

# UCUENCA

## Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Ingeniería Química

**Estudio de surfactantes biológicos producidos por *Streptococcus thermophilus*, usando suero de queso como fuente de carbono para remediación de aguas contaminadas con aceite de motor**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Químico

### **Autores:**

Ariana Paola Chumi Pasato

Mary Carmen Rueda Vines

### **Director:**

Verónica Patricia Pinos Vélez

ORCID:  0000-0001-8278-5873

**Cuenca, Ecuador**

2023-11-27

## Resumen

En este trabajo de investigación se estudió la obtención de un surfactante biológico producido a partir de la fermentación de lactosuero como fuente de carbono, usando bacterias *Streptococcus thermophilus*. El proceso de fermentación se efectuó durante 72 h a 37 °C. Luego, se centrifugó a 4000 rpm por 30 minutos para eliminar los residuos. La separación del biosurfactante se realizó por el método de precipitación ácida y se secó en estufa a 40° C. Se obtuvo un peso de 0.1 g de biosurfactante por cada 100 ml de suero usado. Para optimizar la producción del biosurfactante, se realizó un diseño factorial completo de tres niveles y dos factores, siendo la variable respuesta la cantidad de surfactante obtenido. Se evaluaron los efectos principales temperatura (38, 40 y 42 °C), tiempo (24, 48 y 72 horas) y su combinación. Se encontró que los efectos principales temperatura y tiempos resultaron significativos, además de su interacción. Se encontró que el mayor rendimiento con respecto a la producción del biosurfactante se obtuvo a una temperatura de 40°C y un tiempo de 48 horas. La caracterización confirmó la presencia del biosurfactante, se realizaron varias pruebas cualitativas y cuantitativas: actividad hemolítica, Parafilm, dispersión del aceite, índice de emulsificación (63.64 %) y tensión superficial (52.7 mN/m). Además, se realizó un test de ecotoxicidad con *Daphnia magna* antes y después de realizar el ensayo de biorremediación para corroborar que el biosurfactantes es amigable con el ambiente. Finalmente, durante los 45 días del proceso de biorremediación, el biosurfactante combinado con microorganismos consiguió una remoción del aceite de motor en un valor mayor al 50%.

*Palabras clave:* biosurfactantes, lactosuero, *microorganismos*, remoción, aceite usado



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

### Abstract

In this research work, it was studied the obtaining of a biological surfactant produced from the fermentation of cheese whey as a carbon source, using *Streptococcus thermophilus* bacteria. The fermentation process was carried out for 72 h at 37 °C. Then, it was centrifuged at 4000 rpm for 30 minutes to remove waste. The separation of the biosurfactant was carried out by the acid precipitation method and it was dried in an oven at 40° C. A weight of 0.1 g of biosurfactant was obtained for every 100 ml of cheese whey used. To optimize the production of the biosurfactant, a complete factorial design of three levels and two factors was carried out, with the response variable being the amount of surfactant obtained. The main effects of temperature (38, 40 and 42 °C), time (24, 48 and 72 hours) and their combination were evaluated. It was found that the main effects of temperature and time were significant, in addition to their interaction. It was found that the highest performance with respect to biosurfactant production was obtained at a temperature of 40°C and a time of 48 hours. The characterization confirmed the presence of the biosurfactant, several qualitative and quantitative tests were performed: hemolytic activity, Parafilm, oil dispersion, emulsification index (63.64%) and surface tension (52.7 mN/m). In addition, an ecotoxicity test was carried out with *Daphnia magna* and after carrying out the bioremediation test to corroborate that the biosurfactants are environmentally friendly. Finally, during the 45 days of the bioremediation process, the biosurfactant combined with microorganism achieve a motor oil removal of more than 50%.

*Keywords:* biosurfactant, cheese whey, *microorganisms*, removal, waste oil



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

## Índice de contenido

|  |    |
|--|----|
| Resumen.....   | 2  |
| Abstract.....  | 3  |
| Índice de contenido.....   | 4  |
| Índice de figura .....   | 7  |
| Índice de Tablas.....  | 8  |
| Agradecimientos .....  | 9  |
| Dedicatoria .....  | 11 |
| Introducción.....  | 13 |
| Objetivo General. ....   | 15 |
| Objetivos Específicos. ....  | 15 |
| Capítulo I: Marco teórico.....   | 16 |
| 1. Biosurfactantes .....   | 16 |
| 1.1. Concepto y Tipos de biosurfactantes .....   | 16 |
| 1.1.1 Concepto .....   | 16 |
| 1.1.2 Tipos de biosurfactantes .....   | 17 |
| 1.2 Preparación de biosurfactantes .....   | 18 |
| 1.2.1 Suero de leche como fuente de carbono .....  | 19 |
| 1.2.2. Microorganismos productores de biosurfactantes.....                               | 21 |
| 1.3 Caracterización de un biosurfactante .....   | 24 |
| 1.3.1 Detección y cuantificación de biosurfactante .....                                 | 24 |
| 1.3.2 Propiedades fisicoquímicas .....   | 25 |
| 1.4 Aplicaciones de los biosurfactantes .....  | 26 |
| 2. Biorremediación de aguas contaminadas con hidrocarburos.....                          | 27 |
| 2.1 Los hidrocarburos como contaminantes del agua .....                                  | 27 |
| 2.2 Biorremediación de aguas contaminadas con hidrocarburos usando biosurfactantes ..... | 29 |
| 2.2.1 Organismos usados en la biorremediación de hidrocarburos.....                      | 30 |
| 2.2.2 Biorremediación con biosurfactantes.....   | 30 |

|  |    |
|--|----|
| Capítulo II: Metodología experimental.....                     | 33 |
| 1. Obtención del biosurfactante.....                           | 33 |
| 1.1. Cepas microbianas y condiciones de cultivo.....           | 33 |
| 1.2. Análisis preliminar y pretratamiento del suero .....      | 34 |
| 1.2.1 Pretratamiento del suero.....                            | 34 |
| 1.3. Producción del biosurfactante .....                       | 34 |
| 1.4. Separación del biosurfactante .....                       | 34 |
| 1.5. Optimización.....   | 34 |
| 2. Caracterización del biosurfactante.....                     | 35 |
| 2.1.1. Actividad Hemolítica.....                               | 35 |
| 2.1. Detección de la presencia de biosurfactante .....         | 35 |
| 2.1.2. Dispersión de aceite.....                               | 36 |
| 2.1.3. Prueba con Parafilm.....                                | 36 |
| 2.1.4. Determinación del Índice de Emulsificación (IE24) ..... | 36 |
| 2.1.5. Prueba de Tensión Superficial.....                      | 36 |
| 2.2. Test de ecotoxicidad al biosurfactante .....              | 37 |
| 3. Aplicación en biorremediación del agua .....                | 37 |
| 3.1. Biorremediación .....                                     | 38 |
| 3.2 Determinación de hidrocarburos totales de petróleo .....   | 38 |
| Capítulo III: Resultados y Discusión.....                      | 40 |
| 1. Obtención del biosurfactante.....                           | 40 |
| 1.1. Cepas microbianas y condiciones de cultivo.....           | 40 |
| 1.2. Análisis preliminar y pre tratamiento del suero. ....     | 41 |
| 1.2.1 Pre tratamiento del suero.....                           | 43 |
| 1.3. Producción del biosurfactante .....                       | 44 |
| 1.4. Separación del biosurfactante .....                       | 45 |
| 1.5. Optimización.....   | 47 |
| 2. Caracterización del biosurfactante.....                     | 53 |
| 2.1. Detección de la presencia de biosurfactante .....         | 53 |
| 2.1.1. Actividad Hemolítica.....                               | 53 |
| 2.1.2. Dispersión de aceite.....                               | 54 |

|  |    |
|--|----|
| 2.1.3. Prueba con Parafilm.....                                | 55 |
| 2.1.4. Determinación del Índice de Emulsificación (IE24) ..... | 56 |
| 2.1.5. Prueba de Tensión Superficial.....                      | 58 |
| 2.2. Test de ecotoxicidad al biosurfactante .....              | 58 |
| 3. Aplicación en Biorremediación del agua .....                | 61 |
| 3.1. Biorremediación .....                                     | 61 |
| 3.2. Determinación de hidrocarburos totales de petróleo .....  | 62 |
| Conclusiones.....  | 64 |
| Referencias.....   | 65 |
| Anexos .....   | 76 |
| Anexo A.....   | 76 |
| Anexo B.....   | 77 |
| Anexo C .....  | 81 |

## Índice de figura

|                 |    |
|-----------------|----|
| Figura 1 .....  | 16 |
| Figura 2 .....  | 19 |
| Figura 3 .....  | 23 |
| Figura 4 .....  | 29 |
| Figura 5 .....  | 37 |
| Figura 6 .....  | 40 |
| Figura 7 .....  | 41 |
| Figura 8 .....  | 42 |
| Figura 9 .....  | 44 |
| Figura 10 ..... | 45 |
| Figura 11 ..... | 46 |
| Figura 12 ..... | 47 |
| Figura 13 ..... | 48 |
| Figura 14 ..... | 48 |
| Figura 15 ..... | 49 |
| Figura 16 ..... | 51 |
| Figura 17 ..... | 52 |
| Figura 18 ..... | 52 |
| Figura 19 ..... | 54 |
| Figura 20 ..... | 55 |
| Figura 21 ..... | 56 |
| Figura 22 ..... | 57 |
| Figura 23 ..... | 60 |
| Figura 24 ..... | 60 |
| Figura 25 ..... | 62 |
| Figura 26 ..... | 62 |

**Índice de Tablas**

|                |    |
|----------------|----|
| Tabla 1 .....  | 21 |
| Tabla 2 .....  | 26 |
| Tabla 3 .....  | 31 |
| Tabla 4 .....  | 35 |
| Tabla 5 .....  | 38 |
| Tabla 6 .....  | 41 |
| Tabla 7 .....  | 50 |
| Tabla 8 .....  | 59 |
| Tabla 9 .....  | 61 |
| Tabla 10 ..... | 63 |
| Tabla 11 ..... | 63 |
| Tabla 12 ..... | 81 |

### **Agradecimientos**

Yo, Ariana Paola Chumi Pasato quiero agradecer a mis papás por entregar su tiempo y amor día a día el cual me ha permitido formarme y culminar la carrera.

Quiero agradecer al Dr. Giovanni Larriva y a la Ing. Verónica Pinos por ser quienes nos han orientado durante toda la investigación.

A mis amigas Michelle y Kelly por escucharme, cuidarme y guiarme en los tramos difíciles de la universidad.

Por último, mi más sincero agradecimiento a mi amiga Mary Rueda por alentarme y acompañarme en el transcurso de mi vida universitaria, por apoyarme en la realización del tema de tesis y también por brindarme su más sincero consejo y amistad.

## Agradecimientos

Yo, Mary Rueda, primero, agradezco a Dios por la vida que he recibido y por ayudarme a superar las dificultades que se me han presentado, además de poner en mi vida a personas excelentes que me han ayudado durante todo este trayecto.

Además, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todo el personal y dirección de la Universidad de Cuenca por su confianza y permiso para realizar toda la parte investigadora y experimental en estas instalaciones. Me gustaría agradecer a toda la facultad de Ciencias Químicas, a mis profesores y a mi directora de tesis, Dra. Verónica Pinos y mi asesor, el Dr. Giovanni Larriva, quienes impartieron sus conocimientos y enseñanzas para que pudiera desarrollar y culminar este proyecto de investigación con éxito. Agradezco a cada uno de ustedes por su dedicación, apoyo incondicional, paciencia y amistad.

Quisiera agradecer a mi compañera y amiga a lo largo de mi carrera profesional, Ariana Chumi, por querer combinar sus ideas con las mías que llevaron a la creación de nuestro proyecto en el que pusimos todo nuestro esfuerzo y compromiso, y por no rendirse cuando un experimento no produce los resultados deseados.

## Dedicatoria

Yo, Ariana Paola Chumi Pasato dedico mi trabajo de titulación a mi familia por todas sus enseñanzas:

A David, mi pequeño hermano por ser mi motivación y alegría, asimismo por su amor incondicional

A mi mamá Mercedes por enseñarme la perseverancia y dedicación

A mi papá Camilo por su entrega y responsabilidad

A mi hermana Isabel por su decisión y constancia

A mi hermana Gabriela por su empeño y compromiso

A Mauricio por ser un guía y compañero

Finalmente, a mi abuelo Carlos que, aunque en este momento no se encuentra con nosotros, su resiliencia y pasión me han impulsado a seguir mis ideales.

### Dedicatoria

Yo, Mary Rueda, dedico este proyecto investigativo a mis padres Carmen y Glicerio quienes me han apoyado y han estado presentes en todo momento dándome la oportunidad de estudiar, gracias a su amor, esfuerzo y paciencia me permitieron alcanzar una de mis grandes metas. Les agradezco infinitamente por educarme y enseñarme a valerme por mí mismo, de no tenerle miedo a las dificultades porque sé que Dios está conmigo en todo momento.

A mi hermana mayor Gabriela por todo el apoyo y cariño incondicional que me ha brindado, durante todo este trayecto, por permanecer a mi lado en todo momento. A toda mi familia en general pues con sus consejos, oraciones y palabras hicieron de mí una mejor persona y me han acompañado en todas mis metas y sueños.

Finalmente, a todas mis amigas, por apoyarme en todo momento y brindarme todo su amor siempre, en verdad agradezco a todos los que han estado ahí para mí.

## Introducción

El aumento de la población y de la industria conlleva que se descarguen grandes cantidades de desechos y residuos, que por lo general son tóxicos y nocivos para los seres vivos, a las fuentes de agua y los suelos, sin recibir un tratamiento previo, alterando así los ecosistemas y hábitats. Los aceites de motor usados son un tipo de desecho que son vertidos al alcantarillado, producto de los lavados de carros en lavadoras y lubricadoras, y posteriormente a las aguas de los ríos y mares, provocando contaminación (Barrios-Ziolo et al., 2015). Estos aceites tienen compuestos hidrocarburos, metales pesados, entre otros componentes peligrosos que no son fáciles de degradar (García et al., 2019). Ante la problemática ambiental que se vive en las últimas décadas, se busca implementar métodos que minimicen la contaminación del medio ambiente. Para ello, existen varias propuestas de métodos para la remediación de aguas y suelos que ya han sido contaminados, una de ellas es el uso de biosurfactantes. Actualmente, la elaboración de biosurfactantes se ha visto reducida debido a su alto costo de producción, puesto que las materias primas que se utilizan tienen un costo elevado de adquisición, y largos tiempos de fermentación (Rodrigues & Teixeira, 2008). Varios estudios han analizado desechos como el suero de los quesos, la melaza proveniente de la elaboración de azúcar de caña, desechos de destilería, cortezas de papas, entre otros, para ser usados como fuentes de carbono en los cultivos microbiológicos para la producción de los biosurfactantes. Estos desechos han dado buenos resultados con la ventaja de no tener un valor monetario lo que abarata los costos de la producción (Rodrigues et al., 2006). Entre los antes mencionados, los residuos de la elaboración del queso tienen un alto contenido de nutrientes, por lo que son una fuente óptima de carbono para la producción de biosurfactantes. Además, dando valor a estos residuos se evitará que terminen siendo desechados en fuentes hídricas con el peligro de eutrofización que conllevan (Rodrigues et al., 2006). Al estudiar los biosurfactantes es indispensable que se considere el estudio de metabolitos derivados de los microorganismos biocontroladores (Osorio, 2022).

