 rpm.



En los resultados de FTIR encontrados en diferentes trabajos se pueden observar comúnmente lipopéptidos producidos por especies de *Bacillus* [115], ramnolípidos producidos por especies de *Pseudomonas* [116], glicolípidos con carbohidratos y lípidos producidos por especies de *Lactobacillus* [107] y levadura como *Trichosporon* [117]. El rango de bandas entre 3000-3700 cm⁻¹ con un máximo de 3271,36 cm⁻¹ representa las vibraciones de los grupos –OH, –CH y –NH las cuales son características de compuestos que contienen carbono con grupos amino propios de cadenas de péptidos [118, 119, 120]. En la figura 15 se puede observar la surfactina, la cual podría ser un estimativo de la estructura molecular de biosurfactantes producidos por especies *Bacillus* spp. *Lactobacillus* spp.

Figura 15. Estimativo de la estructura molecular del biosurfactantes producidos por especies *Bacillus* spp, *Lactobacillus* spp [121].

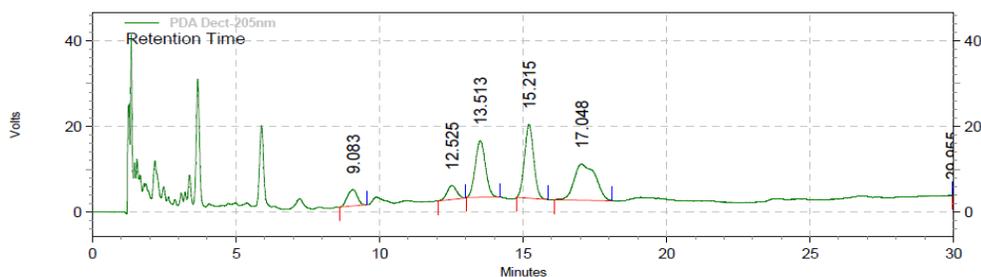


La banda ubicada en $2925,93\text{ cm}^{-1}$ representa los grupos alifáticos; se observó una banda fuerte a 1629 cm^{-1} lo cual significa la presencia del grupo éster $\text{C}=\text{O}$ [122], la banda $1531,67\text{ cm}^{-1}$ representa el grupo nitro $\text{N}=\text{O}$ propios de proteínas, la banda $1454,59\text{ cm}^{-1}$ representa el doblamiento de las bandas $\text{O}-\text{H}$ en el ácido carboxílico y vibraciones de los grupos CH_3 , CH_2 y CH ; Otra banda se encuentra entre 1300 y 1000 cm^{-1} indicando presencia de grupos $\text{C}-\text{O}$ propios del azúcar como polisacáridos. Los grupos funcionales obtenidos a partir del espectro fueron similares a los grupos funcionales detectados en bacterias ácido lácticas (*L.lactis*, *L.paracasei* y *S. thermophilus*) [123]. De acuerdo con los grupos funcionales el biosurfactante se puede clasificar como un biosurfactante no iónico. Los grupos hidrofílicos consisten en mono o polisacáridos, ácidos carboxílicos, aminoácidos o péptidos y las moléculas hidrofóbicas son usualmente saturadas o insaturadas o ácidos grasos hidroxilados [4, 124].

4.3.4 Resultados de la Cromatografía líquida de Alta eficacia (HPLC)

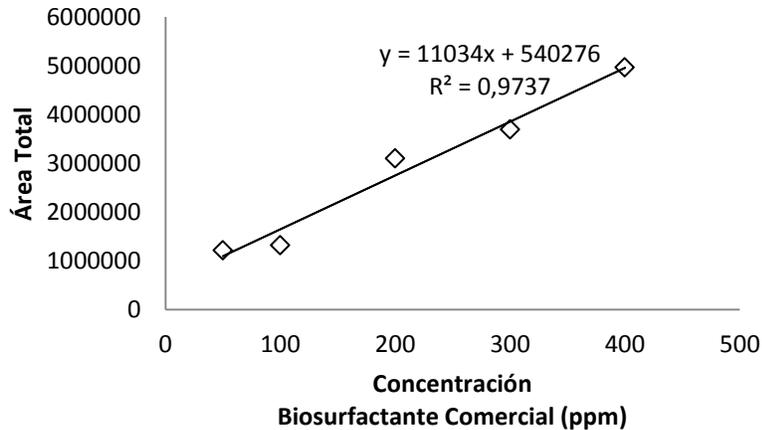
En la Figura 16 se muestra el cromatograma de HPLC de un biosurfactante (Surfactina, Sigma pureza 98%, 100 ppm) el cual se utiliza como referencia para la cuantificación del biotensoactivo. Como se puede ver en la Figura 16 para la surfactina pura se encontraron 5 picos observados entre el minuto 9 hasta el minuto 17 los cuales mostraron mayor actividad.

Figura 16. Cromatograma de HPLC para Biosurfactante convencional (Sigma 98% pureza) a 100 ppm.



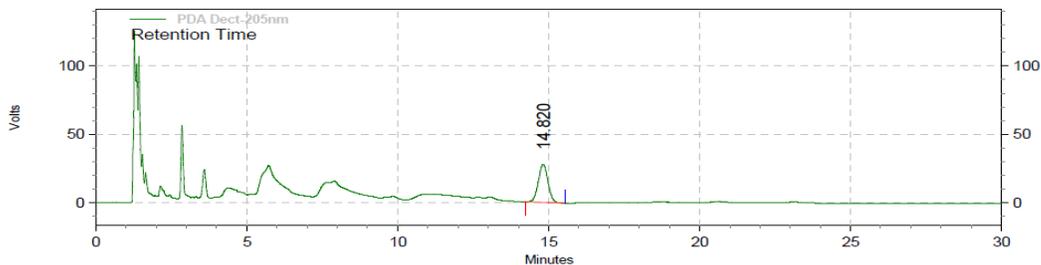
Con los picos observados en el cromatograma se procedió a sumar las áreas para luego trazarlas como una función de la concentración de la surfactina como se muestra en la Figura 17 [125]. Con la curva de calibración se calculó la concentración de biosurfactante en la muestra [126].

Figura 17. Curva de calibración para el biosurfactante convencional la cual es función del Área total y de la concentración de la muestra.



En la Figura 18 se presenta el cromatograma de HPLC para el biosurfactante a partir de *Lactobacillus Fermentum*.

Figura 18. Cromatograma de HPLC para Biosurfactante a partir de *Lactobacillus fermentum* obtenido a 37°C, 200 rpm, utilizando como fuente de carbono Melaza durante tres días.



Al interpolar en la gráfica se obtiene una concentración de 89 ppm, dado que se hizo una dilución de 1:10, el resultado final es de 898 ppm para la bacteria *Lactobacillus fermentum* LAC12 con el medio M2 a 37°C, 200 rpm utilizando como fuente de carbono melaza durante tres días. Estos resultados se comparan con el trabajo realizado por L.R. Rodriguez [6], en el cual utilizó *Lactococcus lactis* utilizando como fuente de carbono suero y melaza; obteniendo una producción de biosurfactante entre 693 ppm y 1735 ppm.

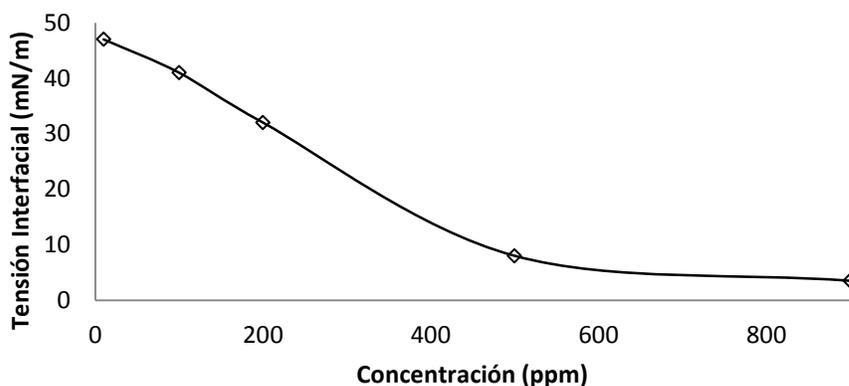
4.4 Prueba de inyección de Biosurfactante

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la prueba de tensión superficial, prueba de compatibilidad y prueba de desplazamiento utilizando crudo Acordionero y biosurfactante a 75°C.

4.4.1 Tensión Interfacial [127]

Según los resultados obtenidos en la Figura 19 se puede observar que a una concentración de biosurfactante de 900 ppm en contacto con crudo de 15.3°API y 75°C se obtienen valores de tensión interfacial de 3,5 mN/m. De acuerdo a esta gráfica se seleccionó la concentración de 500 ppm (debido a que es una concentración cercana de la concentración crítica micelar) para realizar la prueba de desplazamiento que se muestra en el numeral 4.4.3. Varios autores han reportado que ha bajas concentraciones de biosurfactantes (cercanas a la CMC) son suficientes para movilizar el crudo atrapado [128, 129, 130].

Figura 19. Resultados de Prueba de tensión interfacial entre Biosurfactante y crudo



Se ha encontrado en reportes que la tensión interfacial de la mezcla hexadecano-agua es disminuida con surfactantes desde 40 mN/m hasta 1mN/m. A continuación se muestran algunos biosurfactantes y los valores obtenidos de concentración micelar crítica, tensión superficial e interfacial.

En la siguiente tabla se puede comparar los valores hallados para diferentes biosurfactantes con el valor obtenido en este proyecto. Se puede decir que se tienen valores cercanos por lo tanto comprueban la presencia de biosurfactantes en el sobrenadante obtenido después de la fermentación.

Tabla 12. Algunas propiedades de diferentes biosurfactantes obtenidos a partir de microorganismos [127].

Biosurfactante	Organismo productor	Tensión superficial (mN/m)	CMC (mg/L)	Tensión Interfacial (mN/m)
Cellobioselipids	<i>Ustilago</i> sp.	30	20	<1
Corynomycolates	<i>Arthobacter</i> sp.	33-46	1-19	1-19
Rhamnolípido	<i>Pseudomonas</i> sp.	25-31	10-200	<1-4
Soforolípidos	<i>Torulopsis</i> sp.	25-35	60-82	1-9
Lipopéptidos	<i>Bacillus lincheniformis</i>	27	0,02-10	<1
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>	27	5	1

De acuerdo con reportes de la literatura, surfactantes sintéticos no iónicos como el nonylfenol 4 y nonylfenol 9 permiten obtener valores de la tensión interfacial de 1,7 mN/m y 2,8 mN/m respectivamente [131]. Por otro lado, surfactantes sintéticos aniónicos como los biosurfactante de la familia de alquil-sulfato pueden disminuir la tensión interfacial entre 0,001 mN/m y 0,01 mN/m [132].

4.4.2 Prueba de Compatibilidad

Se realizó la prueba de compatibilidad diluyendo el biosurfactante a diferentes concentraciones (900, 500, 90 y 10) y mezclándolo con crudo en diferentes proporciones (20% Crudo/80% biotratamiento, 50% Crudo/50% biotratamiento y 80% Crudo/20% biotratamiento) a 75°C. Los resultados obtenidos para las concentraciones 900, 90 y 10 se observan en el ANEXO D. Los resultados para la prueba de compatibilidad a la concentración de biosurfactante a 500 ppm se observan en la Tabla 13 y en la Figura 20.

Tabla 13. Resultados de Prueba de compatibilidad para la concentración de biosurfactante de 500 ppm

Tiempo (min)	20%Crudo-80%Biotratamiento				Observaciones	50%Crudo-50%Biotratamiento				Observaciones	80%Crudo-20%Biotratamiento				Observaciones
	%FO	%FT	%EM	%ES		%FO	%FT	%EM	%ES		%FO	%FT	%EM	%ES	
0	-	-	100	-		-	-	100	-		-	-	100	-	
1	22	76	-	2	Se empieza a ver la separación, el color de la fase acuosa es turbio, se observa 2% espuma	-	-	100	-	Se empieza a ver la separación, el color de la fase acuosa es turbio, se observa 2% espuma	-	20	78	2	Se empieza a ver la separación, el color de la fase acuosa es translucido, se observa 2% espuma en la superficie
3	20	78	-	2		50	48	-	2		-	20	78	2	
5	20	78	-	2		50	48	-	2		-	20	78	2	
10	20	78	-	2		50	48	-	2		-	20	78	2	
30	20	78	-	2	Color de la fase acuosa es turbio, no se observa espuma y se observan partículas suspendidas en tratamiento	50	50			Color de la fase acuosa es ligeramente turbio, no se observa espuma y no se observan partículas suspendidas en tratamiento	-	20	80	-	Se empieza a ver la separación, el color de la fase acuosa es translucido, no se observa espuma en la superficie
60	20	78	-	2		50	50				-	20	80	-	
120	20	78	-	2		50	50				-	20	80	-	
180	20	78	-	2		50	50				-	20	80	-	

Figura 20. Resultados obtenidos en el tiempo inicial y tiempo final para la prueba de compatibilidad con una concentración de biosurfactante de 500 ppm



20%C-80%T



50%C-50%T



80%C-20%T

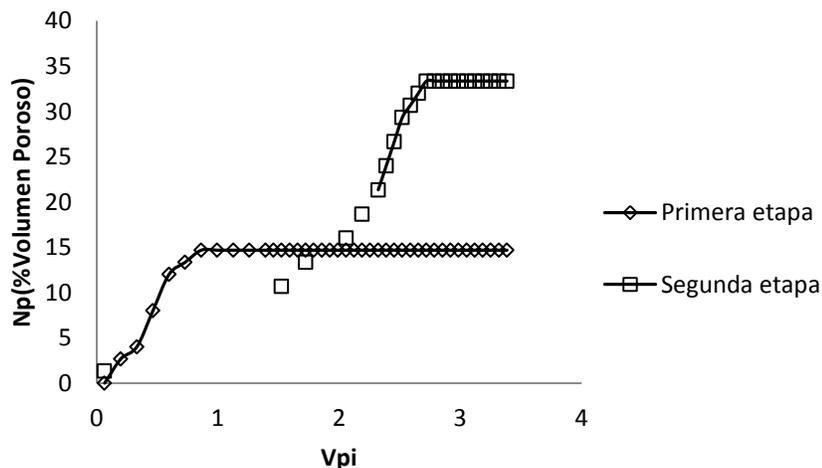
20%C-80%T
1 min
Partículas50%C-50%T
3 minutos80%C-20%T
1 min

Para la relación 20%-80% y 80%-20% (crudo-biotratamiento) se observa una separación de fases después del primer minuto. Para esta misma relación se observó formación de espuma en la superficie de la emulsión; para la relación 50%-50% se puede observar después del 3 minutos y no se observó formación de espuma en la superficie. No se observaron partículas suspendidas en la fase acuosa, esto puede ser una ventaja ya que si se encuentran partículas suspendidas podría ocasionar daños en el medio poroso del yacimiento.

4.4.3 Prueba de Desplazamiento

El tratamiento utilizado permitió aumentar el factor de recobro de petróleo como se observa en la figura 21, en la cual se pueden diferenciar dos etapas. En la primera, cuando se inyecta agua, se observa que a tres volúmenes porosos inyectados se obtiene alrededor de un 15% de petróleo recuperado. La permeabilidad absoluta del sistema es de 700 mD. En la segunda etapa, cuando se inyecta biosurfactante, se observa que al segundo volumen poroso inyectado, el porcentaje de petróleo recuperado es mayor que con la inyección del agua. La permeabilidad efectiva en esta etapa es de 500 mD. Adicionalmente, se observa que la cantidad recuperada de petróleo al tercer volumen poroso inyectado es de alrededor del 33%. Es decir se tarda más la recuperación de petróleo con el tratamiento con biosurfactante, pero se obtiene un 18% más de petróleo.

Figura 21. % de recobro de petróleo en la primera etapa de inyección de agua y en la segunda etapa de inyección de biosurfactante.



En la patente WO 1992015771 A1 se utilizaron bacterias ácido lácticas (genero *Lactobacillus* o *Pediococcus*) para operaciones de recobro mejorado de petróleo in situ. Estas bacterias fueron capaces de producir compuestos como el ácido láctico y biosurfactantes los cuales contribuyeron al recobro de petróleo. Soudmand-asli et al [133] investigaron el uso potencial de *Bacillus subtilis* y *Leuconostoc mesenteroides* para recobro mejorado de petróleo en medios porosos fracturados. Los resultados mostraron que las bacterias recuperaron un porcentaje de petróleo en un rango de 10-40%. Al utilizar *Bacillus lincheniformis* los investigadores reportaron una eficiencia de recobro en el rango de 9,3-22,1% [134]. Otros investigadores [134] aislaron cuatro cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de varios campos de la India y estudiaron la eficiencia de los biosurfactantes obtenidos en el medio de cultivo usando un lecho empacado. Los resultados obtenidos mostraron un recobro de petróleo en un rango de 30-60% dependiendo de la temperatura utilizada para los experimentos.

A partir de los experimentos llevados a cabo y con bibliografía encontrada se puede afirmar que el porcentaje de recobro de petróleo depende de muchos factores, por ejemplo: de las condiciones iniciales de la prueba como los fluidos utilizados, temperatura, presión, la permeabilidad del núcleo, los equipos utilizados y su precisión. Sin embargo los resultados obtenidos en este trabajo se encuentran en el rango de porcentaje de petróleo obtenido por otros investigadores.

5. Conclusiones

A partir de este estudio experimental orientado a producir un biosurfactante y evaluar su utilización en procesos de recobro mejorado de petróleo, se pueden inferir las siguientes conclusiones:

Los aislados de suero láctico del Bajo Cauca Antioqueño se identificaron como *Lactobacillus fermentum* strain NBRC 1885. Con el *screening* se determinó que las cepas productoras de biosurfactantes eran las siguientes: LAC05, LAC10 y LAC12. Se determinó por medio de la experimentación que los métodos más confiables para detectar la presencia de biosurfactante fueron el colapso de gota y la disminución de la tensión superficial. Estos métodos permiten manejar un gran número de muestras utilizando poca cantidad de solución de biosurfactante.

Se determinó que la temperatura óptima de crecimiento de las cepas era de 37°C, ésta temperatura fue la que se utilizó en todos los experimentos para la producción de biosurfactantes.

Según el análisis estadístico que se llevó a cabo, se determinó que hay un efecto significativo para los factores Bacterias*Medio y Medio*Fuente de carbono en la producción de biosurfactantes.

Se observó que la mejor interacción entre los factores (bacterias, medio y fuente de carbono) fue la combinación de la cepa LAC12, medio M2 y fuente de carbono Melaza; la cual fue la mejor interacción para producción de biosurfactantes ya que se obtuvo el menor valor para la variable de respuesta (tensión superficial).

Los biosurfactantes obtenidos con las bacterias ácido lácticas fueron capaces de reducir la tensión superficial del medio de cultivo desde 60,5 mN/m a 33,2 mN/m, lo que indica una reducción del 45% en la tensión superficial. La dilución micelar crítica osciló entre 0,005% y 0,25%. El biosurfactante se encuentra en una concentración de 400 a 20000 veces por encima de su concentración micelar crítica.

De acuerdo al balance lipofílico-hidrofílico se determinó que el biosurfactante es un emulsificante de aceite en agua y se puede utilizar como un solubilizante.

Al observar el tamaño de gota en función del tiempo y de la concentración de biosurfactante e hidrocarburo se observa un comportamiento creciente a medida que aumenta la concentración del biotratamiento. Esto nos puede indicar que se forman las emulsiones pero se desestabilizan a medida que transcurre el tiempo. Un problema muy común en los yacimientos es que las emulsiones permanecen estables al utilizar la inyección con surfactantes sintéticos por lo tanto el uso de este biosurfactante podría ayudar a incrementar el factor de recobro sin generar este tipo de problemas.

Con el análisis por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se observaron compuestos que contienen carbono con grupos amino propios de cadenas pépticas. Se encontró la presencia de grupos alifáticos, grupos éster, grupos nitro propios de proteínas y grupos C-O propios de polisacáridos. Los grupos funcionales obtenidos fueron similares a los grupos funcionales obtenidos con los biosurfactantes de bacterias ácido lácticas (*L.lactis*, *L.paracasei* y *S. thermophilus*).

Con la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se determinó que la concentración de biosurfactante obtenida al realizar la fermentación fue de 900 ppm. Se encontró que la tensión interfacial entre el agua y el crudo disminuyó hasta 3,5 mN/m esto indica que estos compuestos pueden ser utilizados para la disminución de la tensión superficial de agua y el petróleo ayudando a aumentar el factor de recobro.

Se pudo observar una buena compatibilidad entre el crudo y el biosurfactante a diferentes concentraciones ya que no se observaron partículas suspendidas en la emulsión, ni se observaron emulsiones estables al final de la prueba. Es una gran ventaja ya que demuestra que el biotratamiento se puede aplicar a un medio poroso sin causar graves daños en un yacimiento.

El biosurfactante obtenido demostró ser efectivo en el recobro de petróleo ya que aumentó en un 18% la producción de petróleo en comparación con el petróleo recuperado con una inyección convencional de agua.

5.1 Recomendaciones

En este estudio se obtuvo presencia de agentes tensoactivos en bacterias ácido lácticas pero se sugiere que para una próxima investigación se lleve a cabo un aislamiento de bacterias nativas de campos contaminados de petróleo ya que pueden ser mayores productoras de biosurfactantes.

Se recomienda realizar un estudio de purificación de los biosurfactantes y analizar más a fondo la estructura química del Biosurfactante con otras técnicas como espectrometría MALDI-TOF, espectroscopia NMR.

Se recomienda realizar un estudio de los biosurfactantes a diferentes temperaturas y presiones para evaluar su comportamiento y determinar su aplicabilidad en diferentes campos petroleros. Se recomienda estudiar la interacción de los biosurfactantes entre fluidos-rocas para su aplicación en campos petroleros.

Se recomienda realizar pruebas de adsorción del biosurfactante en la roca con presencia de nanopartículas hidrofílicas e hidrofóbicas para determinar el comportamiento fluido-fluido y determinar el factor de recobro.

6. Bibliografía

- [1] «Sivapathasekaran, C., Mukherjee, S., Ray, A., Gupta, A., Sen, R., 2010. Artificial neuralnetwork modeling and genetic algorithm based medium optimization for the improved production of marine biosurfactant. *Bioresour. Technol.* 101,2884–2887.».
- [2] «Kiran, S.G., Thomas, T.A., Selvin, J., Sabarathnam, B., Lipton, A.P., 2010. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. *Bioresour. Technol.* 101, 2389–2396.».
- [3] «Satpute, S.K., Banat, I.M., Dhakephalkar, P.K., Banpurkar, A.G., Chopade, B.A., 2010. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 28, 436–450.».
- [4] «Desai J.D.; Banat Desai J.D.; Banat I.M. (1997). Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, p. 47-64.».
- [5] «Mukherjee, S., Das, P. and Sen, R. Towards commercial production of microbial surfactants.2006, *Trends Biotech.*, 24:509-515».
- [6] «Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A. and Oliveira, R. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. 2006, *Biochem. Eng. J.*, 32:135-142.».
- [7] «Sen, R. and Swaminathan, T. 2005, *Process Biochem.*, 40:2953-2958.».
- [8] «Kosaric, N. 1992, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 64:1731–1737».
- [9] « Makkar, R. and Cameotra, S. 2002, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58:428–434.».