Por lo antes mencionado este trabajo está enfocado en investigar y desarrollar un biosurfactante para ser aplicado en la biorremediación de aguas contaminadas con aceite de motor.

En el capítulo del marco teórico se discute sobre la estructura, composición química, clasificación y propiedades de los biosurfactantes, así como también los componentes que intervienen en la producción como son el suero como fuente de carbono y los microorganismos productores de biosurfactantes y sus condiciones de sembrado. Además, se habla acerca de los hidrocarburos como contaminantes del agua y su biorremediación utilizando biosurfactantes.

En el capítulo de la metodología experimental se aborda principalmente la obtención del biosurfactante con los procedimientos a seguir y los diferentes métodos para identificar y caracterizar el mismo, así como también el procedimiento que se empleó para la biorremediación. Por último, en los capítulos de resultados y en conclusiones se presentan los resultados obtenidos de los procesos implementados en la metodología y las principales conclusiones del trabajo.

## Objetivos

### Objetivo General.

- Obtener un biosurfactante por acción de *Streptococcus thermophilus* usando el suero de queso como fuente de carbono para el tratamiento de aguas contaminadas con aceite de motor, a escala de laboratorio.

### Objetivos Específicos.

- Optimizar el proceso de obtención del biosurfactante variando los factores tiempos de incubación y temperatura.
- Caracterizar los biosurfactantes obtenidos: actividad hemolítica, Parafilm, dispersión del aceite, índice de emulsificación, tensión superficial y de ecotoxicidad del biosurfactante obtenido.
- Evaluar la eficiencia del biosurfactante en el tratamiento de los efluentes contaminados con aceite de motor de lavadoras de carros, a escala de laboratorio

## Capítulo I: Marco teórico

### 1. Biosurfactantes

#### 1.1. Concepto y Tipos de biosurfactantes

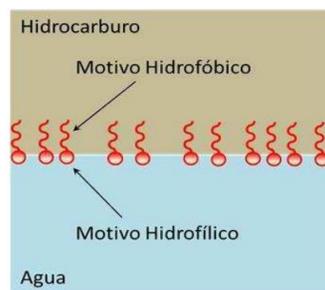
##### 1.1.1 Concepto

Los biosurfactantes son moléculas anfifílicas, es decir, tienen la capacidad de interactuar con compuestos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos, y pueden ubicarse en la interfase de los compuestos presentes (Raiger & López, 2009). Estos son de origen biológico, puesto que son producidos por varios microorganismos como bacterias, hongos y levaduras (Di Martino, 2015). Los microorganismos producen una gran variedad de surfactantes biológicos de alto y bajo peso molecular y naturaleza química. Las principales características de los biosurfactantes son la de reducir la tensión superficial de un líquido en la interfase y aumentar la solubilidad (Toribio Jiménez et al., 2014).

La mayoría de estos compuestos tienen cabezas polares que son aniónicas o neutras. Solo unos pocos son catiónicos como los que contienen grupos amino. Según Di Martino (2015) en su investigación, la parte hidrofílica de los biosurfactantes puede estar constituida de hidratos de carbonos, aminoácidos, péptidos cíclicos, grupos fosfato, ácidos carboxílicos o alcoholes y que la parte hidrofóbica de la molécula puede estar conformada de ácidos grasos de cadena larga, hidroxiácidos o  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -hidroxiácidos (Di Martino, 2015).

#### Figura 1

*Distribución de moléculas de biosurfactante en la interfase de 2 líquidos inmiscibles.*



*Nota.* Imagen tomada de (Di Martino, 2015).

En la figura 1 se puede observar la estructura de las moléculas de biosurfactantes que se ubican en la interfase de dos líquidos inmiscibles como son el agua y un hidrocarburo, en donde la cabeza es polar y tendrá afinidad por el agua, mientras que la cola es apolar y tiene afinidad por el aceite (Di Martino, 2015).

### 1.1.2 Tipos de biosurfactantes

Los surfactantes son producidos por síntesis química o biológica. Los que son producidos por métodos químicos son reemplazados por los de origen biológico, ya que, estos últimos tienen una baja toxicidad, son biodegradables y poseen una mejor compatibilidad con el ambiente (Jiménez et al., 2010).

Los biosurfactante se hallan de diversas formas (Irigoín, 2021) y pueden clasificarse según su origen, componentes químicos, peso molecular, uso o aplicación (Bohórquez, 2021).

#### - Según su composición química

**Glicolípidos:** Estos son los más comunes y están compuestos por carbohidratos (sacáridos) conectados a cadenas de ácidos grasos alifáticos o ácido hidroxialifático a través de un grupo éter o éster. Los carbohidratos que pueden estar presentes, incluyen ramnosa, manosa, glucosa, galactosa, sulfato de galactosa o ácido glucurónico (Adetunji & Olaniran, 2021). Estos biosurfactantes pueden ser de naturaleza aniónica o no iónica. Entre los más estudiados se encuentran ramnolípidos, trehalolípidos y soforolípidos (Bohórquez, 2021).

**Lipopéptidos y lipoproteínas:** Tienen propiedades antibacterianas gracias a su capacidad para disolver enzimas. Se utilizan en diversas industrias, como la de petróleo y gas, química y farmacéutica. Sus moléculas están formadas por ácidos grasos conectados por una cadena de aminoácidos. Las sustancias más frecuentemente estudiadas son la surfactina, la gramidicina y la polimixina. (Bohórquez, 2021).

**Fosfolípidos y ácidos grasos:** Este tipo de biosurfactantes son producidos en enormes cantidades por microorganismos cuando se cultivan en medios ricos en n-alcanos (Adetunji & Olaniran, 2021). Los fosfolípidos son componentes principales de las membranas microbianas y realizan importantes tareas biológicas, como la comunicación celular y el transporte de nutrientes y tensoactivos. Estos compuestos se forman cuando el glicerol se une a dos ácidos grasos y un fosfato. (Bohórquez, 2021).

**Biosurfactantes poliméricos:** Son mezclas complejas que contienen proteínas, lípidos y carbohidratos. Los más populares incluyen Emulsán, Liposán, Alasan. (Bohórquez, 2021).

**Biosurfactantes particulados:** Distribuyen la mezcla de agua y aceite y forman una micro emulsión en su interfase, lo que posibilita la absorción de alcano por parte de los microorganismos (Adetunji & Olaniran, 2021).

- Según su peso molecular

**Bajo peso molecular:** Normalmente, se trata de lipopéptidos, glicolípidos, aminoácidos modificados y ácidos grasos. La función principal de estos compuestos es reducir la tensión superficial y la superficie de contacto. Algunos de ellos son Surfactina, ramnolípido, soforolípido, viscosina, lípido glucosa, lípido trahalosa. (Bohórquez, 2021).

**Alto peso molecular:** Normalmente se trata de polisacáridos, lipopolisacáridos, proteínas y lipoproteínas. Estos compuestos no tienen la capacidad de reducir bien la tensión superficial, pero forman espuma y estabilizan eficazmente el aceite en agua. Estos incluyen Liposan, Glycoprotein, Alasan, BD4 Emulsán, insecticide emulsifier, Biodispersan (Bohórquez, 2021).

## 1.2 Preparación de biosurfactantes

Algunos medios de cultivo que son comúnmente empleados para el crecimiento de bacterias ácido lácticas son costosos como por ejemplo extracto de levadura, peptona y sales, por lo que se ha buscado otras alternativas más económicas (Rodrigues et al., 2006).

La producción de surfactantes de origen microbiano se ve alterada por factores como la fuente de carbono. El sustrato utilizado como alternativa económica para la fermentación con bacterias ácido lácticas es el suero. Otra fuente de carbono usada es la melaza, el cual es un subproducto de la industria azucarera, que por lo general es usado para la alimentación de animales y para la producción de etanol y levadura. Existen otros factores importantes para la fermentación de las bacterias ácido lácticas como la fuente de nitrógeno, también el pH, la agitación, el oxígeno y la temperatura (Martínez, 2014).

### 1.2.1 Suero de leche como fuente de carbono

El lactosuero o suero de leche se define como un producto lácteo obtenido al separar la cuajada de la leche durante la elaboración del queso por la acción de ácidos o enzimas de tipo cuajo que descomponen el sistema coloidal de la leche en dos fracciones: primero la fracción sólida compuesta principalmente de proteínas y lípidos insolubles que, en el proceso de precipitación, arrastran y atrapan algunos de los componentes solubles en agua. Segunda, una fracción líquida, equivalente al suero, en la que están suspendidos todos los demás nutrientes que no han sido integrados en la coagulación de la caseína (Poveda, 2013).

La norma ecuatoriana INEN 2594 define al lactosuero como:

Producto lácteo líquido obtenido durante la elaboración del queso, la caseína o productos similares, mediante la separación de la cuajada, después de la coagulación de la leche pasteurizada y/o los productos derivados de la leche pasteurizada. La coagulación se obtiene mediante la acción de, principalmente, enzimas del tipo cuajo. (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2011, p. 1)

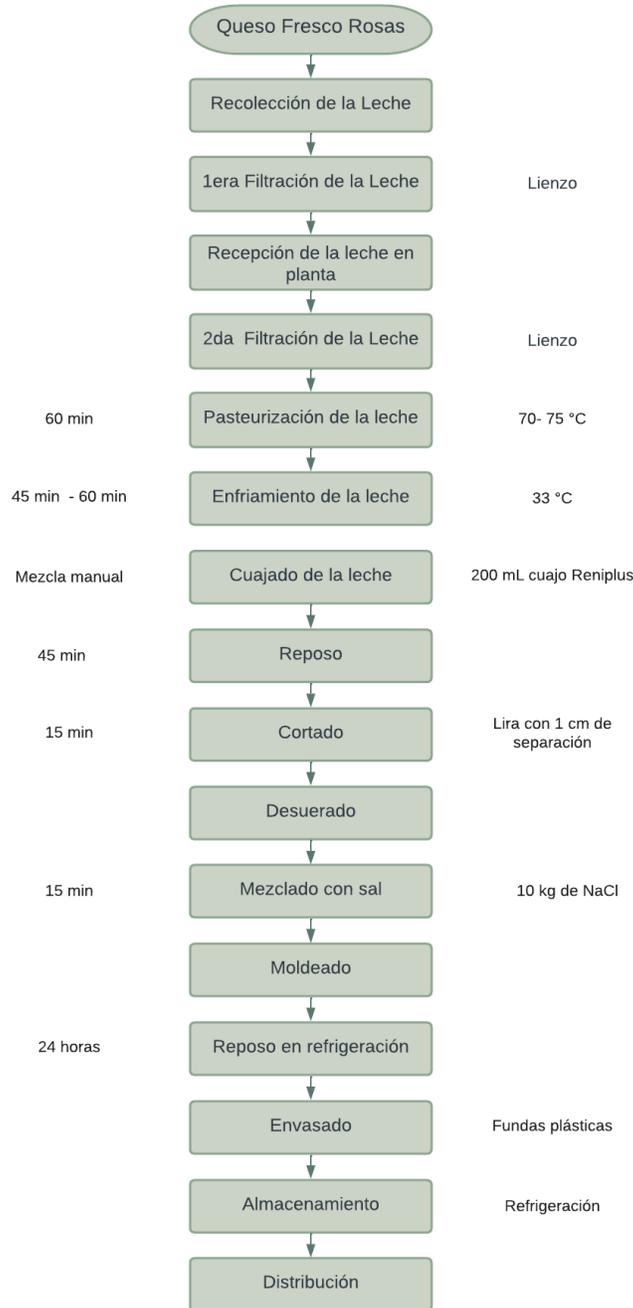
Según el proceso seguido en la elaboración de queso, existen 2 tipos de suero lácteo:

**Suero dulce:** Se obtiene a partir de la precipitación de las proteínas en la elaboración de queso, donde existe una hidrólisis específica de la k-caseína, por coagulación de enzimas proteolíticas (Hermosa, 2021). El pH es levemente ácido, entre 6.1 a 6.8, tiene altos niveles de calcio y fósforo, además de otros minerales solubles presentes en la leche (Carrero, 2019).

**Suero ácido:** Se obtiene de la coagulación ácida (adición de ácidos orgánicos) de la proteína caseína, en donde se provoca una disminución de pH hasta 4.5 debido a la producción de ácido láctico y alto contenido de minerales (Hermosa, 2021).

#### Figura 2

*Diagrama de flujo del proceso de elaboración de queso fresco.*



*Nota.* Diagrama de flujo de la elaboración del queso fresco de la fábrica “Lácteos Rosas”.

Se estima que de 10 litros de leche de vaca se pueden producir de 1 a 2 kg de queso y un promedio de 8 a 9 kg de suero. Esto representa alrededor del 90 % en volumen de la leche y contiene mayoritariamente compuestos solubles en agua. Dependiendo del origen de la leche o del tipo de queso producido, su composición varía, pero por lo general, el contenido aproximado es de 93.1% de agua, 4.9 % de lactosa, 0.9 % de proteína cruda, 0.6 % de cenizas, 0.3 % de

grasa, 0.2 % de ácido láctico y vitaminas hidrosolubles. Estos porcentajes muestran un gran desperdicio de nutrientes presentes en el suero, ya que la mayor parte es desechado y se vierte en los ríos y el suelo sin ningún tipo de tratamiento, lo que genera problemas de contaminación, presentando valores de DQO (demanda química de oxígeno) y DBO5 (demanda biológica de oxígeno) de entre 60 a 80 mil ppm y de 30 a 50 mil ppm, respectivamente, siendo la lactosa la mayor causante de estos altos niveles (Brito et al., 2015; País et al., 2017; Kotoupas et al., 2007).

En 2012, según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos del Ecuador (INEC), se registraron un promedio de 5.6 millones de litros de leche diarios a nivel nacional. Alrededor de un tercio de toda la producción láctea se emplea en la fabricación de los diferentes tipos de quesos, lo que representa un aproximado de 135 mil litros diarios de leche, generando alrededor de 122 mil litros diarios de suero (País et al., 2017).

### 1.2.2. Microorganismos productores de biosurfactantes

Varios estudios demuestran que algunos géneros microbianos producen biosurfactantes. La cantidad de producción del mismo está influenciada por el tipo de microorganismos y sus fuentes (Adetunji & Olaniran, 2021). La tabla 1 muestra los microorganismos y el tipo de biosurfactante que produce.