- [10] «Mercade, M.E., Manresa, J. The use of agroindustrial by products for biosurfactant production. *J. Am. Oil Chem Soc*, 71, pp. 61-64. 1994».
- [11] «Masaaki, K., Shinro, N. Tokuma, Fukuoka. Deep sea *Rhodococcus* sp, Lacking the phytopathogenic *fas* genes, produces a Novel glucotriose lipid biosurfactant. *Mar Biotechnol* (2014) 16:484-493.».
- [12] «Freeman, W. *Biochemistry*. Sixth edition. Reverté-Aguilar. 2007. ISBN 978-84-2917600-1.».
- [13] «Fornaguera, J., Gomez, G. *Bioquímica*. Editorial Universidad Estatal a Distancia. ISBN 9968-31-326-2.».
- [14] «Koolman, J., Heinrich, R. *Bioquímica: texto y atlas*. 3ª ed. Madrid: Medica Panamericana, 2004. ISBN 84-7903-724-5.».
- [15] «Roongsawang, N., Washio, K. and Morikawa, M. Diversity of Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Biosynthesis of Lipopeptide Biosurfactants. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 141-172. 2011. ISSN 1422-0067.».
- [16] «Abdel-Mawgoud, A.M., Lepine, F., Déziel, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010. 86, 1323-36.».
- [17] «Arima, K., Kakinuma, A., Tamura, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1968. 488-94.».
- [18] «Ron, E. and Rosenberg, E. (2001) Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology* 3: 229-236.».
- [19] «Rendell NB, Taylor GW, Somerville M, Todd H, Wilson R, Cole J (1990) Characterization of *Pseudomonas rhamnolipids*. *Biochim Biophys Acta* 1045: 189-193.».
- [20] «Sim L, Ward OP, Li ZY (1997) Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J Ind Microbiol Biol*. 19:232–238».
- [21] «Lang S, Wagner F (1987) Structure and properties of biosurfactants. In: Kosaric N, Cairns WL, Gray NCC (eds) *Biosurfactants and biotechnology*, vol 25, Surfactant science series. Marcel Dekker, New York, pp 21-47.».
- [22] « Arino S, Marchal R, Vandecasteele JP (1996) Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol. Biotechnol*

45(1–2):162–168.».

- [23] «Parra JL, Guinea J, Manresa MR, Mercade ME, Comelles F, Bosch MP (1989) Chemical characterization and physico-chemical behaviour of biosurfactants. *J Am Oil Chem Soc* 66:141–145».
- [24] «Ristau E, Wagner F (1983) Formation of novel anionic trehalose-tetraesters from *Rhodococcus erythropolis* under growth limiting conditions. *Biotechnol Lett* 5:95–100.».
- [25] «Kim JS, Powalla M, Lang S, Wagner F, Lunsdorf H, Wray V (1990) Microbial glycolipid production under nitrogen limitation and resting cell conditions. *J Biotechnol* 13:257–266».
- [26] «Lang S, Philip JC (1998) Surface active lipids in Rhodococci. *Anton Leeuw Int* 74:59–70.».
- [27] «Li ZY, Lang S, Wagner F, Witte L, Wray V (1984) Formation and identification of interfacial-active glycolipids from resting microbial cells of *Arthrobacter* sp. and potential use in tertiary oil recovery. *Appl Environ Microbiol* 48:610–617».
- [28] «Cooper DG, Liss SN, Longay R, Zaic JE (1989) Surface activities of *Mycobacterium* and *Pseudomonas*. *J Ferment Technol.* 59:97-101.».
- [29] «Inoue S, Itoh S (1982) Sophorolipids from *Torulopsis bombicola* as microbial surfactants in alkane fermentation. *Biotechnol Lett* 4:308–312».
- [30] «Davila AM, Marchal R, Vandecasteele JP (1997) Sophorose lipid fermentation with differentiated substrate supply for growth and production phases. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:496–501».
- [31] «Yakimov MM, Golyshin PN (1997) ComA-dependent transcriptional activation of lichenysin A synthetase promoter in *Bacillus subtilis* cells. *Biotechnol Prog* 13:757–761».
- [32] «Abraham WR, Meyer H, Yakimov M (1998) Novel glycine containing glucolipids from the alkane using bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Biochim Biophys Acta* 1393(1):57–62».
- [33] «Cutler AJ, Light RJ (1979) Regulation of hydroxydocosanoic and sophoroside production in *Candida bogoriensis* by the level of glucose and yeast extract in the growth medium. *J Biol Chem* 254:1944–1950».

- [34] «Neu TR, Poralla K (1990) Emulsifying agent from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32:521-525.».
- [35] «Arima K, Kahinuma A, Tamura G (1968) Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem Biophys Res Commun* 31:488–494».
- [36] «Wei YH, Chu IM (1998) Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Enzyme Microb Technol* 22:724–728».
- [37] P. A. G. D. G. D. (. E. o. A. R.-1. s. o. h. s. A. E. M. 3. Rosenberg E.
- [38] «Kaplan N, Rosenberg E (1982) Exopolysaccharide distribution and bioemulsifier production in *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. *Appl Environ Microbiol* 44:1335–1341».
- [39] «Navon-Venezia S, Zosim Z, Gottlieb A, Legmann R, Carmeli S, Ron EZ, Rosenberg E (1995) Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl. Environ Microbiol* 61: 3240-3244.».
- [40] «Gutierrez T, Mulloy B, Bavington C, Black K, Green DH (2007) Partial purification and chemical characterization of a glycoprotein (putative hydrocolloid) emulsifier produced by a marine bacterium *Antarctobacter*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 1017-1026.».
- [41] «Rosenberg E (1993) Exploiting microbial growth on hydrocarbon: new markets. *Trends Biotechnol.* 11:419–424».
- [42] «Kaeppeli O, Walther P, Mueller M, Fiechter A (1984) Structure of cell surface of the yeast *Candida tropicalis* and its relation to hydrocarbon transport. *Arch Microbiol* 138:279–282».
- [43] «Cirigliano MC, Carman GM (1984) Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 50:846–850.».
- [44] «Persson A, Oesterberg E, Dostalek M. (1988) Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 378: growth and product characteristics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29: 1-4.».
- [45] «Maneerat S, Bamba T, Harada K, Kobayashi A, Yamada H, Kawai F (2006) A novel crude oil emulsifier excreted in the culture supernatant of a marine bacterium, *Myroides* sp. Strain SM1. *Appl Microbiol Biotechnol* 70:254-259.».

-
- [46] «De Acevedo GT, McInerney MJ (1996) Emulsifying activity in thermophilic and extremely thermophilic microorganisms. *J Ind Microbiol* 16:17–22.».
- [47] «Appaiah AKA, Karanth NGK (1991) Insecticide specific emulsifier production by hexachlorocyclohexane-utilizing *Pseudomonas tralucida* Ptm+ strain. *Biotechnol Lett* 13:371–374.».
- [48] «Gunjar M, Khire JM, Khan MI (1995) Bioemulsifier production by *Bacillus stearothermophilus* VR8 isolate. *Lett Appl Microbiol* 21:83–86.».
- [49] «Ashtaputre AA, Shah AK (1995) Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. *World J Microbiol Biotechnol* 11:219–222.».
- [50] «Burd G, Ward OP (1996) Physicochemical properties of PM-factor, a surface-active agent produced by *Pseudomonas marginalis*. *Can J Microbiol* 42:243–252.».
- [51] «Bonilla M, Olivaro C, Corona M, Vazquez A, Soubes M (2005) Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. *J Appl Microbiol* 98:456–463.».
- [52] «Lebrón-Paler, A. Solution and interfacial characterization of Rhamnolipid biosurfactant from *P. aeruginosa* ATCC 9027. Department of chemistry. University of Arizona. 2008. UMI Number: 3336895.».
- [53] «Canache, M.C. Tesis: Estudio sobre la aplicabilidad de la inyección ASP (Alcalino-Surfactante-Polímero) para el mejoramiento de la producción de crudos pesados. Universidad de Oriente. Maturín, Venezuela. 2006.».
- [54] «M. Velraeds, H. van der Mei, G. Reid, H. Busscher, Physico-chemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains, *Colloid Surface B* 8 (1996) 51-61.».
- [55] «J. Desai, A. Desai, Biosurfactants: production, in *Properties and Applications*, Marcel Dekker, New York, 1993, pp. 65-97.».
- [56] «K, Hofvendahl, B. Hahn-Hagerdal. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Technol.* 26 (2000) 87-107.».
- [57] «Cameotra, S. S., Makkar, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *App. Microbiol. Biotechnol.* (1998) 50: 520-529.».

- [58] «Mulligan, CN., Safi, BF. Continuous production of ammonium lactate by *Streptococcus cremoris* in a three-stage reactor. *Biotechnol Bioeng* 1991; 38: 1173-81.».
- [59] «Silva EM, Yang ST. Kinetics and stability of a fibrous-bed bioreactor for continuous production of lactic acid from unsupplemented acid whey. *J Biotechnol* 1995; 41: 59-70.».
- [60] «Timmer JMK, Kromkamp J. Efficiency of lactic acid production by *Lactobacillus helveticus* in a membrane cell recycle reactor. *FEMS Microbiol Rev.* 1994; 14: 29-38.».
- [61] «Lilla Focus. Focus Uppslagsbocker AB, Stockholom, Sweden, 1975.».
- [62] «Tsai TS, Millard CS. Improved pretreatment process for lactic acid production. PCT Int Appl Patent 1994 (june 23); WO 94/13826: PCT/US93/11759.».
- [63] «Chiarini L, Mara L, Tacacchioni S. Influence of growth supplements on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992; 36: 461-4.».
- [64] «Cavazzoni V, Manzoni M, Craveri R. Ammonium lactate from deproteinized alfalfa juice by *Streptococcus faecium*. *J Ind Microbiol* 1988; 22: 199-204.».
- [65] «Yumoto I, Ikeda K. Direct fermentation of starch to L-Lactic acid using *Lactobacillus amylophilus*. *Biotechnol Lett* 1995; 17:543-6.».
- [66] «Hujanen M, Linko Y-Y. Effect of temperatura and various nitrogen sources on L-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1996; 45:307-13.».
- [67] «Mulligan, C.N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133, 183-198. 2005.».
- [68] «Mukherjee, S., Das, P. & Sen, R. 2006. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*, 24, 509-515.».
- [69] «Sen, R., Swaminathan, T., 2005. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. *Process Biochemistry* 40, 2953–2958».
- [70] «Sen R, Swaminathan T., “Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production”,

Biochem Engg J, 21,241-248.».

- [71] «Dubey, K.V., Juwarkar, A. A., Singh, S. K. Adsorption-desorption process using Wood-based activated carbón for recovery of biosurfactant from fermented distillery wastewater. *Biotechnol Prog.* 2005. 860-7.».
- [72] «MESQUITA, A.C. 2004. Uso de las técnicas de oxidación química y biodegradación en la remoción de algunos compuestos recalcitrantes. Tesis de Doctorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.».
- [73] «Tugrul, T., Cansunar, E. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* (2005) 21: 851-853.».
- [74] «Bodour, A.A., Miller-Maier, R.M., 1998. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening methods 32, 273-280.».
- [75] «Banat IM (1993) The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. *Biotechnol Lett* 15: 591-594.».
- [76] «Yonebayashi H, Yoshida S, Ono K, Enomoto H (2000) Screening of microorganisms for microbial enhanced oil recovery process. *Sekiyu Gakkaishi* 43: 59-69.».
- [77] «Volchenko NN, Karasev SG, Nimchenko DV, Karaseva EV (2007) Cell hydrophobicity as a criterion of selection of bacterial producers of biosurfactants. *Microbiology* 76: 112-114.».
- [78] «Tuleva BK, Ivanov RG, Christova NE (2002) Biosurfactant production by an new *Pseudomonas putida* strain. *Z Naturforsch* 57: 356-360.».
- [79] «Bodour AA, Miller-Maier R (1998) Application of a modified dropcollapse technique for surfactant quantification and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Methods* 32: 273-280.».
- [80] «Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, et al. (2004) Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J Microbiol Methods* 56: 339-347.».
- [81] «Afshar S, Lotfabad TB, Roostaazad R, Najafabadi AR, Noghabi AK (2008). Comparative approach for detection of biosurfactant-producing bacteria isolated from Ahvaz petroleum excavation areas in south of Iran. *Ann Microbiol* 58: 555-

560.».

- [82] «Satpute SK, Bhawsar BD, Dhakephalkar PK, Chopade BA (2008) Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. *Indian J Mar Sci* 37: 243-250.».
- [83] «Persson, A., Molin, G. Capacity for biosurfactant production of environmental *Pseudomonas* and *Vibrionaceae* growing on carbohydrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26, pp. 439–442. 1987».
- [84] «Symmank H, Franke P, Saenger W, Bernhard F (2002). Modification of biologically active peptides: Production of a novel lipohexapeptide after engineering of *Bacillus subtilis* surfactine synthetase. *Protein Eng.* 15: 913-921.».
- [85] «Aguilar M-L (2004) *Methods in molecular biology. In HPLC of Peptides and Proteins; Methods and Protocols.* Aguilar ML, Ed. Totowa, NJ: Humana Press.».
- [86] «Smyth, T.J.P., Perfumo, A., McClean, S., Marchant, R., Banat, I.M. Isolation and Analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants. *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology.* DOI 10.1007/978-3-540-77587-4_290, Springer-Verlag, 2010.».
- [87] «Thavasi, R., Jayalakshmi, S., and Banat, I. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. *Bioresource Technology* 102 (2011) 3366-3372.».
- [88] «Mukerjee, P., Mysels, K. *Critical Micelle concentrations of aqueous surfactant systems.* University of Wisconsin. 1971. Pp. 1-222.».
- [89] «Raiger, L., Lopez, N. Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Quimica Viva*, 8. 2009.».
- [90] «Gurr, M., James, T., Harwood, J. *Lipid Biochemistry. An Introduction* 5th edition. Blackwell Publishing. 2002.».
- [91] «Griffin, W. C. Classification of Surface Active Agents by HLB. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1949, 1, 311-326.».
- [92] «Selby, R.; Alikhan, AA; Farouq Ali, SM. Potential of non-thermal methods for heavy oil recovery. *The Journal Canadian Petroleum Technology.* 28, 45-59, 1989.».
- [93] «Ferrer m. 2001. Inyección de agua y gas en yacimientos petrolíferos. Editorial astro data s.a., maracaibo.pp.».

-
- [94] «S. Sriram, B. Christopher, L. Jun, K. Do Hoon, W. Upali, A.P. Gary, Improved Oil Recovery Symp. Society of Petroleum Engineers, Tulsa, OK, USA, 2012».
- [95] «M. Drew, Surfactant Science and Technology, 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2006.».
- [96] «G. Bo, M.M. Sharma, Ann. Tech. Conf. Society of Petroleum Engineers, San Antonio, TX, USA, 2012.».
- [97] «Sheng, James. Modern chemical enhanced oil recovery: theory and practice. ISBN 978-1-85617-745-0. USA. 2011».
- [98] «Taber, J.J., Martin, F.D., Seright, R.S., 1997a. EOR screening criteria revisited—part 1: introduction to screening criteria and enhanced recovery field projects. SPEREE (August), 189–198.».
- [99] «Taber, J.J., Martin, F.D., Seright, R.S., 1997b. EOR screening criteria revisited—part 2: applications and impact of oil prices. SPEREE (August), 199–205.».
- [100] «Al-Bahar, M.A., Merrill, R., Peake, W., Jumaa, M., Oskui, R., 2004. Evaluation of IOR potential within Kuwait. Paper SPE 88716 presented at the Abu Dhabi International Conference and Exhibition, Abu Dhabi, 10–13 October.».
- [101] «Dulbecco, R. et al. (1954): Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. In: J. Exp. Med. vol. 99 (2), pp. 167-182. doi:10.1084/jem.99.2.167 PMID 1313079».
- [102] «Van der Mei, H.C., Rosenberg, M., and Busscher, H.J. Assessment of microbial cell Surface hydrophobicity. Cambridge, 1991, p. 263-287.».
- [103] «Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiology Letters 9 (1980) 29-33.».
- [104] «Thavasi, R., Jayalakshmi, S., and Banat, I. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. Bioresource Technology 102 (2011) 3366-3372.».
- [105] «Cheng, F.Y., Yang, H., Chen, Y. Characterization of a blend-biosurfactant of glycolipid and lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* TU2 isolated from underground oil-extraction wastewater, J. Microbiol, Biotechnol.23 (2013) 390-396.».

- [106] «Griffin, W. C. Calculation of HLB values of Nonionic Surfactants, J. Soc. Cosmet. Chem. 1954, 5, 249-256».
- [107] «Thavasi, R., Jayalakshmi, S., and Banat, I. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. *Bioresource Technology* 102 (2011) 3366-3372.».
- [108] «Mohammad, A., Mabrouk, M., Hassouna, N. Characterization of Surfactin produced by *Bacillus subtilis*. Isolate BS5. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2008) 150: 289-303.».
- [109] «Lopera, S. Fluidos divergentes como alternativa de recobro mejorado en yacimientos naturalmente fracturados: Un estudio experimental. *Boletín ciencias de la tierra*, Núm. 25 2009.».
- [110] «Joshi, S., Bharucha, C., Desai, A.J., 2008b. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresour. Technol.* 99, 4603e4608.».
- [111] «Cooper, D. G., and Zajic, J. E. (1980) Surface active compounds from microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 42: 408-412.».
- [112] «Santos, EC., Jacques, RJ., Bento, FM., Peralba, Mdo. C., Selbach, PA., Sá, EL., Camargo, FA. Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. *Bioresour Technol.* 99, pp. 2644–2649. 2008.».
- [113] «Kundu, P., Agrawal, A., Mateen, H., Mishra, I. Stability of oil in water macro-emulsion with anionic surfactant: Effect of electrolytes and temperature. *Chemical Engineering Science* 102 (2013) 176-185.».
- [114] «Rios, G., Pazos, C., Coca, J., 1998. Destabilization of cutting oil emulsions using inorganic salts as coagulants. *Colloid and Interface Science* 208, 415-421.».
- [115] «Das, P., Mujherjee, S., Sen, R., 2008. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1657-1684.».
- [116] «Rahman, P., Pasirayi, G., Auger, V., and Ali, Z. Production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 in a microfluidic bioreactor. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* (2010) 55, 1-10.».
- [117] «Chandran, P., and Das, Nilanjana., Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon Asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. *International Journal of Engineering Science and*

Technology Vol. 2(12), 2010».

- [118] «Das, P., Mujherjee, S., Sen, R., 2008. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1675-1684.».
- [119] «Yilmaz, F., Ergene, A., Yalçin, E., Tan, S., 2009. Production and characterization of biosurfactants produced by microorganisms isolated from milk factory wastewaters. *Environmental Technology* 30, 1397-1404.».
- [120] «Yalçin, E., Cavuşoğlu, K., 2010. Structural analysis and antioxidant activity of a biosurfactant obtained from *Bacillus subtilis* RW1. *Turkish Journal of Biochemistry* 35, 243-247.».
- [121] «Cavalcante, F., Pereira, C., Marostica, M., Pastore, G. Surfactina: Propiedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicacoes em alimentos. *Quím. Nova* Vol. 30 No. 2. 2007. Sao Paulo.».
- [122] «Yilmaz, F., Ergene, A., Yalçin, E., Tan, S., 2009. Production and characterization of biosurfactants produced by microorganisms isolated from milk factory wastewaters. *Environmental Technology* 30, 1397-1404.».
- [123] «Moldes, A., Paradelo, R., Vecino, X., Cruz, J. Partial characterization of Biosurfactant from *Lactobacillus pentosus* and comparison with sodium Dodecyl sulphate for Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated soil. *Biomed Research International*. 2013. p.1-6».
- [124] «Augustin, M., Tene, M. Screening of biosurfactants properties of cel-free supernatants of cultures of *Lactobacillus* spp. isolated from a local fermented milk of Ngaoundere. *International Journal of Engineering Research*, Vol 2, Issue 5. 2012. pp. 974-985.».
- [125] «Carrera, P., Cosmina, P., Grandi, Guido. Un mutante de *Bacillus subtilis* y un método para producir surfactina utilizando el mutante. *Patente Europea* ES 2082039. 1992.».
- [126] «Wei, Yu-Hong and Chu I-Ming. 2002. Mn improves surfactin production by *Bacillus Subtilis*. *Biotechnology Letters* 24, p 479-482.».
- [127] «Hommel, R.K., Siñeriz, F. Production of Biosurfactants. *Biotechnology. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. 2002. pp. 1-9.».

- [128] «N. Youssef, D.R. Simpson, K.E. Duncan, M.J. McInerney, M. Folmsbee, T. Fincher, R.M. Knapp, In situ biosurfactant production by *Bacillus* strains injected into a limestone petroleum reservoir, *Applied and Environmental Microbiology* 73 (2007) 1239–1247.».
- [129] «O. Pornsunth, N. Arttaweeporn, S. Paisanjit, P. Somboon, M. Abe, R. Rujirav, S. Chavadej. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* for microbial surfactant-EOR. *Bioc. Eng. Journal*. 42.2008 172-179».
- [130] «H. Amani, M.H. Sarrafzadeh, M. Haghghi, M.R. Mehrnia, Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications, *Journal of Petroleum Science and Engineering* 75 (2010) 209–214.».
- [131] «Mosayeb, A., Abedini, R. The effect of non-ionic surfactants on the interfacial tension between crude oil and water. *Petroleum and Coal* 54 (2) 110-113, 2012.».
- [132] «Gao, B., Sharma, M. A family of alkyl sulfate gemini surfactants. 2. Water-oil interfacial tension reduction. *Journal of Colloid and Interface Science* 407, pp. 375-381. 2013».
- [133] «A. Soudmand-asli, S.S. Ayatollahi, H. Mohabatkar, M. Zareie, S.F. Shariatpanahi, The in situ microbial enhanced oil recovery in fractured porous media, *J. Pet. Sci. Eng.* 58 (2007) 161–172.».
- [134] «M.M. Yakimov, M.M. Amro, M. Bock, K. Boseker, H.L. Fredrickson, D.G. Kessek, K.N. Timmis, The potential of *Bacillus licheniformis* strains for in situ enhanced oil recovery, *J. Pet. Sci. Eng.* 18 (1997) 147–160.».

A. Anexo: Resultados Tensión Superficial.

Tabla 14. Valores de tensión superficial de los sobrenadantes al utilizar melaza como medio de cultivo, inoculados con tres bacterias (LAC05, LAC10 y LAC 12) en respuesta a la variación de la formulación del medio de cultivo y fuente de carbono al 1%, después de 3 días a 37°C y 200 rpm.