**Tabla 1**

*Diferentes microorganismos que producen biosurfactantes.*

| <b>Biosurfactante</b>  | <b>Microorganismos</b>   |
|------------------------|--|
| Ramnolípidos           | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,<br><i>Pseudomonas sp.</i> ,<br><i>Serratia rubidaea SNAU02</i>   |
| Trehalolípidos         | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ,<br><i>Rhodococcus erythropolis</i> ,<br><i>Arthrobacter sp.</i> ,<br><i>Nocardia sp.</i> ,<br><i>Corynebacterium sp.</i>     |
| Soforolípidos          | <i>Torulopsis bombicola</i> ,<br><i>Torulopsis petrophilum</i> ,<br><i>Candida bombicola</i> ,<br><i>Torulopsis apícola</i> ,<br><i>Rhodotorula babjevae YS3</i> |
| Ácido corinomicólico   | <i>Corynebacterium lepus</i>   |
| Ácido espiculispórico  | <i>Penicillium spiculisporum</i>   |
| Fosfatidiletanol-amina | <i>Acinetobacter sp.</i>   |

|              |   |
|--------------|---|
|              | <i>Rhodococcus erythropolis</i>           |
| Surfactina   | <i>Bacillus subtilis</i>                  |
| Lichenisina  | <i>Bacillus licheniformis</i>             |
| Emulsan      | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1  |
| Alasan       | <i>Acinetobacter radioresistens</i> KA-53 |
| Biodispersan | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A2     |
| Liposan      | <i>Candida lipolytica</i>                 |
| Mannoprotein | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>           |
| Viscosina    | <i>Pseudomonas fluorescens</i>            |

Nota. Tomado de (De la Rosa et al., 2014).

### 1.2.2.1 Bacterias Ácido Lácticas *Streptococcus thermophilus* para la producción de biosurfactante

En 1873, Joseph Lister, mientras analizaba una muestra de leche, descubrió unas bacterias que fermentan la leche, produciendo ácido láctico, por lo que posteriormente fueron denominadas bacterias ácido lácticas (Mejía, 2022). Estas bacterias se caracterizan por ser microorganismos grampositivos, no esporulados, que pueden estar como cocos por presentar formas esféricas u ovoides o bacilos teniendo formas alargadas, estando aislados o en grupos y el pH en el que sobreviven está entre 4.4 a 9.6 (Martínez & Paredes, 2019).

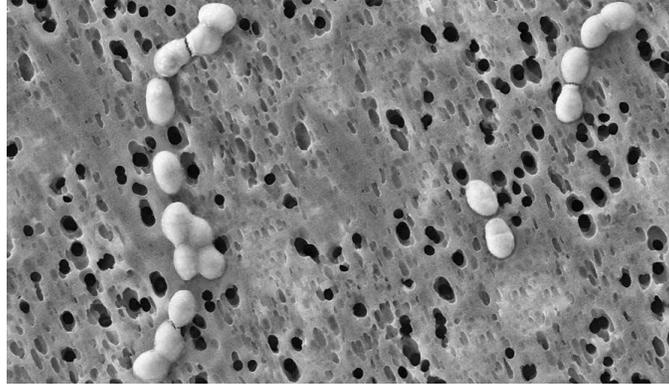
Las bacterias ácido lácticas son denominadas como un conjunto de microorganismos de varios géneros que por su metabolismo producen ácido láctico como principal metabolito y otros compuestos como etanol, CO<sub>2</sub> y acetato como productos resultantes de la fermentación a partir de los carbohidratos presentes en los alimentos. Algunos de los géneros se incluyen *Lactobacillus* y *Streptococcus*, de los cuales en su mayoría son utilizados para la preparación de cultivos iniciadores en la industria de alimentos, además de que ayudan a preservarlos, ya que inhiben a otros microorganismos. Son utilizados como probióticos, puesto que algunas de estas bacterias son saludables para el sistema gastrointestinal del ser humano (Sánchez, 2020).

Según Achigar (2014) las bacterias ácido lácticas “pertenecen al phylum Firmicutes, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*. Algunas familias incluyen a los *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae*” (p. 18).

*Streptococcus thermophilus* corresponde al grupo termófilo de las bacterias ácido lácticas, el cual, es un coco grampositivo, de forma esférica a ovoide, con un diámetro entre 0.7 a 0.9 µm, que se puede presentar en pares y cadenas. La temperatura de crecimiento de esta bacteria es de 40 a 45 °C y las cepas seleccionadas se desarrollan rápidamente en la leche quedando un coágulo firme sin gas (Harnett et al., 2011).

**Figura 3**

*Estructura microscópica de Streptococcus thermophilus.*



*Nota.* Imagen tomada de (CHR HANSEN, 2014).

Las bacterias *Streptococcus thermophilus* se utilizan por lo general en la producción de yogur, otras leches fermentadas como quark y kéfir, y varios tipos de queso como son mozzarella, requesón y, más recientemente, cheddar. Esta bacteria muestra una notable adaptación al crecimiento en la leche. Su principal característica en una fermentación láctica es la producción de ácido láctico, lo que resulta en una rápida acidificación e inhibición de otros microorganismos patógenos o no deseados (Markakiou et al., 2020).

En las últimas décadas, las bacterias ácido lácticas han sido estudiadas para ser implementadas en la producción de biosurfactantes. Martínez (2014) utilizó varias cepas de bacterias ácido lácticas para obtener un surfactante biológico para posteriormente ser usado en procesos de recobro mejorado de petróleo. En cambio, Rodrigues et al. (2006) estudiaron cepas de bacterias *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* para la producción de un biosurfactante usando medios de cultivos de bajo costo. Alkan et al. (2019) utilizaron residuos de suero de leche como fuentes alternativas para la producción de biosurfactantes, usando varias cepas de bacterias ácido lácticas, dando resultados positivos con respecto a medios sintéticos. El biosurfactante obtenido redujo efectivamente la tensión superficial del agua de 72 a 48 mN/m

## 1.3 Caracterización de un biosurfactante

### 1.3.1 Detección y cuantificación de biosurfactante

**Capacidad emulsificante:** Se determina por el índice de emulsión, el cual se define como el porcentaje de parafina líquida emulsionada durante 2 minutos en un agitador Vortex a temperatura ambiente, registrada después de 24 horas (Sulbarán et al., 2005). Este índice se determina calculando el porcentaje de la altura de la capa emulsionada (cm) dividido por la altura total de la columna de líquido (cm), siguiendo con la siguiente ecuación (Becerra & Horna, 2016):

$$\%IE = \frac{\text{Altura de emulsión formada (cm)}}{\text{Altura total de la solución (cm)}} * 100$$

**Medición de la tensión superficial:** Consiste en medir la fuerza requerida para mover hacia arriba un anillo sumergido en una solución que contiene el biosurfactante a través de la superficie de un líquido en el aire, el cual se realiza mediante el método del anillo de du Nouy (Rosas, 2018). La fuerza para mover el anillo está relacionada con la tensión superficial e interfacial mediante la siguiente fórmula:

$$\gamma = \frac{\beta * f}{4 * \pi * r}$$

Donde f es el empuje aplicado al anillo en dinas, r es el radio medio del anillo,  $\beta$  es un factor de corrección y  $\gamma$  es la tensión superficial (Mondragón, 2011).

**Actividad hemolítica:** Los biosurfactantes tienen la capacidad de romper los glóbulos rojos de la sangre. La presencia de un halo de hemólisis alrededor de las bacterias indica la lisis de los eritrocitos y, por lo tanto, la presencia del biotensoactivo (Lara-Severino et al., 2017).

**Dispersión de aceite:** Esta prueba detecta la formación semicuantitativa de biosurfactantes por la formación de un halo de emulsión sobre una capa ligera de hidrocarburo, la cantidad de biosurfactante producido es directamente proporcional al diámetro del halo formado de la emulsión, este diámetro es medido con una regla (Mondragón, 2011).

**Colapso de gota:** Se coloca una gota del sobrenadante de cultivo preparado con anterioridad sobre una superficie. Si el sobrenadante del cultivo bacteriano contiene biosurfactante, las gotas colapsarán debido a una disminución en la tensión interfacial entre la gota líquida y la superficie hidrofóbica (Lara-Severino et al., 2017).

### 1.3.2 Propiedades fisicoquímicas

Una de las principales propiedades de los biosurfactantes es la reducción de la tensión superficial e interfacial. Esta disminución de la tensión superficial se produce a medida que aumenta su concentración en el sistema aceite/agua o agua/aire, alcanzando un punto crítico cuando el tensoactivo, inicialmente en forma monomérica, puede formar estructuras como micelas y bicapas o burbujas. Esta concentración, definida como concentración micelar crítica (CMC), es el punto en el que los monómeros libres comienzan a agregarse, con la región hidrofóbica del surfactante concentrada alrededor del compuesto hidrofóbico y la hidrofílica en contacto con el agua para lograr la máxima reducción de la tensión superficial/interfacial (Santos, 2017). Esto quiere decir que cuando se tiene una mezcla de 2 líquidos inmiscibles, el biosurfactante se ubica en la interfase en una forma de monocapa en la cual se puede evidenciar la parte polar hacia la fase acuosa y la no polar hacia la fase hidrofóbica, siendo que cuando aumenta la concentración del biosurfactante, se forma una emulsión (Barrionuevo, 2017).

Otra propiedad que presentan los biosurfactantes es la capacidad de formar emulsiones, esto se puede evidenciar con el balance hidrofílico lipofílico (HLB) que es una medida que indica si un biosurfactante produce emulsiones agua - aceite o emulsiones aceite - agua. Cuando la emulsión tiene un valor de HLB bajo son lipofílicos y se estabilizan en emulsiones agua en aceite, y mientras tengan un alto valor de HLB son hidrofílicos y poseen una mejor solubilidad en agua. Los valores de HLB están entre 1 a 20, y dependiendo del valor, se puede determinar su uso (Martínez, 2014).

Otra propiedad es el número de agregación que indica el número promedio de moléculas de tensoactivo que forman las micelas. Los agregados micelares suelen constar de 20 a 100 monómeros con un radio aproximado de 1.5 a 30 angstrom. (Jiménez et al., 2010).

Un factor importante es la temperatura que afecta en la solubilidad de los biosurfactantes en soluciones acuosas, en el cual su efecto se ha evidenciado en soluciones micelares de surfactantes no iónicos. Dicho efecto se denomina punto de nube y esta es la temperatura a la que el tensoactivo pierde su solubilidad en solución acuosa, dándole una apariencia turbia a nivel macroscópico. A medida que aumenta la temperatura, la solubilidad del surfactante disminuye y las moléculas insolubles alteran el equilibrio que existe entre la molécula de surfactante y la molécula de agua, provocando transiciones de fase y turbidez resultante. (Jiménez et al., 2010).

Se presentan otras propiedades como adsorción de compuestos que ayudan a los microorganismos a retener las moléculas hidrofóbicas, la facultad de actuar como agente dispersante y espumoso, aumento de la solubilidad mediante la formación de micelas que encierran las moléculas insolubles que posibilita su dilución (Santos, 2017).

**1.4 Aplicaciones de los biosurfactantes**

Actualmente, los biosurfactantes son utilizados ampliamente en varias áreas como se muestra en la siguiente tabla.

**Tabla 2**

*Aplicaciones de los biosurfactantes.*

| Área        | Aplicación  | Referencia                                |
|-------------|---|---|
| Agricultura | Control de plagas en cultivos   | (Martínez & Osorio, 2007)                 |
| Industrial  | -Ingrediente para productos de limpieza y sanitización<br>-Construcción, textiles, plásticos, papel, petróleo   | (Cruz, 2022)                              |
| Medicina    | Funcionan como moléculas inmunomoduladoras y tienen usos potenciales en vacunas y terapia génica  | (Alpaca, 2016)                            |
| Ambiental   | -Remoción de arsénico en aguas subterráneas destinada al consumo humano<br>-Degradación de hidrocarburos<br>-Remoción de metales tóxicos en el suelo<br>-Recuperación de petróleo | (Gonzales, 2011)<br>(Araujo et al., 2008) |

|              |  |                       |
|--------------|--|-----------------------|
|              | -Remediación de aguas contaminadas con hidrocarburos |                       |
| Alimentos    | Ingrediente de formulación                           | (Cortés et al., 2013) |
| Farmacéutica | Fabricación de productos cosméticos y farmacéuticos  | (Satoque, 2010)       |

## 2. Biorremediación de aguas contaminadas con hidrocarburos

### 2.1 Los hidrocarburos como contaminantes del agua

Los hidrocarburos como contaminantes son un severo problema debido a los componentes tóxicos que se encuentran tanto en el petróleo como en sus derivados, y al hecho de no ser fácilmente degradables. Cuando los hidrocarburos se mezclan con agua, algunos de ellos pueden disolverse hasta cierto punto, causando problemas de salud en los humanos, incluido el cáncer (Marín et al., 2019).

La industria petrolera y petroquímica es la columna vertebral de la cadena de producción de hidrocarburos y derivados destinados a satisfacer los requerimientos energéticos de los productos combustibles y lubricantes industriales y de transporte (Mesa et al., 2019). El crudo petrolífero tiene una composición química muy compleja y variable, dependiendo de su origen. Contiene entre un 50 a 90 % de sustancias hidrocarbonadas como son n-alcanos, alcanos ramificados, cicloalcanos e hidrocarburos aromáticos. Además de la presencia de pequeñas cantidades de otros elementos como nitrógeno, azufre y oxígeno, y algunos metales en forma de complejos y partículas coloidales (García et al., 2019), por lo tanto, no se degradan con facilidad ya que sus compuestos son muy hidrófobos y de muy baja solubilidad en agua. Es así, que existen tratamientos altamente útiles para resolver esta problemática como lo es la biorremediación, que permite la restauración de suelos o aguas contaminadas, lo que supone una alternativa biotecnológica muy interesante (Rodríguez-Gonzales et al., 2022).

Dentro del grupo de derivados del petróleo, están los aceites de motor, los cuales, su producción mundial es de aproximadamente el 2% del crudo total refinado, que corresponde a un consumo cerca de los 38 millones de toneladas al año. Estos aceites cumplen algunas funciones en la industria por lo que son ampliamente utilizados, puesto que ayuda a mantener y evitar que los

motores de las máquinas, automóviles se dañen (Terradillos et al., 2004). Luego de un tiempo de uso, pierden sus características iniciales, y como consecuencia su funcionalidad, convirtiéndose en parte de uno de estos desechos dañinos denominados aceites usados de motor (Mosquera & Serrano, 2014).

El aceite lubricante usado de motor contiene varios compuestos químicos como metales pesados, además de hidrocarburos aromáticos polinucleares, benceno y en algunas ocasiones puede haber presencia de solventes clorados, PCBs, etc., llegando a producir un efecto directo sobre la salud humana ya que pueden llegar a ser cancerígenos (Fong et al., 2017). Estos aceites pueden llegar a contaminar hasta un millón de galones de agua dulce con efectos importantes sobre los ecosistemas expuestos (Barrios-Ziolo et al., 2015).

En el Ecuador se desechan alrededor de 54 millones de litros de aceites usados al año, de los cuales, solo el 70% pertenecen a uso doméstico y lo demás que equivale a aproximadamente 4 millones de galones corresponden al sector automotor e industrial. Actualmente, en la ciudad de Cuenca, se recolectan alrededor de 34 mil galones de aceites usados al mes provenientes de lavadoras, mecánicas, vulcanizadoras e industrias que representa el 55% que se utiliza en mencionada ciudad (Vásconez, 2018).

Dentro de la legislación ecuatoriana, en el libro VI de la TULSMA (Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente) se establece la gestión y el manejo de desechos peligrosos, antes, durante y después de su generación, para evitar contaminación en el ambiente, en el cual, define a los desechos peligrosos como:

Los desechos sólidos, pastosos, líquidos o gaseosos resultantes de un proceso de producción, extracción, transformación, reciclaje, utilización o consumo y que contengan alguna sustancia que tenga características corrosivas, reactivas, tóxicas, inflamables, biológico-infecciosas y/o radioactivas, que representen un riesgo para la salud humana y el ambiente de acuerdo a las disposiciones legales aplicables, y lo establecido en el presente Libro (Ministerio del Ambiente, 2015, p. 4).