	BACTERIAS	MEDIO	TENSIÓN
5		M1	36,8
		M1	37,4
		M1	37,9
		M2	39,1
		M2	37,5
		M2	36,1
		M3	41,9
		M3	43,1
		M3	44,2
		M4	42,2
		M4	43,2
		M4	46,3
10		M1	34,6
		M1	34,2
		M1	33,2
		M2	37,4
		M2	45,4
		M2	53,4
		M3	42,9
		M3	41,2
		M3	38,6
		M4	39,1
		M4	38,5
		M4	41,7

	BACTERIAS	MEDIO	TENSIÓN
12		M1	38,3
		M1	40,8
		M1	38,2
		M2	35,4
		M2	35,3
		M2	35
		M3	37,1
		M3	40,2
		M3	43,9
		M4	41,6
		M4	40,2
		M4	38,8

Tabla 15. Valores de tensión superficial de los sobrenadantes al utilizar suero como medio de cultivo, inoculados con tres bacterias (LAC05, LAC10 y LAC 12) en respuesta a la variación de la formulación del medio de cultivo y fuente de carbono al 1%, después de 3 días a 37°C y 200 rpm.

	BACTERIAS	MEDIO	TENSIÓN
5		M1	41,7
		M1	43,4
		M1	41,3
		M2	39,3
		M2	43,1
		M2	42,4
		M3	42,1
		M3	45,3
		M3	42,7
		M4	40,3
		M4	39,9
		M4	39,6

BACTERIAS	MEDIO	TENSIÓN
10	M1	37,3
	M1	39,1
	M1	41,1
	M2	37,7
	M2	39,8
	M2	41,8
	M3	41,2
	M3	40,4
	M3	39,6
	M4	34,1
	M4	34,3
	M4	34,4
12	M1	38,4
	M1	39,8
	M1	41,2
	M2	35
	M2	35,3
	M2	35,5
	M3	42,1
	M3	41,8
	M3	42,4
	M4	37,9
	M4	37,7
	M4	38

B. Anexo: Dilución Crítica Micelar (DMC)

Figura 22. Tensión superficial del medio de cultivo sin células M1 suplementado con melaza para a) la bacteria LAC05, b) LAC10 y c) LAC12 en función de la dilución de los medios de cultivo, fermentados por 3 días, 37°C y 200 rpm.

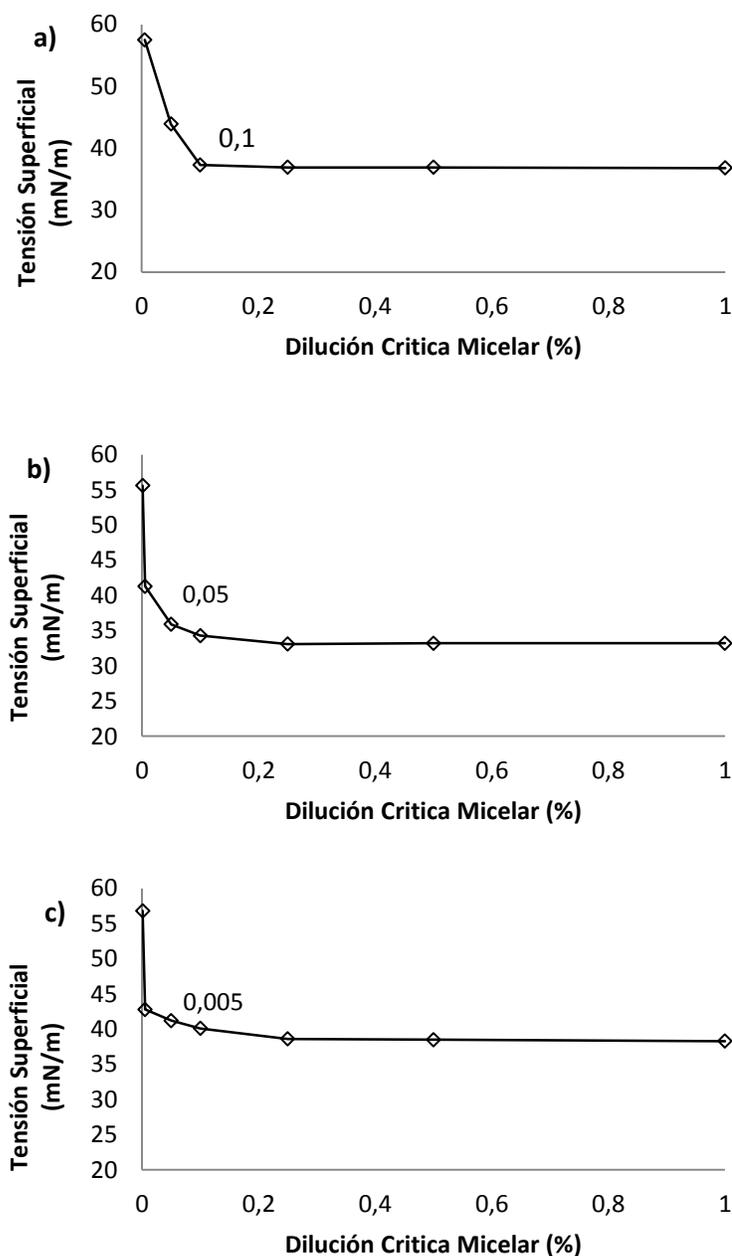


Figura 23. Tensión superficial del medio de cultivo sin células M2 suplementado con melaza para a) la bacteria LAC05, b) LAC10 y c) LAC12 en función de la dilución de los medios de cultivo, fermentados por 3 días, 37°C y 200 rpm.

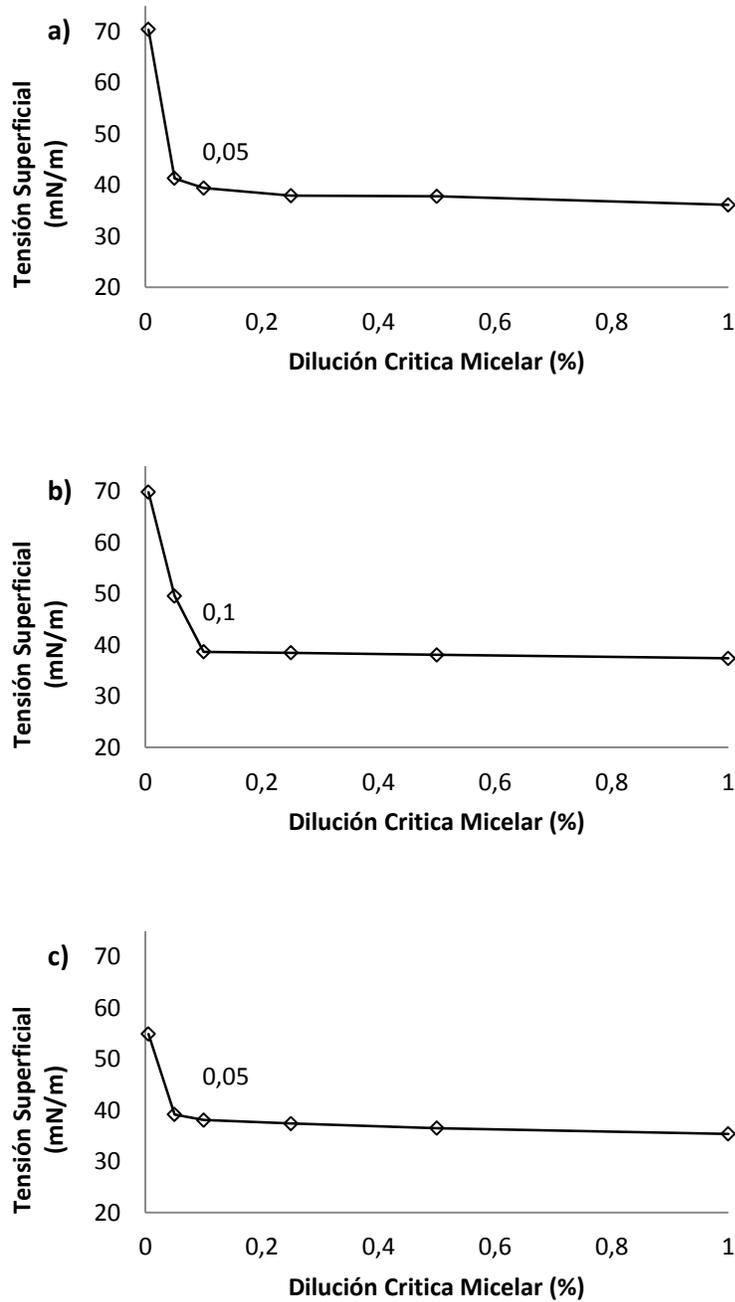


Figura 24. Tensión superficial del medio de cultivo sin células M3 suplementado con melaza para a) la bacteria LAC05, b) LAC10 y c) LAC12 en función de la dilución de los medios de cultivo, fermentados por 3 días, 37°C y 200 rpm.

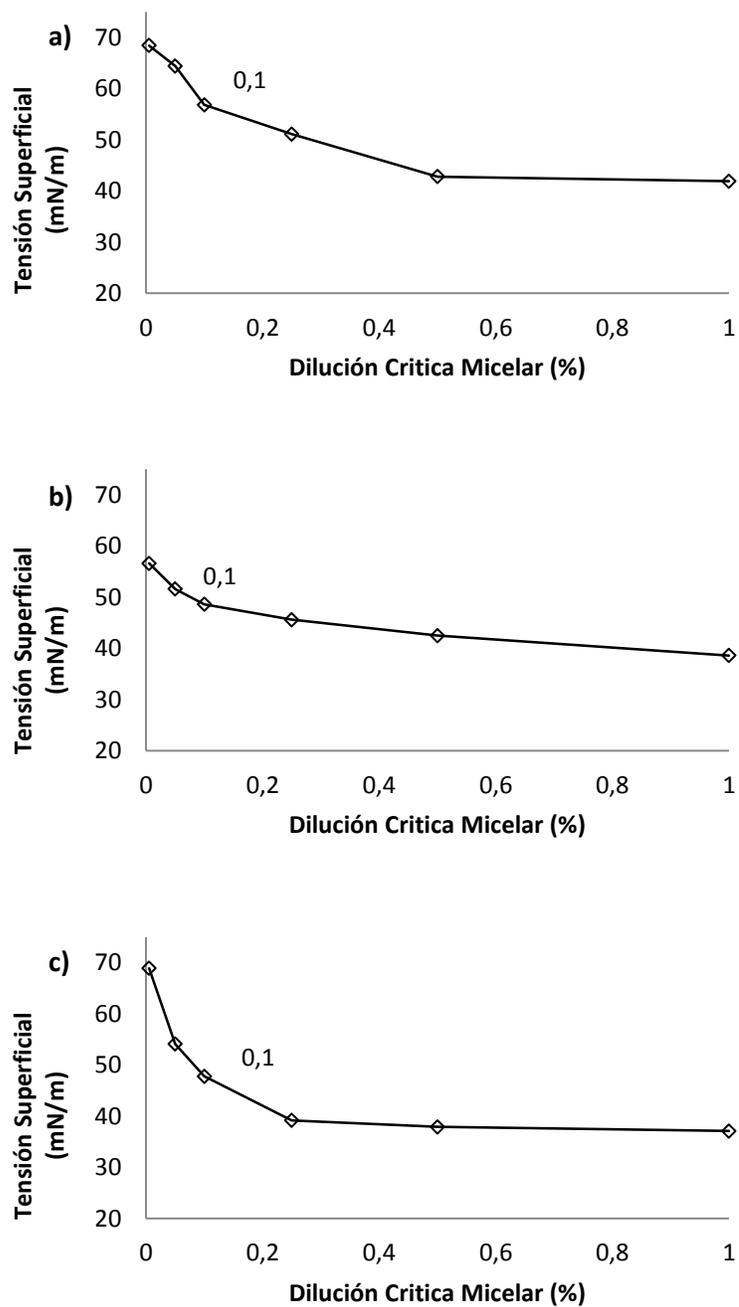


Figura 25. Tensión superficial del medio de cultivo sin células M4 suplementado con melaza para a) la bacteria LAC05, b) LAC10 y c) LAC12 en función de la dilución de los medios de cultivo, fermentados por 3 días, 37°C y 200 rpm.

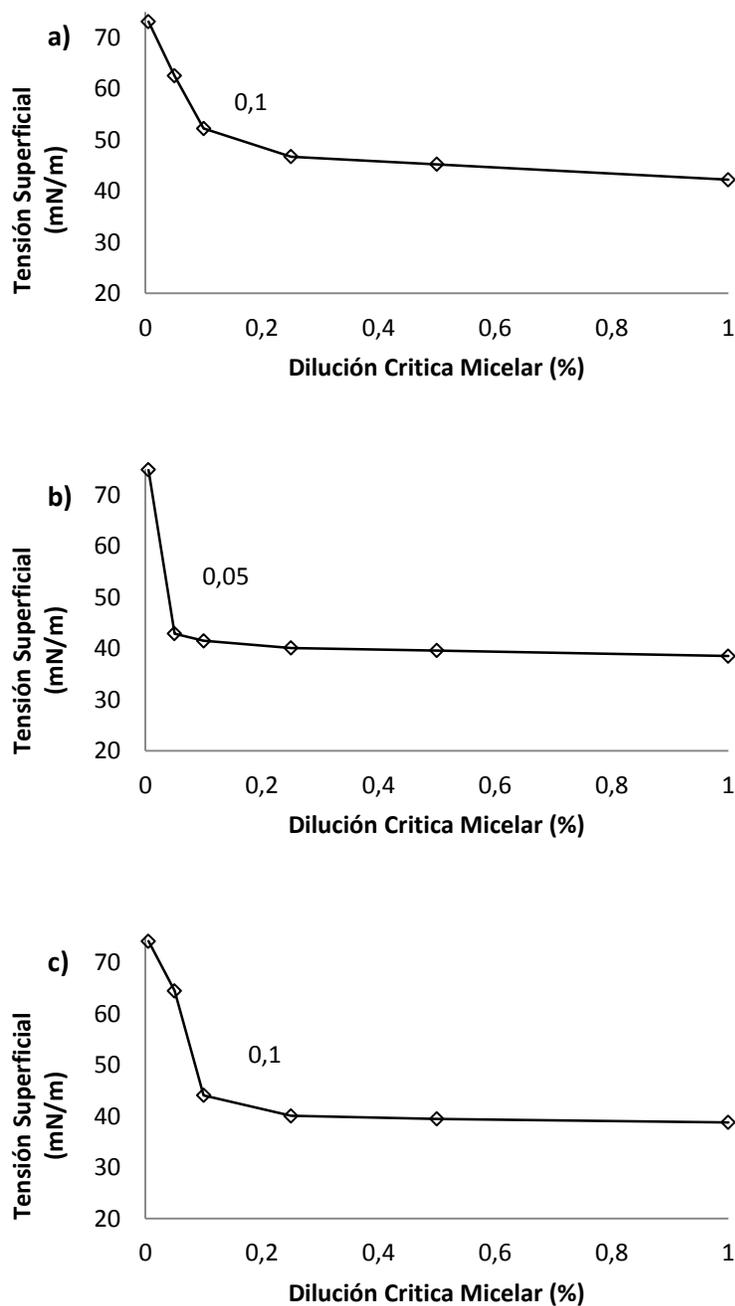


Figura 26. Tensión superficial del medio de cultivo sin células M1 suplementado con suero para a) la bacteria LAC05, b) LAC10 y c) LAC12 en función de la dilución de los medios de cultivo, fermentados por 3 días, 37°C y 200 rpm.

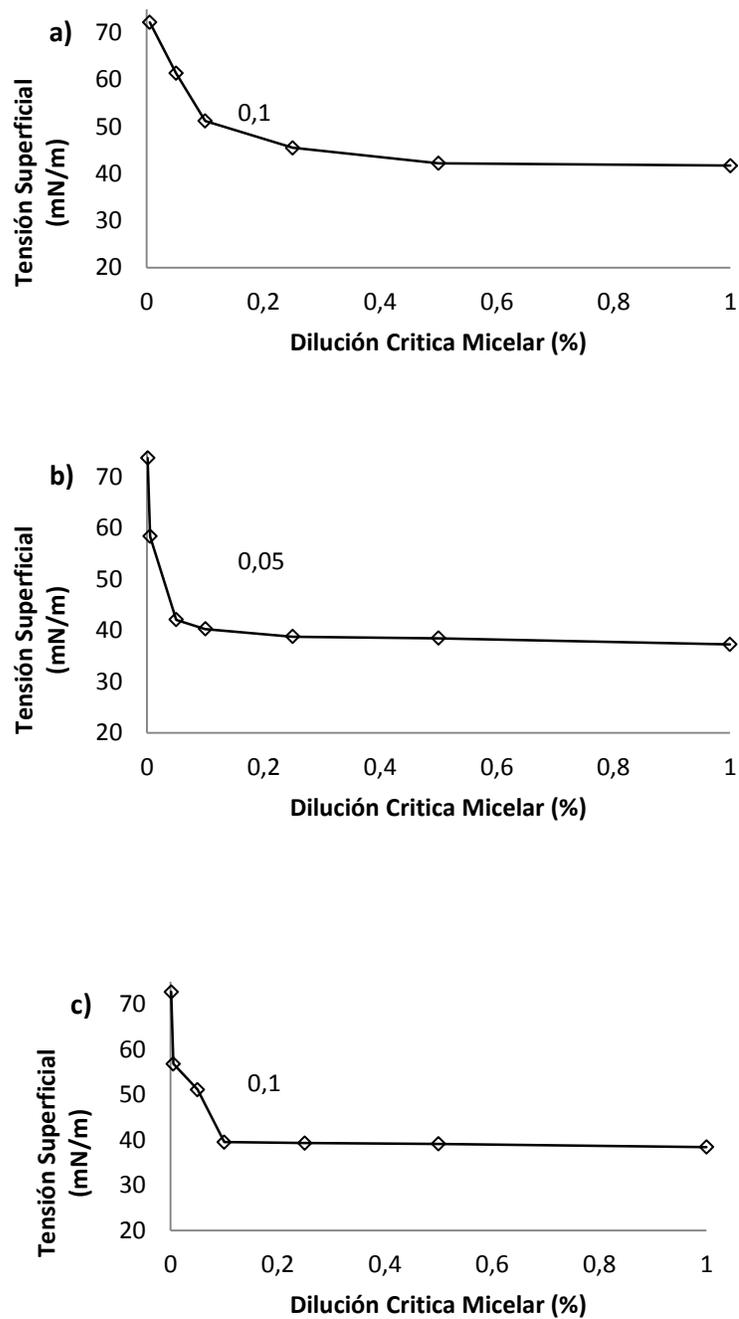


Figura 27. Tensión superficial del medio de cultivo sin células M2 suplementado con suero para a) la bacteria LAC05, b) LAC10 y c) LAC12 en función de la dilución de los medios de cultivo, fermentados por 3 días, 37°C y 200 rpm.

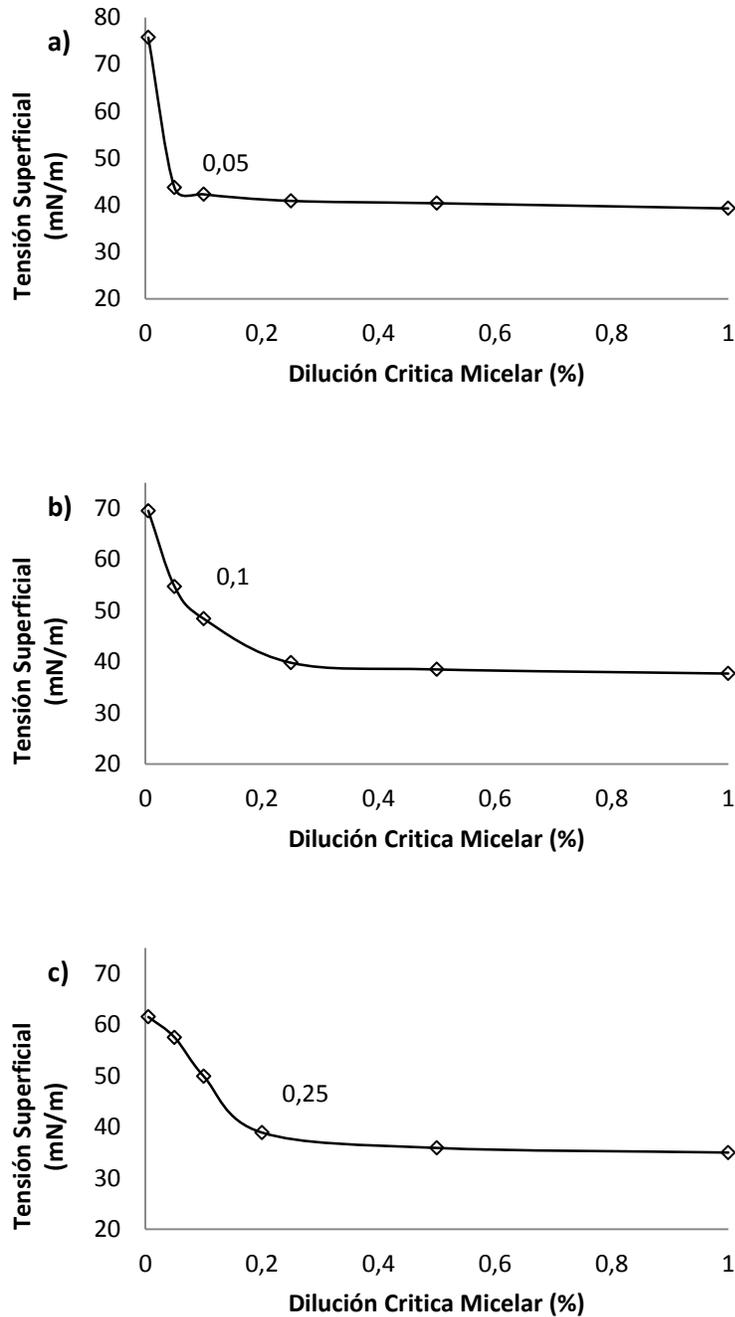


Figura 28. Tensión superficial del medio de cultivo sin células M3 suplementado con suero para a) la bacteria LAC05, b) LAC10 y c) LAC12 en función de la dilución de los medios de cultivo, fermentados por 3 días, 37°C y 200 rpm.