En el mismo libro, anexo 1, se establecen normas para la descarga de efluentes al sistema de alcantarillado, en el cual, el límite máximo permisible de descarga de compuestos como hidrocarburos totales de petróleo y aceites y grasas son de 20 y 70 mg/l respectivamente.

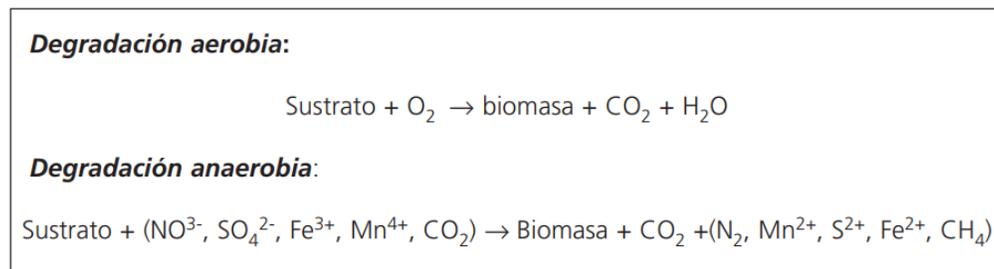
## 2.2 Biorremediación de aguas contaminadas con hidrocarburos usando biosurfactantes

Según Contreras y Carreño (2018) “la biorremediación consiste en usar plantas y microorganismos que pueden ser naturales o modificados genéticamente para neutralizar los contaminantes, disminuyendo o eliminando su toxicidad para los seres vivos” (p. 28). Es un método económico y más amigable con el medio ambiente, además de ser menos invasivo a comparación con otras técnicas donde se usan reactivos nocivos (Jiménez, 2020).

Maroto y Rogel (2004) explican el fundamento bioquímico de la biorremediación, el cual está basado en el hecho de que en la cadena respiratoria, o transportador de células de electrones, se producirá una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo propósito es obtener energía. Esta cadena es iniciada por un sustrato orgánico como son los compuestos de hidrocarburos, que es externo a la célula y actúa como un proveedor de electrones, de modo que la actividad metabólica celular finalmente se degrade y se consuman estas sustancias.

### Figura 4

*Esquema de reacciones óxido reducción del proceso de degradación microbiana.*



*Nota.* Imagen tomada de (Maroto & Rogel, 2004).

Domínguez-Gaibor et al. (2021) refieren algunos requisitos básicos para que exista la biodegradación de los compuestos hidrocarburos:

- Los organismos degradantes convenientes son por lo general bacterias y hongos.
- El carbono orgánico es la fuente de energía, el cual es principalmente oxidado a CO<sub>2</sub>. La fuente de energía es considerada como donador de electrones.
- El carbono para el crecimiento celular viene también del carbono orgánico.

- Se necesita de nutrientes incluyendo nitrógeno, fósforo, calcio, magnesio, hierro y elementos traza. El N y P se necesitan en grandes cantidades.
- Los aceptores de electrones son generalmente  $O_2$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4$ ,  $Fe^{3+}$  y  $CO_2$ .
- Las condiciones medioambientales aceptables como el pH, salinidad, presión hidrostática, radiación solar, sustancias tóxicas, oxígeno, entre otras, deben estar dentro de los límites permitidos para el bioproceso en particular.

### **2.2.1 Organismos usados en la biorremediación de hidrocarburos.**

Algunos microorganismos tienen la capacidad para degradar hidrocarburos los cuales pueden ser bacterias, hongos y levaduras. Las bacterias son el conjunto de microorganismos más variable con respecto a la degradación de hidrocarburos, puesto que el 96% de los aislados en medios líquidos presentan la capacidad de crecer y emulsificar compuestos de hidrocarburos (Riojas et al., 2010).

Los hidrocarburos de petróleo al ser una mezcla compleja de varios compuestos, requieren la acción de más de una especie de microorganismos, ya que cada género tiene una capacidad limitada para degradar las diferentes moléculas que los conforman y convertirlas en subproductos y metabolitos que pueden ser menos peligrosos para el medio ambiente (Medina et al., 2014).

Además de bacterias, los hongos son otro tipo de microorganismos que son utilizados en la biorremediación. Medina et al. (2014) aislaron 3 tipos de hongos del género *Aspergillus* de un suelo contaminado con petróleo, de los cuales, la especie de *Aspergillus niger* demostró tener una mayor capacidad de degradar hidrocarburos. La acción de los 3 tipos de hongos logró obtener hasta un 85% de reducción de los hidrocarburos totales de petróleo de una muestra de suelo a los 30 días.

### **2.2.2 Biorremediación con biosurfactantes**

La función principal de un biosurfactante es la de reducir la tensión superficial, por lo que al aplicarlo permite la movilización y reducción de los contaminantes presentes en el medio que se vaya a tratar (Frolich, 2021). La mayoría de los compuestos presentes en los hidrocarburos son hidrófobos, haciendo que sean difíciles de degradar por los microorganismos, por lo tanto, al utilizar los biosurfactantes, permiten que estos compuestos se solubilizan e incrementan la biodegradación al tener un mayor contacto con el contaminante (Araujo et al., 2008).

Varios estudios demuestran la efectividad en el uso de biosurfactantes para acelerar el proceso de biorremediación, como se puede ver en la tabla 3:

**Tabla 3**

*Estudios realizados del uso de biosurfactantes en la biorremediación*

| <b>% Remediación</b> | <b>Tiempo, días</b> | <b>Tratamiento</b>  | <b>Contaminante</b>   | <b>Efecto</b>  | <b>Referencia</b>     |
|----------------------|---------------------|---|-----------------------|--|-----------------------|
| 81                   | 90                  | Se utilizó surfactantes biológicos producidos por cepas bacterianas junto con un consorcio de bacterias en muestras de aguas contaminadas con hidrocarburos | Crudo liviano en agua | Aumento de la eficiencia del proceso de biorremediación.                           | (Araujo et al., 2008) |
| 94                   | 90                  | Se utilizó biosurfactantes de tipo ramnolípido y surfactina junto con microorganismos   | Diésel                | Mejorar la eficiencia de biorremediación de aguas y suelos contaminados con diésel | (Whang et al., 2008)  |
| 39.4%                | 100                 | Se combinó nutrientes   | Petróleo pesado       | Mejorar de manera  | (Dai et al., 2023)    |

|     |   |   |                              |  |
|-----|---|---|------------------------------|--|
|     |   | minerales naturales de liberación lenta y biosurfactant es ramnolípidos en la biorremediación   |                              | efectiva la actividad metabólica de los microorganismos autóctonos Enricimiento de las bacterias que degradan el petróleo mejorando la biodegradación del mismo. |
| 23% | 7 | Se comparó la eficiencia de la biorremediación entre biosurfactant es y surfactantes sintéticos | Aceite de petróleo del suelo | de Aumento de un 63% de la eficiencia de la biorremediación al usar un biosurfactant e del tipo ramnolípidos (Lai et al., 2009)                                  |

## Capítulo II: Metodología experimental

El proyecto se centró en la obtención y optimización de un biosurfactante mediante la implementación de bacterias ácido lácticas y el suero de queso como fuente de carbono, y a su vez, utilizar en la biorremediación de aguas contaminadas con aceite de motor.

### 1. Obtención del biosurfactante

#### 1.1. Cepas microbianas y condiciones de cultivo

La cepa empleada es *Streptococcus thermophilus* de la marca CHR HANSEN variedad STI – 12. La temperatura de activación estuvo entre 37 y 45 °C que corresponden a las condiciones óptimas para el microorganismo. Para la activación de la cepa se preparó una solución de agua-suero esterilizado en una relación 8:2 y se incubó a 37°C durante 24 horas. La cepa fue observada en el microscopio luego del proceso de incubación.

Para el conteo de UFC se hizo por dilución hasta 10<sup>-5</sup>, siguiendo la norma INEN 1529-7:2013, en donde se prepararon medios de cultivo con agar en cajas Petri y luego se colocó 0.1 ml de las diluciones del inóculo activado en cada caja, posteriormente con la ayuda de una espátula de Drigalsky se extendió el inóculo por todo el medio de cultivo. Se sellaron las cajas con Parafilm y se incubaron en la estufa a 37°C por 48 h.

Se contó el número de colonias, luego se multiplicó por el factor de la dilución y se dividió para el volumen utilizado, empleando la siguiente fórmula:

$$UFC/ml = \frac{\text{recuento de colonias} * \text{inverso de la dilución}}{\text{Volumen utilizado}}$$

Adicionalmente, para corroborar los resultados, se utilizó el equipo Turbidímetro con cada dilución empleada, en donde mientras mayor sea el factor de dilución, menor será el valor de turbidez.

## 1.2. Análisis preliminar y pretratamiento del suero

Se determinaron los parámetros de densidad, proteína, lactosa, grasa y pH, para ello se utilizaron los equipos Milkotester (modelo Master Pro) y potenciómetro para medir el pH.

### 1.2.1 Pretratamiento del suero

Como parte del pretratamiento del suero, se procedió a la esterilización del mismo a 121 °C durante 45 minutos. Cumplido el tiempo se efectuó un proceso de filtrado para separar las proteínas y grasas del líquido. Se tomó una alícuota de 100 ml de suero y se ajustó el pH a 6.8 con NaOH 1N.

## 1.3. Producción del biosurfactante

Se activó el inóculo a una temperatura de 37 °C. Luego se tomó una alícuota del 10% de inóculo activado y se añadió al suero esterilizado. El proceso de fermentación se efectuó durante 72 horas a 37 °C.

## 1.4. Separación del biosurfactante

Luego de la fermentación, el caldo de cultivo se centrifugó a 4000 rpm durante 30 minutos. Se retiró el precipitado. La extracción del biosurfactante se llevó a cabo mediante el método de precipitación ácida con etanol al 96 %. Se tomó la muestra con el cultivo de 100 ml y se acidificó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5N hasta ajustar un pH de 2. Se agregó un volumen de etanol igual a la muestra y se agitó vigorosamente hasta que los componentes se encuentren mezclados en su totalidad. Este procedimiento se modificó en base a la metodología descrita en Santos (2017). La aparición de un precipitado blanco indicará la presencia del biosurfactante. Posterior a ello, la muestra fue separada mediante centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos, quedando el precipitado blanco, el cual fue lavado dos veces con agua destilada y luego se evaporó durante 12 horas en la estufa a 45 °C.

## 1.5. Optimización

Se realizó un diseño factorial completo de tres niveles y dos factores, ver tabla 4. Siendo la variable respuesta la cantidad de surfactante obtenido. Se evaluaron los efectos principales (temperatura y tiempo) y su combinación mediante análisis estadístico ANOVA en el programa R Studio.

Tabla 4

*Factores escogidos para el proceso de optimización*

| <b>Factores</b> | <b>Niveles</b> | <b>Valores de niveles</b> |
|-----------------|----------------|---------------------------|
| Temperatura     | 3              | 38, 40, 42 °C             |
| Tiempo          | 3              | 24, 48 y 72 horas         |

La temperatura juega un papel importante ya que de ella depende la velocidad del crecimiento del cultivo y la producción del biosurfactante, por ello cabe estudiar la influencia de esa y su relación con el tiempo de fermentación.

Posterior al proceso de optimización, se realizaron las pruebas para la caracterización del biosurfactante resultante.

## 2. Caracterización del biosurfactante

### 2.1.1. Actividad Hemolítica

Mediante la realización de la prueba se determinó la presencia del biosurfactante, el cual provocó la descomposición de los glóbulos rojos. Se midió al inocular por punción una colonia de las cepas de *Streptococcus thermophilus* en placas de Agar Sangre, e incubadas a 37 °C por 48-72 horas (Santos, 2017). Se consideraron positivas aquellas cepas que presentaron una zona clara alrededor de las colonias, y se tomó en cuenta el halo de las colonias. La presencia de una zona difusa de color verde representa un comportamiento  $\alpha$ -hemolítico, si tiene una zona clara, se considera  $\beta$ -hemolítico y finalmente, si no presenta un cambio alrededor de la colonia, es un comportamiento  $\gamma$ -hemolítico.

### 2.1. Detección de la presencia de biosurfactante

Transcurrido el periodo de fermentación, el líquido resultante se sometió a un doble proceso de centrifugación durante 30 minutos para cada uno. Posterior a ello, se descartó el precipitado y el sobrenadante se colocó en refrigeración para su uso en las diferentes pruebas de detección del biosurfactante.

### 2.1.2. Dispersión de aceite

La prueba de dispersión de aceite (OSM) se realizó modificando la metodología citada en Alkan et al. (2019) para el cumplimiento de los objetivos del estudio. En una caja Petri de 9 cm de diámetro se colocaron 25 ml de agua destilada y se adicionaron 10 uL de aceite de motor usado en el centro de la placa. Posteriormente se añadió 20 uL del producto obtenido después de la fermentación en la mitad del aceite. Se midió el diámetro de la zona transparente en centímetros. Se realizó una comparación teórica con los diámetros de la zona de Tween 80 como muestra de control positivo. El diámetro de la zona transparente (cm) se evaluó como “+” para 0,5–0,9 cm, “++” para 1–1,5 cm, “+++” para 1,5–2,1 cm y “++++” para 2,1 cm (Santos, 2017).

### 2.1.3. Prueba con Parafilm

A 2 ml del sobrenadante se le añadió una gota de azul de metileno. Después se tomaron 10 µl de la mezcla y se colocó sobre un pedazo de Parafilm, se aseguró de dejar una gota sin agitar sobre este. El aspecto de la gota fue examinado 1 minuto después de ser colocada sobre el Parafilm. Si la gota mantuvo su forma entonces, se estimó como negativo, en lo que, si la gota tomó una forma plana o “colapsada”, se valoró como positiva (Santos, 2017).

### 2.1.4. Determinación del Índice de Emulsificación (IE24)

La actividad emulsificante fue medida añadiendo 5 ml de hexano en 5 ml de la muestra acuosa y con agitación a alta velocidad en un vórtex durante 2 minutos. Las mediciones se realizaron 24 horas después. El índice de emulsión (E24) es la altura de la capa de emulsión, dividida por la altura total, multiplicada por 100 (Di Martino, 2015).

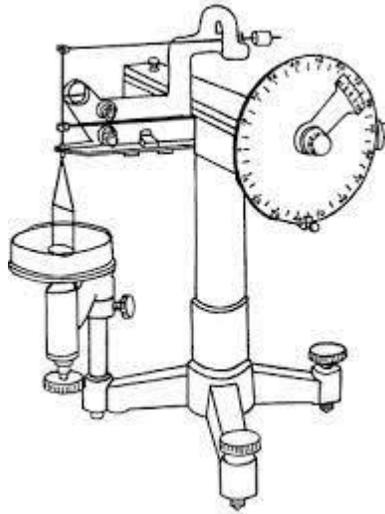
$$\%E = \frac{\text{Altura de la capa de emulsión}}{\text{Altura total}} * 100$$

### 2.1.5. Prueba de Tensión Superficial

En la determinación de la tensión superficial se utilizó una muestra del líquido fermentado que contiene el biosurfactante. La prueba se realizó utilizando el método del anillo. Siguiendo la norma NTE INEN 834, con un dinamómetro se midió el empuje máximo ejercido por el fluido sobre el anillo de Platino - Iridio. La tensión superficial se calculó a partir del diámetro del anillo y de la fuerza medida (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2013).

**Figura 5**

*Tensiómetro de Du Nouy.*



*Nota.* Tomado de (Carrera et al., 2013).

## **2.2. Test de ecotoxicidad al biosurfactante**

Para el fin del estudio, se siguió la metodología planteada en (Núñez & Hurtado, 2005). *Daphnia magna* es un crustáceo cladóceros utilizado como bioindicador ambiental de efluentes dulceacuícolas en ensayos ecotoxicológicos. Para evaluar la sensibilidad de las cepas se calculó la concentración efectiva media (EC50) frente al biosurfactante. Se expusieron 20 neonatos a las diferentes cantidades de biosurfactante 30; 25; 20; 15; 10; 5 y 0 mg/L y se realizó el conteo de neonatos inmovilizados a las 24 horas y 48 horas. Se calculó el valor EC50, o concentración donde murió el 50 % de los crustáceos.

## **3. Aplicación en biorremediación del agua**

Antes del proceso de biorremediación es importante conocer la ecotoxicidad del biosurfactante ya que, de aplicarse en procesos de remediación, se debe procurar que el producto no cause daño al ambiente o este sea inferior al de productos sintéticos de uso similar.

### 3.1. Biorremediación

Las muestras analizadas fueron preparadas a partir de agua destilada y aceite de motor usado. Según la metodología descrita en Araujo et al. (2008), cada tratamiento se preparó agregando el biosurfactante obtenido de las cepas (10% v/v), el inóculo (10%v/v) y el agua contaminada con aceite de motor para un volumen total de 100 ml. Los diferentes tratamientos fueron incubados durante 15, 30 y 45 días a una temperatura de 40 °C y agitación suave de 40 rpm. Además, se realizaron análisis de hidrocarburos totales antes y después del tratamiento. Los resultados se compararon con una muestra patrón que consiste en la mezcla de agua con aceite de motor.

**Tabla 5**

*Diferentes tratamientos empleados para la biorremediación.*

| Tratamiento  | Agua<br>(ml) | Aceite<br>(ml) | Biosurfactante<br>(ml) | Inóculo (ml) |
|--|--------------|----------------|------------------------|--------------|
| <b>Agua + aceite (AA)</b>                                      | 99           | 1              | ----                   | ----         |
| <b>Agua + aceite + inóculo (AAI)</b>                           | 89           | 1              | 10                     | ---          |
| <b>Agua + aceite +<br/>biosurfactante + inóculo<br/>(AAIB)</b> | 79           | 1              | 10                     | 10           |

### 3.2 Determinación de hidrocarburos totales de petróleo

Para determinar el porcentaje de remoción del aceite de motor usado en el agua, se emplearon 2 métodos, el método gravimétrico basado en la norma 5520 de la Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, y el método de espectroscopía UV-Visible

El procedimiento seguido para el método gravimétrico consistió en evaporar la muestra de agua con aceite de los diferentes tratamientos propuestos, en un rotavapor y luego extraer el aceite que queda como residuo con una cantidad de 10 ml de n-hexano (marca EMSURE), posteriormente secar el solvente y pesar.

La fórmula para calcular los HTP es la siguiente:

$$HTP(mg/L) = \frac{(P2 - P1) * 1000000}{V}$$

Donde P1 corresponde al peso del recipiente vacío en gramos, P2 al peso del recipiente con el residuo de muestra en gramos y V al volumen de muestra inicialmente medido en ml.

Para el análisis en espectroscopía UV-Visible de las muestras, se utilizó un espectrofotómetro marca THERMO SCIENTIFIC, modelo GENESYS 180. Primero se obtuvo una curva de calibración midiendo la absorbancia de una serie de soluciones de concentraciones conocidas, con n-hexano como sustancia patrón y se trabajó en un intervalo de longitud de onda entre 200 a 400 nm para el caso de hidrocarburos (Mesa et al., 2019). Posteriormente, las muestras que fueron evaporadas en el rotavapor y extraídas con n-hexano, fueron medidas en el espectrofotómetro para conocer la absorbancia, y utilizando la fórmula de la curva de calibrado, se obtuvo la concentración de la muestra de aceite usado de motor.

## Capítulo III: Resultados y Discusión

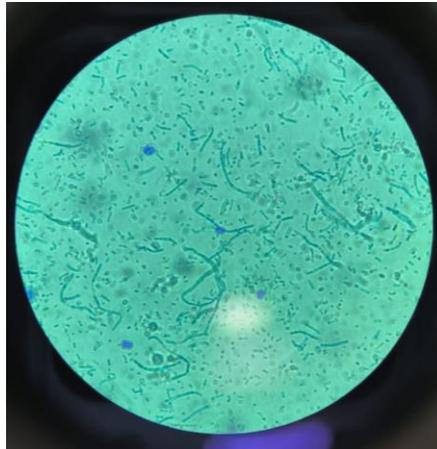
### 1. Obtención del biosurfactante.

#### 1.1. Cepas microbianas y condiciones de cultivo.

El cultivo fue realizado a una temperatura de activación de 37°C en una mezcla de agua y suero esterilizado como fuente de carbono con una relación 2:8 suero: agua. Al ser una bacteria anaerobia, el proceso de fermentación se realizó en un frasco sellado limitando la presencia de oxígeno. En la figura 6 se muestra las bacterias observadas en el microscopio que tienen forma ovoide y la mayoría están agrupadas formando cadenas alargadas, que se desarrollan conformando pares conocidos como diplococos como menciona García (2010), por lo que se puede evidenciar la presencia de *Streptococcus thermophilus* en la cepa estudiada.

#### Figura 6

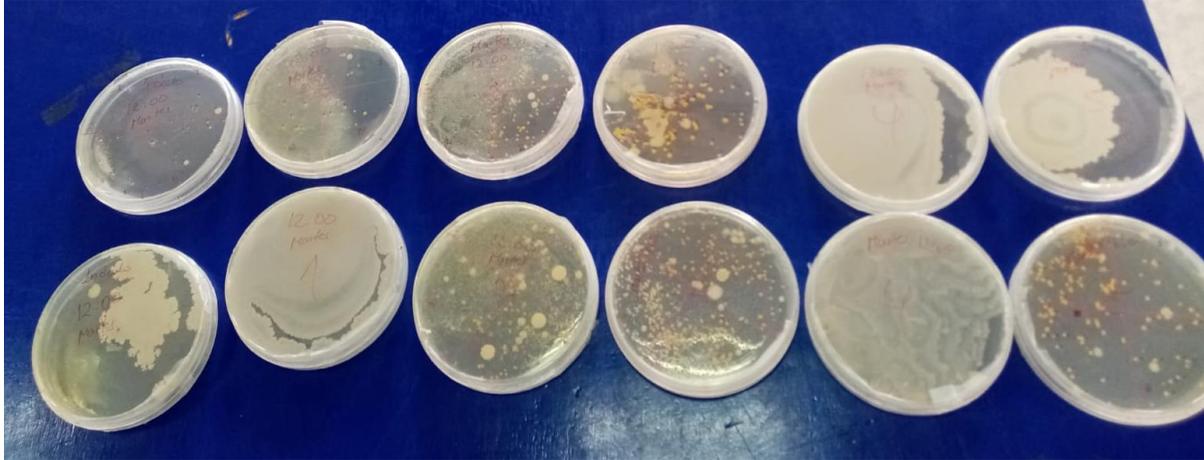
*Estructura de la cepa estudiada observada al microscopio a 100x.*



Para el recuento de colonias, transcurridas 48 horas, se eligió la dilución de  $10^{-4}$  que dio un recuento de colonias en la caja Petri de 134 y utilizando la fórmula, se obtuvo el siguiente resultado:  $UFC/ml = 1.34 \times 10^7$

**Figura 7**

*Recuento de colonias de Streptococcus thermophilus en caja Petri.*



En la figura 7 se muestra el crecimiento de las colonias de *Streptococcus thermophilus* en las cajas Petri, en las cuales se pueden observar círculos de diferentes tamaños de color blanquecino correspondientes a las colonias de la bacteria estudiada. Cabe mencionar que el medio de cultivo utilizado fue Agar enriquecido, por lo que los valores del recuento son menores a comparación de otros estudios en los cuales se utilizaban Agar M-17 o medio MRS (García, 2010; Rodríguez et al., 2014). Se visualizó su característico color blanco con diámetros menores a 3 mm (Rodríguez et al., 2014).

### 1.2. Análisis preliminar y pre tratamiento del suero.

La medición de los parámetros del suero de queso fresco fue analizada con el equipo Milkotester, entregando los valores presentados en la tabla 6:

**Tabla 6**

*Valores obtenidos del equipo Milkotester de los diferentes parámetros*

| Parámetro    | Valor |
|--------------|-------|
| Grasas, %    | 0     |
| Proteínas, % | 3     |
| Lactosa, %   | 4.5   |

---

|                             |       |
|-----------------------------|-------|
| Densidad, g/cm <sup>3</sup> | 1.019 |
|-----------------------------|-------|

---

**Figura 8**

*Suero sin esterilizar.*



Viteri et al. (2014) reportaron valores entre 0.85-1.25% para contenido de proteínas, 5.2% para lactosa, 0.25-0.6% para materia grasa, 6.45-6.6 para el pH, 1.025-1.027 g/cm<sup>3</sup> para la densidad y 6-7.3% para sólidos totales del suero dulce obtenido de la producción de queso casero. Además, Montesdeoca y Piloso (2020) obtuvieron valores de 6.66 de pH, 0.7% de materia grasa, 0.94% de proteína y 3.71% de contenido de lactosa en suero obtenido de queso fresco pasteurizado. Estos valores difieren considerablemente con los presentados en la tabla 6 correspondientes al suero estudiado, sobre todo en los porcentajes de proteínas y grasas, lo que se presume que es debido a un proceso deficiente en la obtención del queso.

Según la norma ecuatoriana INEN 2594 que corresponde a los requisitos del suero de leche líquido, se establecen valores de los parámetros fisicoquímicos para el suero dulce, de 5% de contenido de lactosa, 0.8% de proteína láctea, 0.3% de materia grasa láctea, 6.4-6.8 de pH (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2011). El pH medido del suero estudiado fue de 6.4 catalogando al suero como dulce y encontrándose dentro de los rangos establecidos.

El porcentaje de grasa del suero estudiado refleja un valor inferior al referido en la normativa nacional (0.3 %) lo cual puede explicarse por el largo tiempo de reposo del suero, en donde las grasas forman una nata en la superficie que luego se retira, provocando que el lactosuero contenga poca grasa.

La cantidad de proteína láctea se encuentra por encima al valor normado (0.8 %), este fenómeno lo explica Crespo (2016) mencionando que, al realizarse un corte anticipado de la cuajada, que, al estar blanda, el coágulo prematuro se rompe provocando la liberación de proteína y otros componentes en el suero.

La cantidad de lactosa presente en el suero de estudio fue de 4.5%, valor cercano al rango (5 %) citado en Anaya y Salinas (2020), el cual resultó un medio de cultivo excelente para el crecimiento del *Streptococcus thermophilus*, siendo ésta la principal fuente de energía de la bacteria.

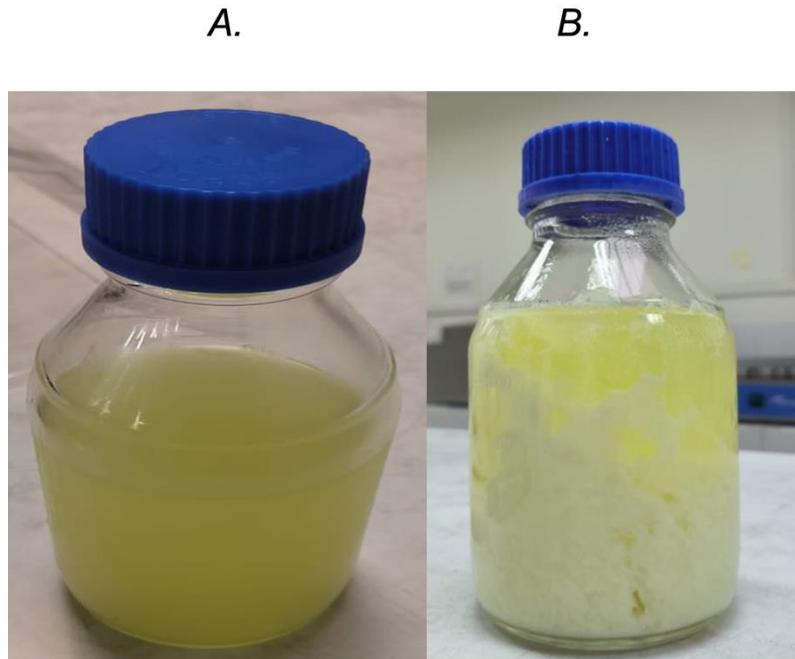
### 1.2.1 Pre tratamiento del suero.

Parte del pre tratamiento del suero consistió en la esterilización del líquido a 121°C durante 45 minutos para la eliminación de microorganismos y desnaturalización de las proteínas existentes en el mismo.

Este paso fue de suma importancia, puesto que se eliminaron compuestos que pueden interferir en el proceso de fermentación como lo son las proteínas y además de facilitar el acceso de nutrientes específicos, principalmente la lactosa, que requiere la bacteria estudiada para la producción del biosurfactante. Además, en el suero estudiado antes de ser llevado a esterilización, se identificaron otros microorganismos como *Bacillus*, mediante observación en el microscopio. Para Naranjo (2006) y Menchón et al. (2016) en el lactosuero existe entre un 50% y 55% de nutrientes provenientes de la leche y además, Ruiz et al. (2018) indican en su estudio que el lactosuero contiene una cantidad importante de microorganismos que se deben eliminar y además al encontrarse sin procesar es un medio favorable para el crecimiento bacteriano cuando tiene un pH cercano a 7, por lo que se requirió de un proceso de esterilización a altas temperaturas para garantizar la eliminación de microorganismos que puedan interferir en la fermentación, ver figura 9.