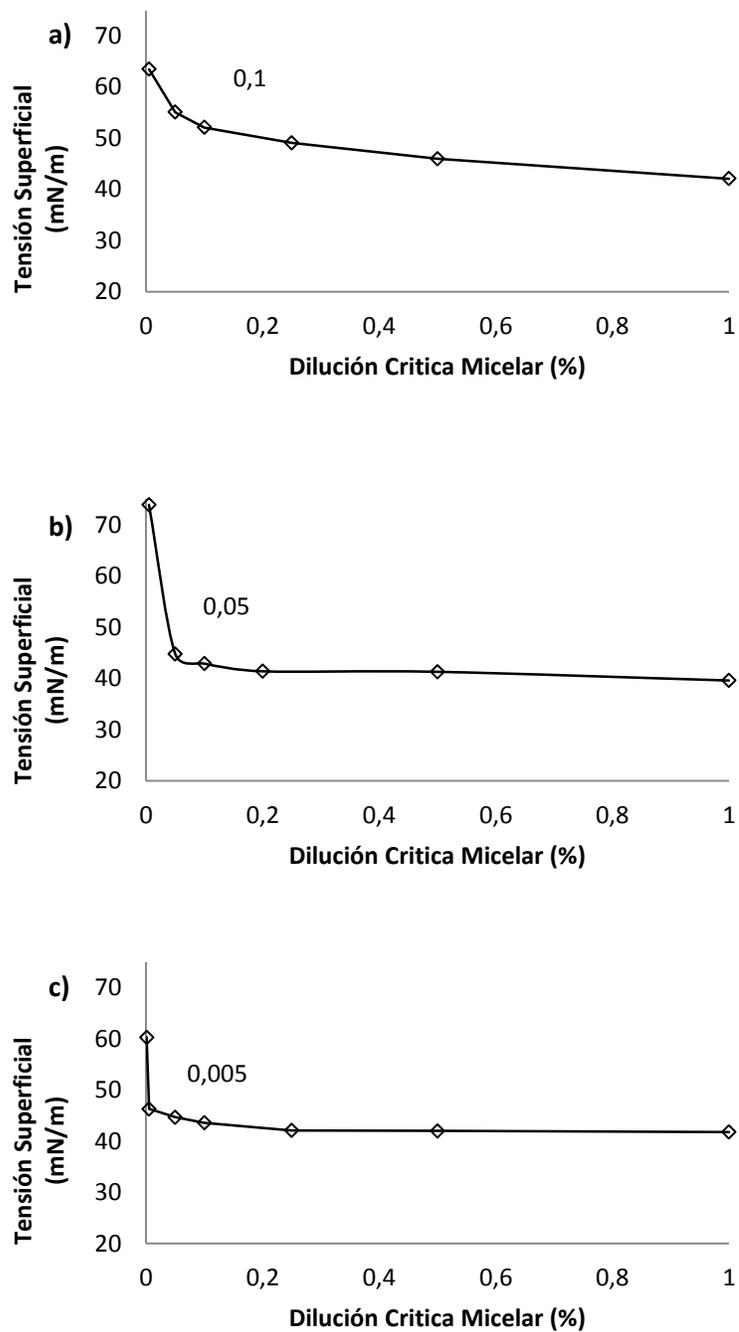
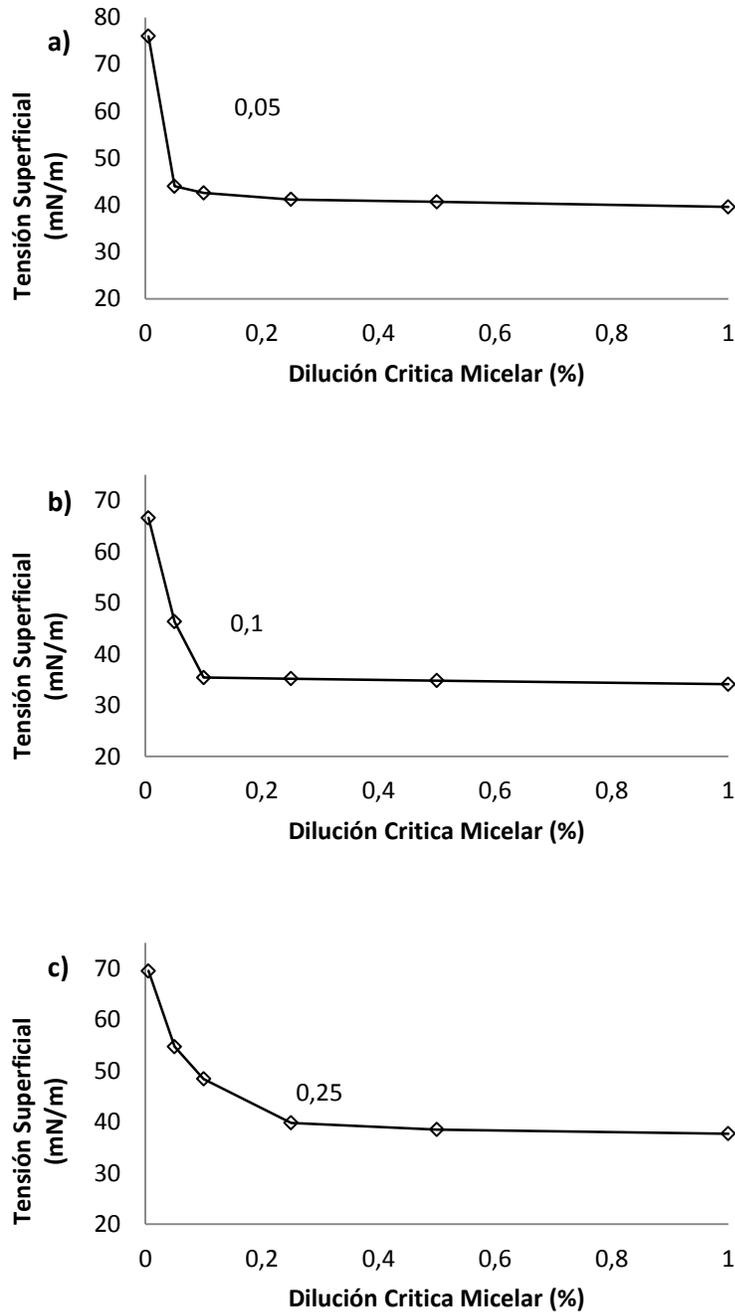


Figura 29. Tensión superficial del medio de cultivo sin células M4 suplementado con suero para a) la bacteria LAC05, b) LAC10 y c) LAC12 en función de la dilución de los medios de cultivo, fermentados por 3 días, 37°C y 200 rpm.



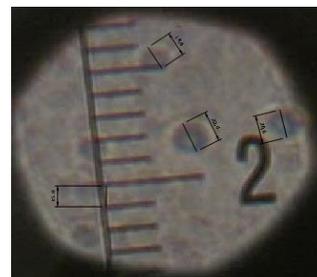
C. Anexo: Tamaños de Gota

Tabla 16. Tamaño de Gota de emulsiones a diferentes tamaños de gota al tiempo inicial.

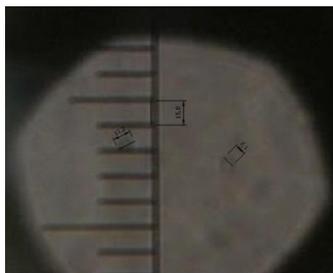
95% Tolueno-5% Producto



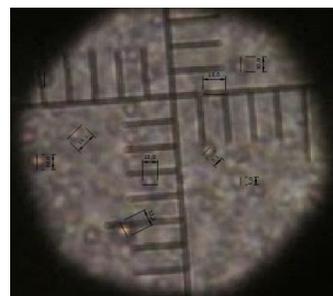
15% agua 5% producto 80% tolueno



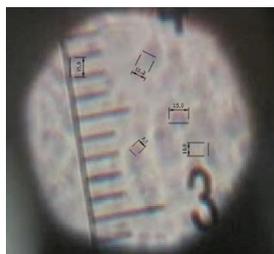
94.4% tolueno 3.3% agua 3.3% producto



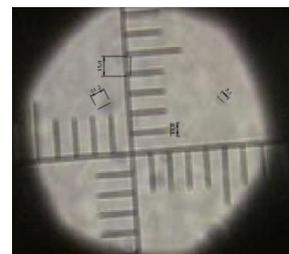
83.7% tolueno 12.5% agua 3.8% producto



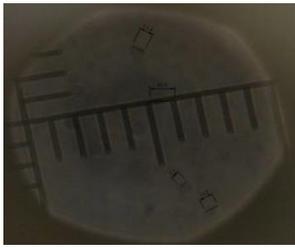
80% tolueno 10% agua 10% producto



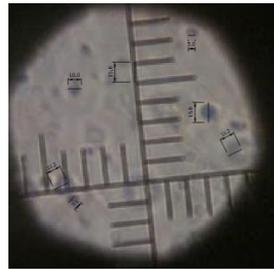
80% tolueno 17.5% agua 2.5% producto



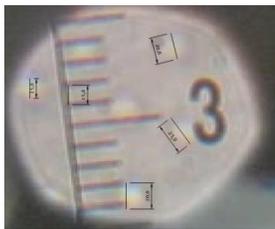
87.7% tolueno 6.5% agua 6.5% producto



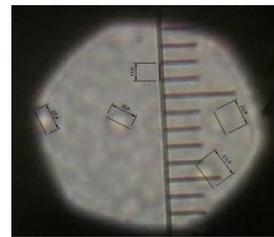
1.65% agua 1.65% producto 96.7 % tolueno



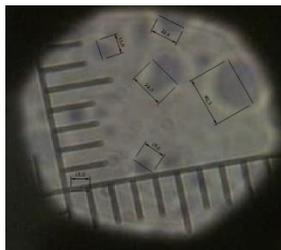
90% Tolueno 10% Producto



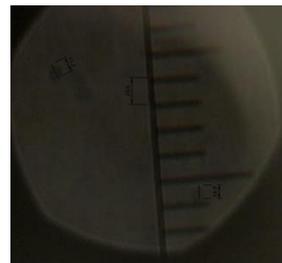
80% tolueno 20% producto



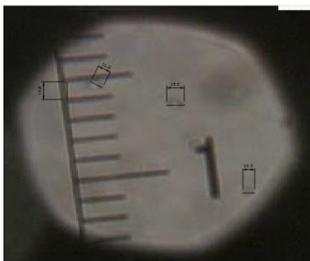
95% tolueno 5% agua



90% tolueno 10% agua



85% tolueno 15% agua

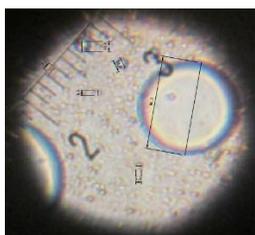


80% tolueno 20% agua

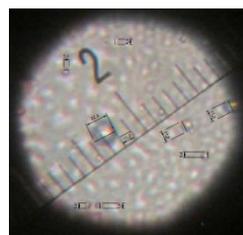


Tabla 17. Tamaño de Gota de emulsiones a diferentes tamaños de gota al tiempo final.