**Figura 9**

A. Precipitación de la proteína del suero después de esterilizar. B. Suero de queso después del pre tratamiento.



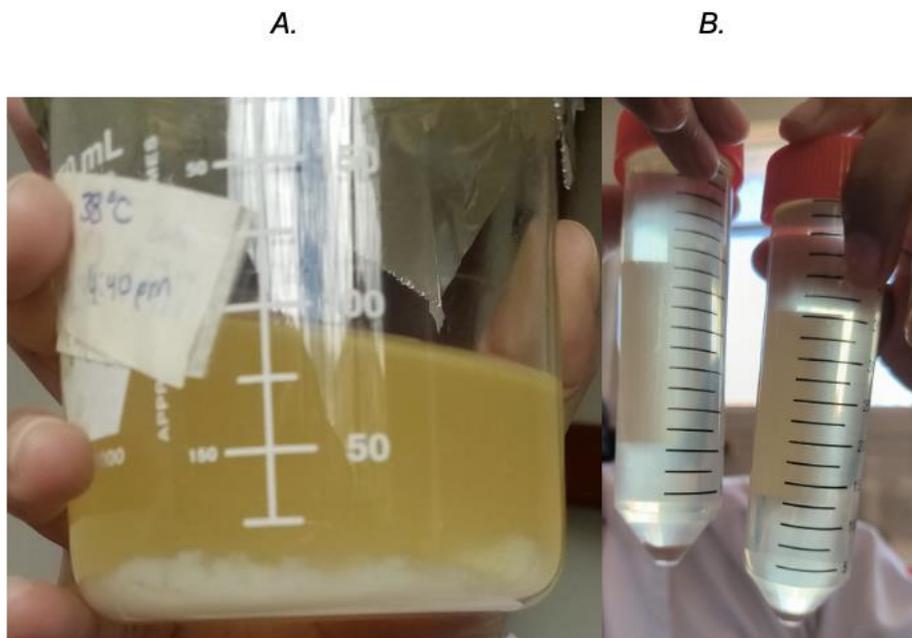
Cabe destacar la importancia de la separación ya que, de mantenerse la proteína en suspensión en el lactosuero, se requeriría aumentar los ciclos de centrifugación alargando el proceso. Además, resultaría en una potencial interferencia en el proceso de separación del biosurfactante, precipitando con la disminución del pH.

### 1.3. Producción del biosurfactante

Las bacterias se inocularon en el suero y transcurrido el periodo de 72 horas, tiempo que corresponde a la finalización de la fermentación, se observó un sedimento correspondiente a la biomasa producida por *Streptococcus thermophilus*, como se muestra en la figura 10 A.

Figura 10

*A. Suero después de la fermentación. B. Suero centrifugado*



La biomasa sedimentada al no ser de interés para la investigación se descartó mediante 1 ciclo de centrifugado a 4000 rpm durante 30 minutos que garantizaron la eliminación del componente biológico dejando un líquido de mayor transparencia como se muestra en la figura 10 B. La centrifugación permitió que este material biológico no interfiera en los resultados de las pruebas para detectar la presencia del biosurfactante. Posterior a eso, se reservó una cantidad considerable del suero centrifugado para la realización de las pruebas de caracterización.

#### 1.4. Separación del biosurfactante

Para la obtención del biosurfactante, el suero centrifugado se ajustó a un pH de 2 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5N y se añadió igual volumen de etanol 96%. Se mezcló ligeramente para mejorar la interacción del suero acidificado y el alcohol. Posterior a ello, se observó el cambio de color de un verde translúcido a uno lechoso. Con la finalidad de mejorar la sedimentación del biosurfactante, la mezcla se refrigeró durante 8 horas.

Transcurrido el tiempo de reposo en refrigeración, se descartó un 50% del líquido superficial, el restante que contenía el biosurfactante se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos, quedando

el precipitado blanco. El precipitado recuperado se lavó dos veces con agua destilada, esto con la finalidad de limpiar el biotensoactivo de azúcares residuales. Para obtener un polvo blanco se colocó en una estufa a 45 °C durante 12 horas para la evaporación del agua residual como se muestra en la figura 11 B.

### Figura 11

*A. Separación del biosurfactante con etanol. B. Secado del biosurfactante.*



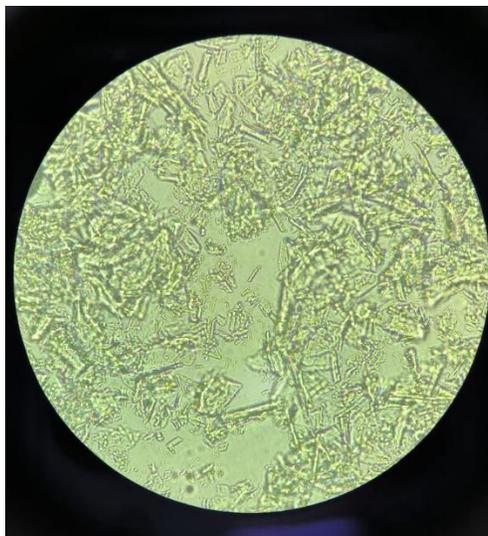
Vasileva-Tonkova y Gesheva (2007) los cuales comprobaron la presencia del biosurfactante con pruebas cuantitativas como tensión superficial e índice de emulsión, obtuvieron concentraciones de biosurfactante entre 0.8 a 1.2 g/l.

Se obtuvo 1 g/L de biosurfactante, el hecho de obtener cantidades menores de las que se reportaron en otros estudios puede deberse al tipo de cepa empleada, así como también la fuente de carbono y el tiempo de fermentación.

El polvo resultante de color blanco fue observado al microscopio dando estructuras cristalinas como se muestra en la figura 12, esto se puede comprobar en el estudio de Dubey y Juwarkar (2001) donde el biosurfactante obtenido tenía formas de cristales finos rectangulares cuando fue observado al microscopio con lentes de 10X.

**Figura 12**

*Biosurfactante observado al microscopio*

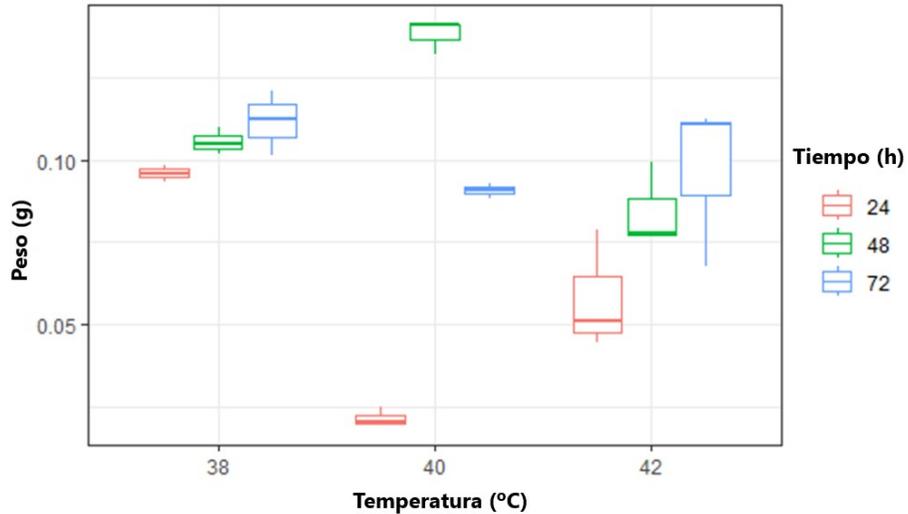


### 1.5. Optimización

Se realizaron ensayos a diferentes temperaturas y tiempos. Los pesos obtenidos se muestran en la tabla 12 de anexos. Transcurrido el periodo de fermentación se obtuvo el residuo blanquecino seco para cada temperatura y tiempo ensayados.

**Figura 13**

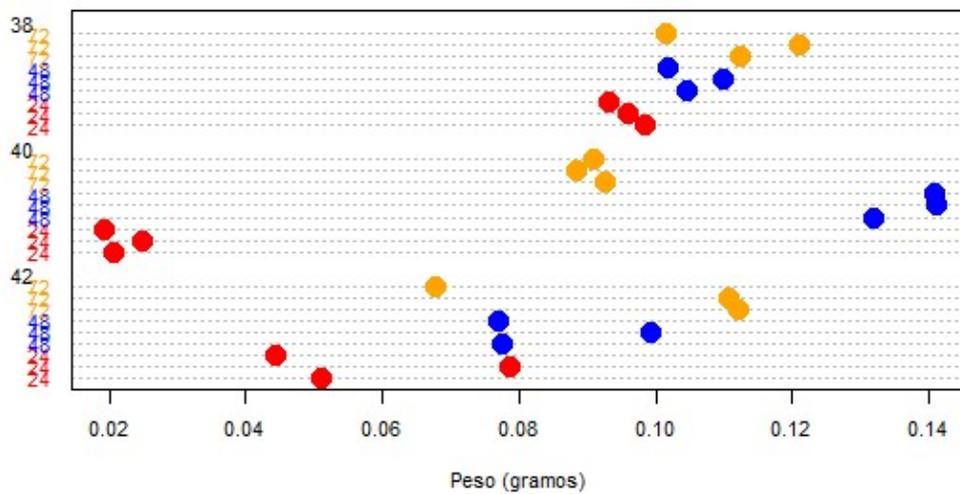
*Gráfico de cajas de la interacción temperatura: tiempo vs. Peso.*



En la figura 13 se puede ver los gráficos de cajas de los pesos (en gramos) del biosurfactante obtenido en las diferentes muestras donde se varió la temperatura y el tiempo de prueba.

**Figura 14**

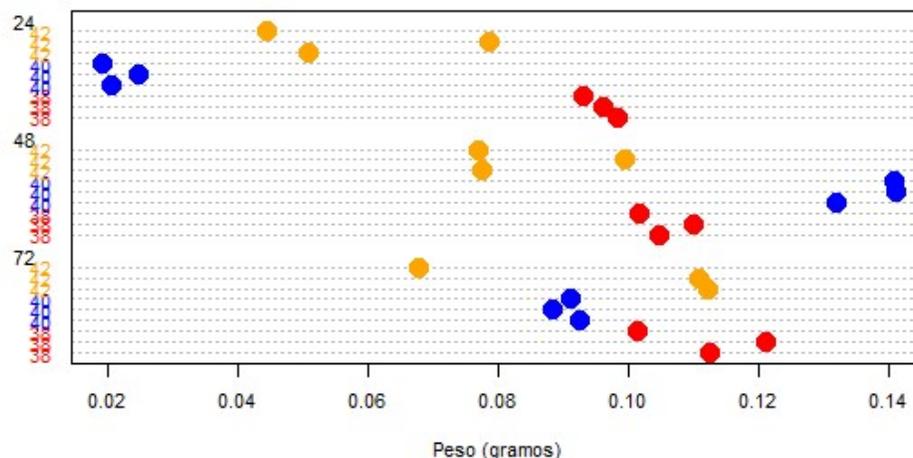
*Gráfico de puntos temperatura/tiempo con respecto al peso.*



En la figura 14 se puede observar la gráfica de dispersión de puntos de la interacción del tiempo y temperatura con respecto al peso. Cada color representa a un tiempo ensayado (rojo para 24 h, azul para 48 h y amarillo para 72 h) y los pesos que se obtuvieron en cada uno.

**Figura 15**

*Gráfico de puntos tiempo/temperatura con respecto al peso.*



En la figura 15, al igual que la figura anterior, se puede observar la gráfica de dispersión de puntos, pero esta vez de la interacción de la temperatura y tiempo con respecto al peso. Cada color representa a una temperatura ensayada (rojo para 38 °C, azul para 40 °C y amarillo para 42 °C) y los pesos que se obtuvieron en cada uno.

En las figuras 13, 14 y 15 se pueden observar la variabilidad que hay en el peso de las muestras estudiadas con respecto a cada combinación del tiempo y temperatura, mostrando así que la combinación que da un mayor rendimiento es el escogido anteriormente. Además, se puede observar que mientras mayor es el tiempo, se pueden obtener mejores resultados, y que la temperatura también influye, esto en base a la literatura revisada, donde (Martínez Aguilar, 2014) indica que los factores importantes que influyen en la producción del biosurfactante son la fuente de carbono, temperatura, pH, entre otros. Santos (2017) indica que la influencia del tiempo es fundamental para la producción, debido a que las bacterias en algunas ocasiones requieren más tiempo para procesar los nutrientes presentes en la fuente de carbono para producir el metabolito

deseado, y que también depende de los microorganismos, puesto que cada tipo tiene su propio metabolismo.

Se realizaron 3 réplicas de cada tiempo y temperatura propuestos, obteniendo como resultado un mayor rendimiento en peso (0.14 g) para las condiciones de 40 °C durante 48h. Esto se confirma en el análisis estadístico ANOVA realizado en R Studio donde se pudo observar una evidente interacción entre la temperatura y el tiempo de fermentación para la obtención del biosurfactante, teniendo al peso como variable respuesta.

**Tabla 7**

*Análisis estadístico ANOVA*

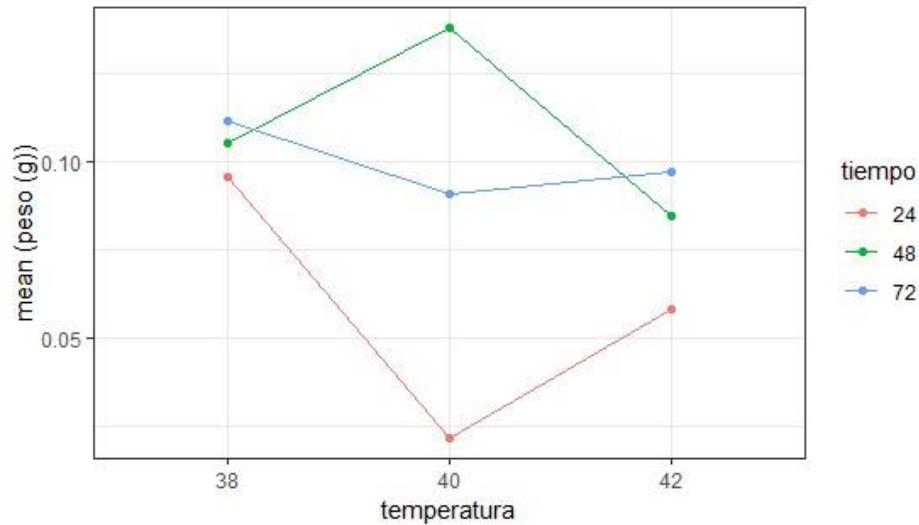
| <b>Factor</b>                   | <b>G. L</b> | <b>Sum. Cuadr.</b> | <b>Med. Cuadr.</b> | <b>Valor F</b> | <b>P (Prob&gt;F)</b> |
|---------------------------------|-------------|--------------------|--------------------|----------------|----------------------|
| <b>Temperatura</b>              | 2           | 0.0031             | 0.0015             | 11             | 0.00076 ***          |
| <b>Tiempo</b>                   | 2           | 0.013              | 0.0065             | 46             | 8.41e-08 ***         |
| <b>Temperatura<br/>: Tiempo</b> | 4           | 0.010              | 0.0025             | 17.75          | 4.63e-06 ***         |
| <b>Residuales</b>               | 18          | 0.0025             | 0.00014            |                |                      |

*Nota. G. L.: Grados de libertad, Sum. Cuadr.: Suma de cuadrados, Med. Cuadr.: Media de los cuadrados, Valor F: Media de los cuadrados del factor dividida por la media de los cuadrados del error, P: Evalúa la validez de la hipótesis nula de que todas las medias son iguales.*

Si  $P < 0.05$  existirá una variación entre los factores estudiados y por ende su interacción afectará directamente al resultado como se muestra en la tabla 7. Es decir, cada factor estudiado, el tiempo y la temperatura, como su interacción, influyen significativamente en la obtención del biosurfactante.

Figura 16

Gráfica de interacciones de los factores.