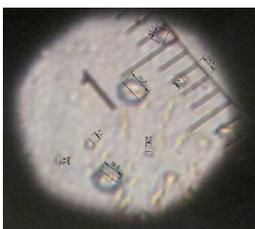
95% Tolueno-5% Producto



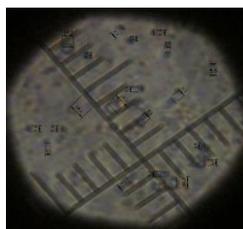
15% agua 5% producto 80% tolueno



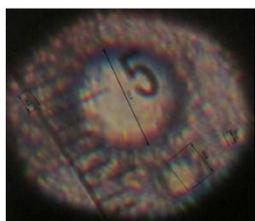
94.4% tolueno 3.3% agua 3.3% producto



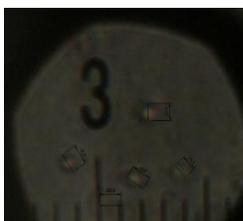
83.7% tolueno 12.5% agua 3.8% producto



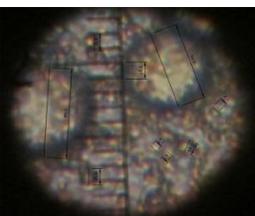
80% tolueno 10% agua 10% producto



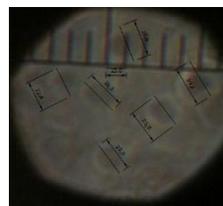
80% tolueno 17.5% agua 2.5% producto



87.7% tolueno 6.5% agua 6.5% producto



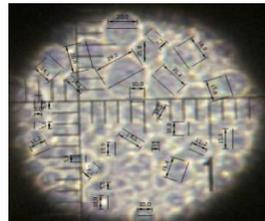
1.65% agua 1.65% producto 96.7 % tolueno



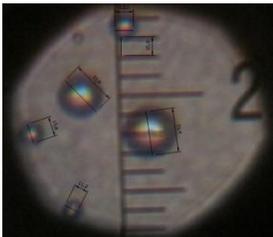
90% Tolueno 10% Producto



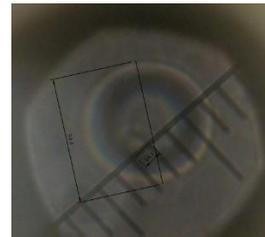
80% tolueno 20% producto



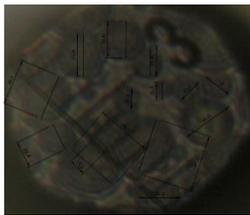
95% tolueno 5% agua



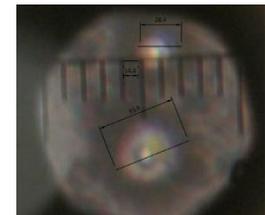
90% tolueno 10% agua



85% tolueno 15% agua



80% tolueno 20% agua



D. Anexo: Prueba de compatibilidad

Tabla 18. Resultados de Prueba de compatibilidad para la concentración de biosurfactante e 900 ppm

Tiempo (min)	20%Crudo-80%Biotratamiento				Observaciones	50%Crudo-50%Biotratamiento				Observaciones	80%Crudo-20%Biotratamiento				Observaciones
	%FO	%FT	%EM	%ES		%FO	%FT	%EM	%ES		%FO	%FT	%EM	%ES	
0	-	-	98	2	Se observa una sola fase homogénea, se observa 2% espuma	-	-	94	6	Se observa una sola fase homogénea, en la superficie se observa 6% espuma	-	-	94	6	Se observa una sola fase homogénea, en la superficie se observa 6% espuma
1	-	-	98	2		-	-	94	6		16	78	-	6	
3	-	-	98	2		-	-	94	6		18	76	-	6	
5	-	-	98	2	Se empieza a ver la separación, el color de la fase acuosa es turbio, se observa 2% espuma	-	-	94	6	Se empieza a ver la separación, el color de la fase acuosa es turbio, se observa 6% espuma	18	76	-	6	Se empieza a ver la separación, el color de la fase acuosa es turbio, se observa 6% espuma
10	-	-	98	2		-	-	94	6		20	80	-	-	
30	24	76	-	-	4% de Tratamiento se encuentra emulsionada con el crudo, no se observan precipitados, no se observa espuma en la superficie	48	52			Al final se observa el color de biotratamiento turbio, no se observan precipitados, ni espuma en la superficie	20	80	-	-	Al final se observa el color de biotratamiento translucido, no se observan precipitados, ni espuma en la superficie
60	24	76	-	-		48	52				20	80	-	-	
120	24	76	-	-		48	52				20	80	-	-	
180	24	76	-	-		48	52				20	80	-	-	

Figura 30. Resultados obtenidos en el tiempo inicial y tiempo final para la prueba de compatibilidad con una concentración de biosurfactante de 900 ppm

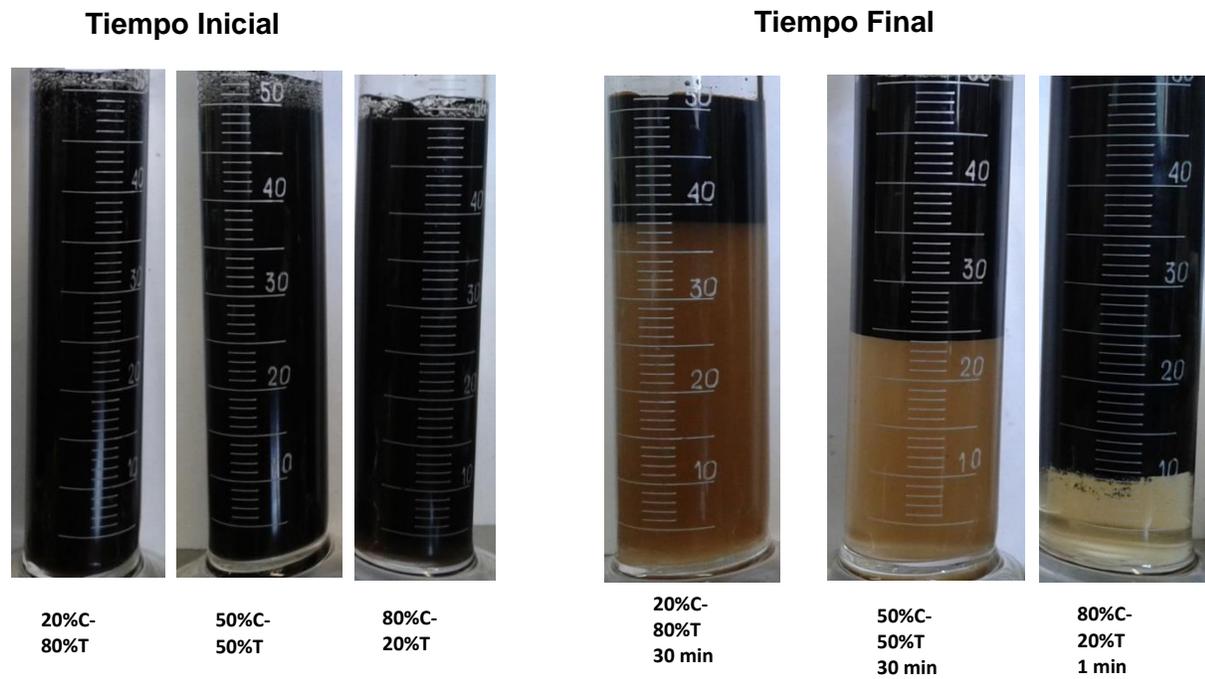


Tabla 19. Resultados de Prueba de compatibilidad para la concentración de biosurfactante de 90 ppm

Tiempo (min)	20%Crudo-80%Biotratamiento				Observaciones	50%Crudo-50%Biotratamiento				Observaciones	80%Crudo-20%Biotratamiento				Observaciones
	%FO	%FT	%EM	%ES		%FO	%FT	%EM	%ES		%FO	%FT	%EM	%ES	
0	0	0	0	0	Se observan Dos fases dispersas	48	50	0	2	Se observan dos fases, en la fase acuosa se observan partículas de crudo	80	20	0	0	Se observan dos fases, en la fase acuosa se observan partículas de crudo
1	18	82	0	0	Se observan dos fases, en la fase acuosa se observan partículas de crudo	48	50	0	2		82	18	0	0	
3	18	82	0	0		48	52	0	0		82	18	0	0	
5	16	84	0	0		48	52	0	0		82	18	0	0	
10	16	84	0	0		48	52	0	0		82	18	0	0	
30	16	84	0	0	Se observan dos fases, en la fase acuosa se observan sin partículas de crudo	48	52	0	0	Se observan dos fases, en la fase acuosa se observan pocas partículas de crudo	80	20	0	0	Se observan dos fases limpias, sin precipitados y sin espuma
60	16	84	0	0	48	52	0	0	80		20	0	0		

Figura 31. Resultados obtenidos en el tiempo inicial y tiempo final para la prueba de compatibilidad con una concentración de biosurfactante de 90 ppm

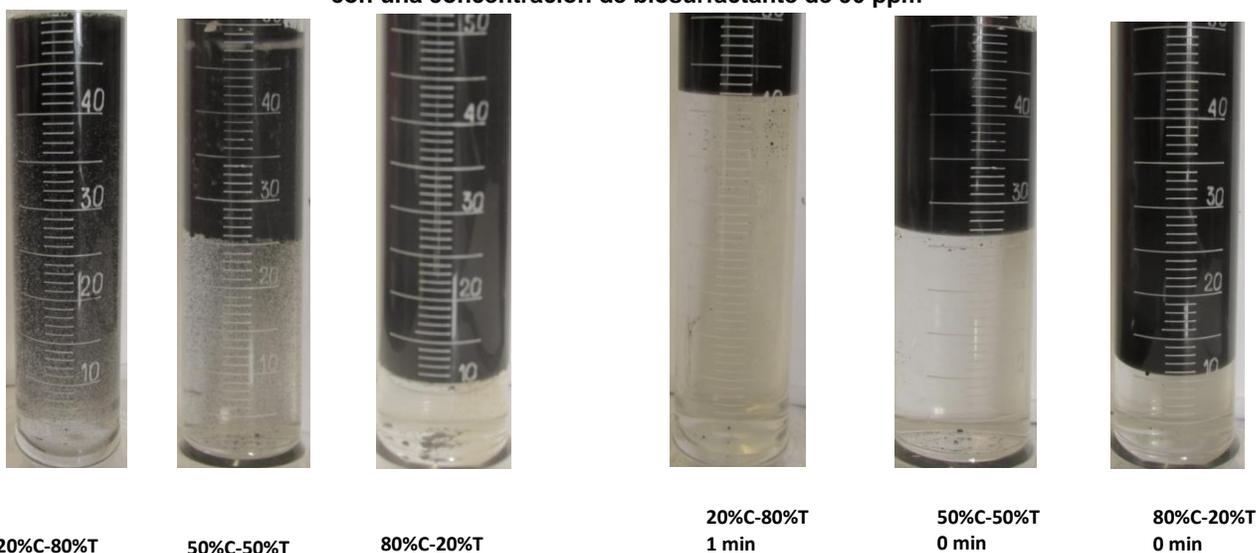


Tabla 20. Resultados de Prueba de compatibilidad para la concentración de biosurfactante de 10 ppm

Tiempo (min)	20%Crudo-80%Biotratamiento				Observaciones	50%Crudo-50%Biotratamiento				Observaciones	80%Crudo-20%Biotratamiento				Observaciones
	%FO	%FT	%EM	%ES		%FO	%FT	%EM	%ES		%FO	%FT	%EM	%ES	
0	20	40	-	-	Se observan dos fases, en la fase acuosa se observan partículas de crudo	50	50	-	-	Se observan dos fases, en la fase acuosa se observan partículas de crudo	80	20	-	-	Se observan dos fases, en la fase acuosa se observan partículas de crudo
1	20	40	-	-		50	50	-	-		80	20	-	-	
3	20	40	-	-		50	50	-	-		80	20	-	-	
5	20	40	-	-	Se observan dos fases, la fase acuosa se observa sin partículas de crudo	50	50	-	-	Se observan dos fases, la fase acuosa se observa sin partículas de crudo	80	20	-	-	Se observan dos fases, la fase acuosa se observa sin partículas de crudo
10	20	40	-	-		50	50	-	-		80	20	-	-	
30	20	40	-	-		50	50	-	-		80	20	-	-	

Figura 32. Resultados obtenidos en el tiempo inicial y tiempo final para la prueba de compatibilidad con una concentración de biosurfactante de 10 ppm