Como se muestra en la figura 16, la temperatura y el tiempo en el que se obtuvo un mayor peso promedio (0,14 g) fue de 40 °C y 48 horas respectivamente, por ello, se ha escogido a estos valores como los óptimos y que dan un mayor rendimiento en la producción del surfactante biológico. Esto también se evidencia en la comparación de las medias de las diferentes combinaciones de los factores. La cantidad total obtenida del biosurfactante optimizado fue de 5.6 g/L, que al comparar el valor con el biosurfactante sin optimizar (1 g/L), se puede decir que hubo un aumento en la cantidad producida.

Figura 17

Gráfico de los residuos del modelo ANOVA.

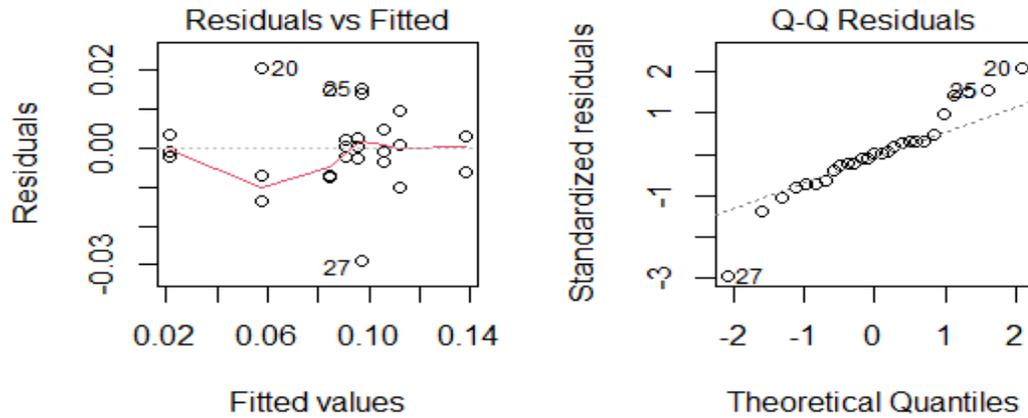
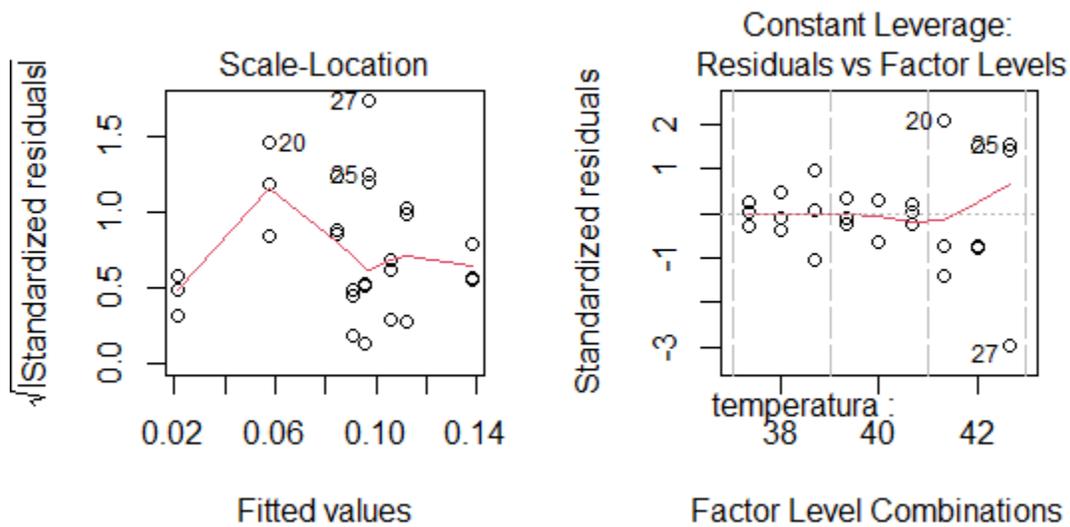


Figura 18

Gráfica de los residuos.



Los residuos muestran la misma varianza (homocedasticidad) para los diferentes niveles y se distribuyen normalmente. Como se observan en las figuras 17 y 18, el dato 27 tiene un residuo atípicamente grande por lo que se debe revisar ese valor con más detalle, así mismo, los datos 20 y 25 tienen residuos anormales, pero de menor manera.

## 2. Caracterización del biosurfactante

### 2.1. Detección de la presencia de biosurfactante

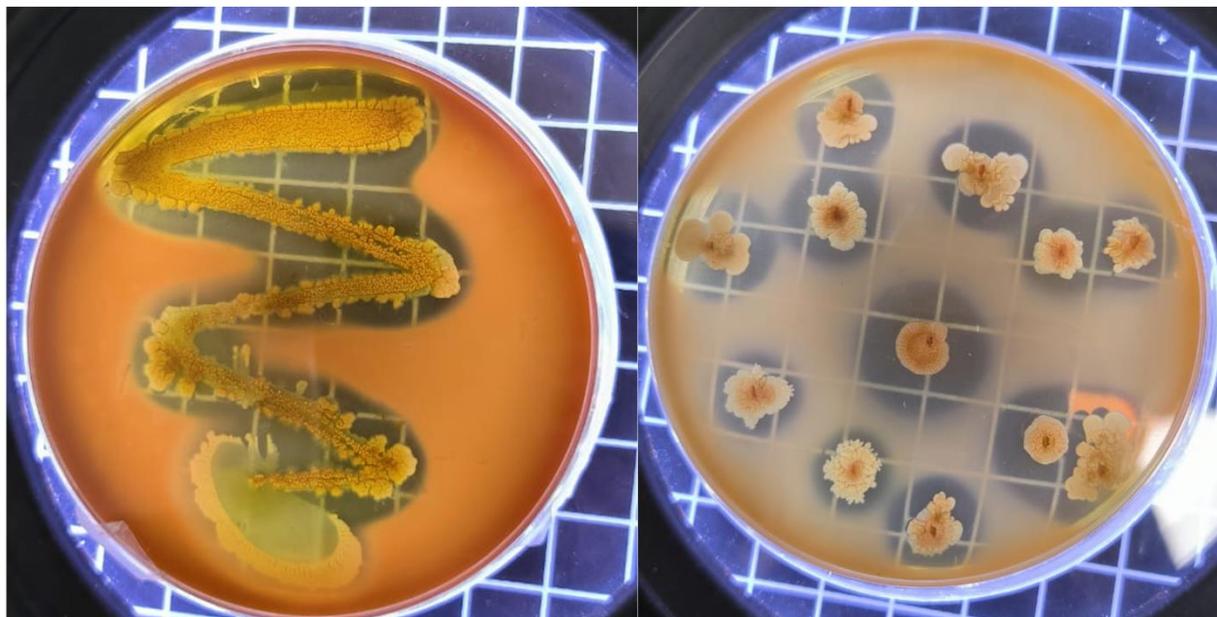
#### 2.1.1. Actividad Hemolítica

Posterior a las 48 horas de incubación a una temperatura de 37 °C se observaron zonas de crecimiento de aspecto blanquecino correspondientes al *Streptococcus thermophilus*. Se consideró positiva la prueba debido a la presencia de un halo transparente alrededor de las colonias generado por la lisis de los glóbulos rojos, indicando una disminución de la tensión superficial causado por la secreción de biosurfactantes. Según Santos (2017) el área clara representa que las cepas de bacterias estudiadas tienen un alto potencial de producción de biosurfactantes, y mientras mayor sea el diámetro del halo, mayor será la concentración del biosurfactante que se produzca, esto último se recalca en el estudio de Martínez y Osorio (2007), aunque en otros estudios reportan que el diámetro del halo es irrelevante y no representa que haya una relación con la cantidad que se produzca del biosurfactante. En el caso de las cepas estudiadas, se consideró que el halo observado tiene un comportamiento  $\beta$  hemolítico, puesto que la hemólisis fue total o completa por presentarse un halo transparente.

Barrionuevo (2017) consideró que es importante, además de realizar la prueba de actividad hemolítica, otras pruebas de caracterización, para verificar la ausencia de producción de hemolisinas sin propiedades tensoactivas, puesto que daría un falso positivo, como ocurre en Youssef et al. (2004), quienes presentaron resultados contradictorios en su estudio, ya que de las cepas que mostraron actividad hemolítica, tuvieron resultados negativos en las otras pruebas realizadas (colapso de gota y dispersión de aceite) y una baja reducción de la tensión superficial (mayor a 60 mN/m), debido a la presencia de otros compuestos diferentes a los biosurfactantes que provocaron la lisis de los glóbulos rojos.

**Figura 19**

*Prueba de actividad hemolítica.*



En la figura 19 se muestra los resultados de la prueba de hemólisis, donde se observa claramente los halos transparentes que se formaron debido al rompimiento de las membranas de los glóbulos rojos causados por la producción de biosurfactantes de la bacteria estudiada. La siembra se hizo por punción y por estría, en ambos casos se formó el halo de igual manera.

### **2.1.2. Dispersión de aceite**

La prueba de dispersión de aceite dio como resultado un diámetro del halo de 6.5 cm (++++), confirmando la presencia de biosurfactante en la muestra. Al comparar los resultados obtenidos con el estudio de Alkan et al. (2019) que tuvieron un diámetro de 5.9 cm, para el biosurfactante obtenido de bacterias ácido lácticas.

Se puede estimar que ambos valores no difirieron mucho, tomando en cuenta que, en su estudio, utilizaron petróleo crudo para la prueba. Además, se tomó como muestra de control positivo al Tween 80, siendo este un surfactante químico. Esta prueba, además de ayudar a confirmar la presencia del biotensoactivo, también demostró la capacidad que tiene para romper la tensión superficial.

**Figura 20**

*Prueba de dispersión de aceite.*



En la figura 20 se muestra la prueba de dispersión de aceite en donde se puede observar un halo producto del rompimiento de la gota de aceite de motor colocada sobre el agua al poner el biosurfactante encima de la misma.

Youssef et al. (2004) afirmaron que hay una relación lineal entre la concentración del biosurfactante con el diámetro obtenido en la dispersión de aceite, en donde a mayor diámetro, mayor será la concentración, y a su vez es inversamente proporcional con respecto a la tensión superficial, donde mayor diámetro, menor tensión superficial.

### **2.1.3. Prueba con Parafilm**

Transcurrido el tiempo estimado de 1 minuto se verificó la forma de la gota colocada sobre el Parafilm. La prueba se consideró como positiva al observarse un colapso de la gota colocada. Además, se colocó una gota de agua destilada en el Parafilm como un blanco y se observó que mantuvo su forma redonda como se muestra en la figura 21. Según Santos (2017) la prueba de Parafilm estudia los cambios de la tensión superficial por medio del comportamiento de una gota sobre una superficie hidrofóbica.

**Figura 21**

*Prueba de Parafilm.*

a) Sobrenadante

b) Agua destilada



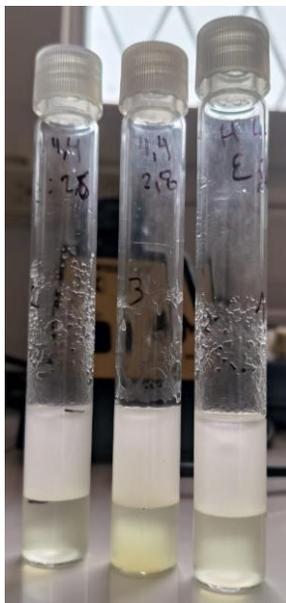
Al igual que en la prueba de dispersión de aceite, en esta prueba también existe una relación con la concentración del biosurfactante, en donde un colapso total e inmediato de la gota, existirá una mayor concentración del producto. También puede ser debido al tipo de fuente de carbono utilizado para producción, lo que explicó Santos (2017) que, si se usan grasas o aceites, por su naturaleza hidrofóbica, les es más difícil a las bacterias conseguir sus nutrientes, que cuando se usan azúcares como fuente de carbono, por lo tanto, la concentración del surfactante biológico va a variar.

#### **2.1.4. Determinación del Índice de Emulsificación (IE24)**

Cumplidas las 24 horas se midió la altura de la emulsión obteniéndose un valor de 2.8 cm de una altura total de 4.4 cm. Al aplicar la fórmula, se tuvo un valor de %E de 63.64%

**Figura 22**

*Determinación del índice de emulsificación.*



El índice de emulsificación a las 24 h fue de 63.64 %, y se observó que luego de un tiempo las emulsiones se mantuvieron estables puesto que no varió significativamente su altura como se muestra en la figura 22. Estos resultados son similares a Alkan et al. (2019) que obtuvieron un %E. de 50 % a las 24 horas y se mantuvo estable una semana después.

Santos (2017) consideró que la presencia de emulsión y un índice de emulsificación mayor al 40 % que se mantenga estable durante el tiempo es una prueba positiva, además, reportó que dependiendo de la fuente de carbono, se forma la emulsión, como es el caso de la glucosa y acetato de sodio como fuentes de carbono en la producción del biosurfactante los cuales generaron una alta respuesta positiva al realizar esta prueba, caso contrario a lo que sucede con otras fuentes como gasoil donde no se formó la emulsión.

Barrionuevo (2017) estudió diferentes microorganismos en distintas fuentes de carbono e indicó que ambas variables son relevantes al momento de realizar la prueba, puesto que para una cepa le es fácil adaptarse a un medio específico que, para otro, y de ello radica la producción del biosurfactante. Con respecto al índice de emulsificación, reportó que tuvo un porcentaje mayor en glucosa y aceite para la cepa de *Ralstonia taiwanensis*, mientras que para la cepa de *Pseudomona veronii* tuvieron un bajo índice en los mismos sustratos.

Es así que Alkan et al. (2019) al usar un sustrato sintético para la cepa de *Streptococcus thermophilus* obtuvo un menor %E que, al usar suero láctico, repitiendo lo mismo con otras cepas de bacterias ácido láctico donde el índice aumentó al utilizar el suero como fuente de carbono.

### 2.1.5. Prueba de Tensión Superficial

La prueba de tensión superficial fue realizada en el laboratorio del Departamento de Petróleos, Energía y Contaminación perteneciente a la Universidad Central del Ecuador en Quito.

El resultado de la prueba tuvo un valor de tensión superficial de 52.7 mN/m, comparando con otros estudios como Alkan et al. (2019), en donde obtuvieron un resultado similar de 48.85 mN/m, teniendo suero de queso como fuente de carbono y *Streptococcus thermophilus* como bacteria productora de biosurfactante, tomando como referencia el agua pura como valor control de 72 mN/m, se puede decir que existe una reducción considerable de la tensión superficial, confirmando así, la presencia de biosurfactante.

Martínez (2014) consideró como criterio de selección de cepas productoras de biosurfactantes, valores de tensión superficiales menores a 40 mN/m, así mismo, Santos (2017) mencionó lo mismo y además de que valores mayores a este, se considera un emulsificante. Mientras que Youssef et al. (2004) opinó que las cepas que muestran valores mayores a 60 mN/m de tensión superficial no son consideradas como productoras de surfactantes biológicos, puesto que afirmaron que existe una relación inversamente proporcional entre la concentración del biosurfactante y la tensión superficial, mientras haya una reducción alta de tensión superficial, mayor será su concentración.

Santos (2017) también mencionó que existe una relación importante entre la reducción de la tensión superficial con la fuente de carbono, teniendo varianzas significativas entre un medio y otro, independientemente de las cepas utilizadas, y afirmó que distintas fuentes de carbono ejercen diferentes efectos sobre la producción del biosurfactante.

## 2.2. Test de ecotoxicidad al biosurfactante

En los diferentes tratamientos en agua para la remoción del aceite con el biosurfactante, se utilizó una concentración de 30 mg/l que equivale al 10% de la solución, que al principio del estudio se realizó el test a esa concentración dando como resultado la muerte de 7 neonatos de las 20 colocadas, a las 48 horas.

Pero luego, al seguir con la norma para el test, se realizaron a diferentes concentraciones del biosurfactante para conocer si el mismo es tóxico y a que cantidad se mueren las *Daphnias*. Al realizar la prueba, se pudo observar que pasadas las 24 horas de haber colocado las *Daphnias* en las soluciones con el biotensoactivo, a menor concentración hay una baja mortalidad, y a partir de 10 mg/l, la mortalidad va aumentando como se muestra en la tabla 8 y figura 24, llegando a morir todas a las 48 horas.

**Tabla 8**

*Concentración del biosurfactante con respecto a la inmovilidad de Daphnia magna.*

| Concentración (mg/l) | Inmovilidad |
|----------------------|-------------|
| 0                    | 2           |
| 5                    | 2           |
| 10                   | 10          |
| 15                   | 11          |
| 20                   | 12          |
| 25                   | 13          |
| 30                   | 13          |

Figura 24

Gráfico de barras de la concentración del biosurfactante con respecto a la inmovilidad de *Daphnia magna*.

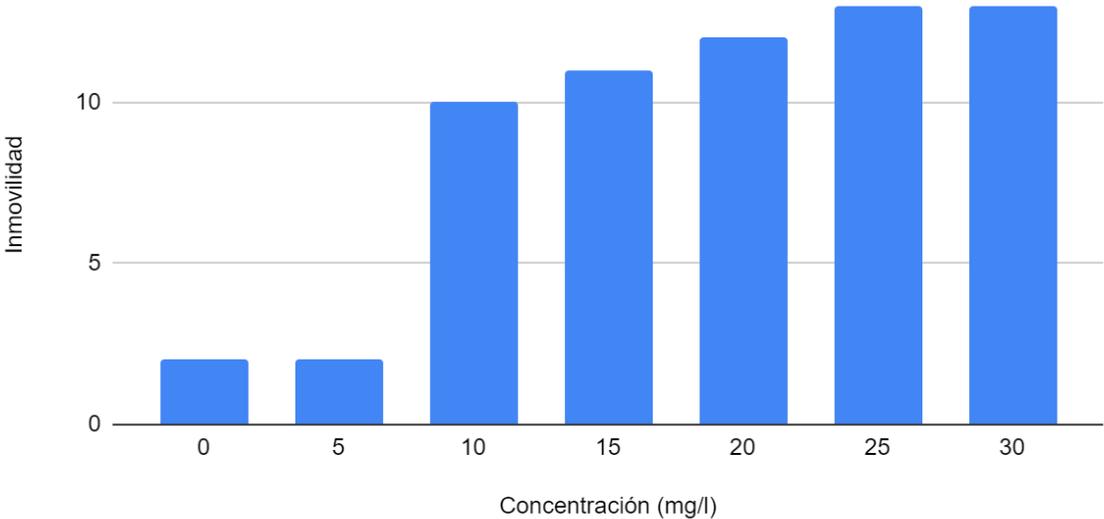


Figura 23

Concentración del biosurfactante con respecto a la tasa de mortalidad.

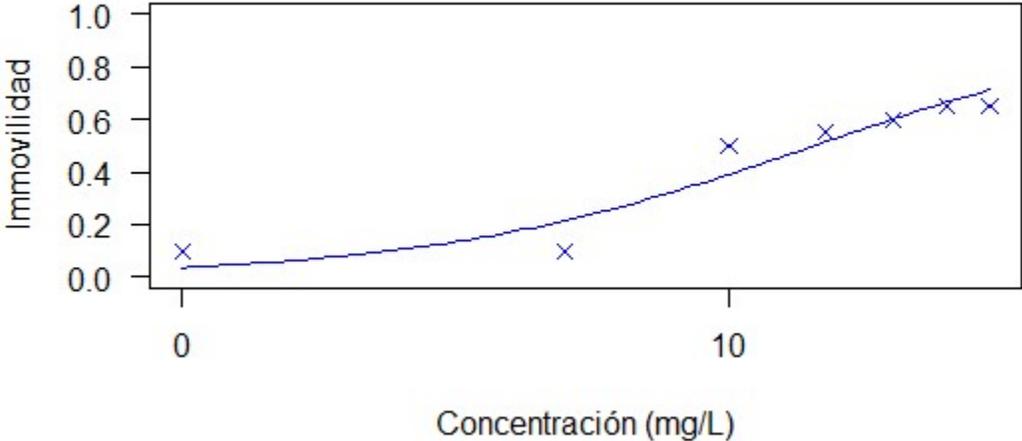


Tabla 9

*Análisis estadístico de las Daphnia Magna*

|                  | Estimación Std | Error | Valor t | Valor p      |
|------------------|----------------|-------|---------|--------------|
| <b>Pendiente</b> | -1.232         | 0.335 | -3.668  | 0.0003 **    |
| <b>EC50</b>      | 14.366         | 2.180 | 6.588   | 8.653e-10*** |

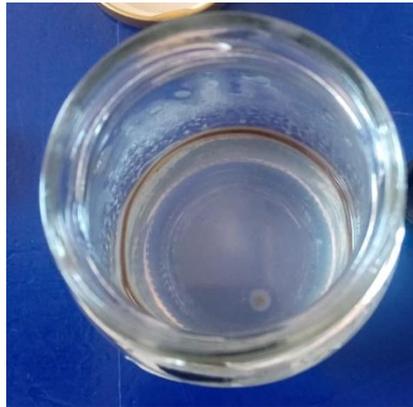
El valor de EC50 (concentración efectiva media) se puede observar en la figura 23 y tabla 9 donde se muestra que a una concentración de 14.366 mg/L se muere el 50% de los neonatos, obtenido del análisis estadístico donde el valor es significativo, teniendo una confiabilidad del 97%, y se puede decir que el biosurfactante tiene una toxicidad baja.

Jurado et al. (2011) mencionaron que tuvieron un EC50 de entre 3 y 120 mg/l en la evaluación de toxicidad de tensoactivos químicos aniónicos, que por lo general son utilizados en detergentes, ensayados a las 24 horas con *Daphnia magna*, demostrando tener una toxicidad baja a intermedia. A pesar de que estos valores no representan la toxicidad de un surfactante biológico, se puede tomar como referencia y permitir la comparación de ambos tipos, puesto que son comercializados y ampliamente usados en la vida cotidiana.

### 3. Aplicación en Biorremediación del agua

#### 3.1. Biorremediación

Los tratamientos fueron expuestos a diferentes condiciones como colocarlos en una incubadora con agitación constante a 40 °C y utilizar un consorcio de bacterias-hongo, en el que se propuso usar el hongo *Aspergillus niger*. Los diferentes tratamientos mostraron una reducción considerable del aceite en el agua durante el tiempo de incubación, a excepción del tratamiento que contenía únicamente agua con aceite de motor usado, el cual tuvo una reducción del 5% debido a pérdidas en el envase al realizar otras pruebas. Araujo et al. (2008) reportaron que la muestra patrón tuvo una reducción del 7% debido a que el agua que usaron no era estéril.

**Figura 25** *Tratamiento AAIB***Figura 26** *Tratamiento AAI*

### 3.2. Determinación de hidrocarburos totales de petróleo

Los diferentes tratamientos tuvieron una concentración inicial de hidrocarburos totales de petróleo de 8780 mg/L. Transcurridos los 45 días propuestos en el estudio, se tuvieron concentraciones finales entre 5348 y 3012 mg/L. El tratamiento que tuvo un mayor porcentaje de remoción es el de agua, aceite, consorcio de microorganismos y biosurfactante (AAIB), logrando obtener un 57.68% de remoción del aceite, mientras que el tratamiento que tuvo un menor porcentaje de biorremediación es la muestra control de agua y aceite, teniendo un 5% de reducción. Estos resultados se compararon con el estudio de Araujo et al. (2008) donde reportaron una remoción del 50% en los primeros 30 días y un 81% a los 90 días, además que el tratamiento con biosurfactante y cultivo mixto tuvo la mayor remoción.

Las tablas 10 y 11 muestran los resultados de los pesos de los diferentes tratamientos desde el día 0 hasta los 45 días:

Tabla 10

Resultados de los tratamientos de biorremediación usando bacterias.

| Días | AAI<br>(Peso)(g) | Absorbancia | HTP<br>(mg/L) | %Remoción | AAIB<br>(Peso)(g) | Absorbancia | HTP<br>(mg/L) | %Remoción |
|------|------------------|-------------|---------------|-----------|-------------------|-------------|---------------|-----------|
| 0    | 0.878            | 2.665       | 8780          | 0         | 0.878             | 2.665       | 8780          | 0         |
| 15   | 0.6265           | 0.96        | 6265          | 25.15     | 0.6453            | 1.393       | 6453          | 23.27     |
| 30   | 0.6009           | 1.653       | 6009          | 27.71     | 0.524             | 4.418       | 5240          | 35.4      |
| 45   | 0.5348           | 5           | 5348          | 34.32     | 0.4182            | 5           | 4182          | 45.98     |

Nota. **AAI:** Agua, aceite y bacterias *S. thermophilus*. **AAIB:** Agua, aceite, bacterias ST y biosurfactante

Tabla 11

Resultados de los tratamientos de biorremediación usando consorcio bacteria-hongo

| Días | AAI<br>(Peso)(g) | Absorbancia | HTP<br>(mg/L) | %Remoción | AAIB<br>(Peso)(g) | Absorbancia | HTP<br>(mg/L) | %Remoción |
|------|------------------|-------------|---------------|-----------|-------------------|-------------|---------------|-----------|
| 0    | 0.878            | 2.665       | 8780          | 0         | 0.878             | 2.665       | 8780          | 0         |
| 15   | 0.6107           | 2.327       | 6107          | 26.73     | 0.5502            | 1.661       | 5502          | 32.78     |
| 30   | 0.583            | 1.801       | 5830          | 29.5      | 0.4251            | 1.87        | 4251          | 45.29     |
| 45   | 0.5075           | 5           | 5075          | 37.5      | 0.3012            | 2.132       | 3012          | 57.68     |

Nota. **AAI:** Agua, aceite y bacterias-hongos. **AAIB:** Agua, aceite, bacterias-hongos y biosurfactante

Los resultados de los diferentes tratamientos demuestran que el uso de biosurfactante en la biorremediación aumenta significativamente la degradación de los hidrocarburos totales de petróleo presentes en el aceite con respecto al tratamiento que solo tenía el inóculo (bacteria y hongo). Con respecto a los datos obtenidos de la absorbancia, se descartaron para el estudio, puesto que los valores eran inconsistentes debido a posibles interferencias en las muestras correspondientes a metabolitos secundarios producidos por los microorganismos.

## Conclusiones

El lactosuero es el principal subproducto de la industria láctea y por su alto nivel de nutrientes posee una carga contaminante elevada y que lejos de su aprovechamiento este se desecha en fuentes hídricas o sistemas de alcantarillado sin un previo tratamiento. Dicho esto, al usar el suero como fuente de carbono, se logró obtener un surfactante biológico mediante la fermentación del lactosuero por acción de las bacterias *Streptococcus thermophilus*. Su extracción se obtuvo por medio del método de precipitación ácida, el cual fue modificado, puesto que desde un principio los solventes usados eran metanol y cloroformo, conocidos su riesgo y su costo, se decidió reemplazar por etanol al 96%, obteniendo resultados semejantes.

Se demostró que el tiempo, la temperatura y su interacción juegan un papel fundamental en la producción del biosurfactante, en donde se pudo evidenciar que a una temperatura de 40°C y a 48 horas de fermentación se logra las condiciones ideales donde el *Streptococcus thermophilus* produce mayor cantidad de surfactante biológico mejorando el rendimiento del proceso.

El biosurfactante pudo ser identificado gracias a las diferentes pruebas cualitativas y cuantitativas realizadas, confirmando así la presencia del producto. Además, con las pruebas de ecotoxicidad y los resultados obtenidos, se llegó a la conclusión que el surfactante biológico no representa un peligro para la fauna acuática en caso de ser usado en cuerpos de agua marina.

Se evaluó la eficiencia del biosurfactantes en los diferentes tratamientos realizados para el proceso de biorremediación, teniendo un resultado favorable al utilizar el producto obtenido junto con los microorganismos que degradan el aceite en el agua contaminada. Se recomienda aumentar el tiempo de biorremediación para mejorar la biodegradación de los compuestos contaminantes, dado que el aceite es una muestra compleja.

### Referencias

- Achigar, R. (2014). *Mejoramiento para resistencia a bacteriófagos de cepas de Streptococcus thermophilus de uso en la industria láctea* [Tesis de maestría]. Universidad de la República.
- Adetunji, A. I., & Olaniran, A. O. (2021). Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview. *Saudi Journal of Biological Sciences* 28(1), 669-679. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.058>
- Alkan, Z., ErgiNkaya, Z., Konuray, G., & Ünal Turhan, E. (2019). Production of biosurfactant by lactic acid bacteria using whey as growth medium. *TURKISH JOURNAL OF VETERINARY AND ANIMAL SCIENCES*, 43(5), 676-683. <https://doi.org/10.3906/vet-1903-48>
- Alpaca Acosta, B. E. (2016). *Evaluación de la producción de biosurfactantes a partir de aceite residual de cocina por una cepa nativa aislada de un suelo contaminado con hidrocarburos* [Universidad Católica de Santa María]. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12920/5056/42.0139.IB.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Anaya, G. P., & Salinas, C. E. (2020). *Aprovechamiento del suero de queso fresco en la elaboración de queso crema untable enriquecido con sólidos proteicos*. [Posgrado, Universidad Nacional del Callao]. <http://repositorio.unac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12952/5639/TESIS%20MAESTRO-SALINAS%20ALATRISTA-FIQ-2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Araujo, I., Gómez, A., Barrera, M., Angulo, N., Morillo, G., Cárdenas, C., & Herrera, L. (2008). Surfactantes biológicos en la biorremediación de aguas contaminadas con crudo liviano. *Interciencia*, 33(4), 245-250.
- Barrionuevo, M. R. (2017). *Producción de biosurfactantes bacterianos para su uso en procesos de biotratamiento de efluentes industriales con contenido en metales* [Tesis doctoral].

Universidad de Buenos Aires.

Barrios-Ziolo, L. F., Robayo-Gómez, J., Prieto-Cadavid, S., & Cardona-Gallo, S. A. (2015).

Biorremediación de Suelos Contaminados con Aceites Usados de Motor. *Revista CINTEX*, 20(1), 1.

Becerra Gutiérrez, L. K., & Horna Acevedo, M. V. (2016). Aislamiento de microorganismos

productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 23-31.

<https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.01.03>

Bohórquez Rodríguez, A. M. (2021). *Evaluación de la implementación de biosurfactantes en los*

*procesos de recuperación mejorada de petróleo (EOR) mediante simulación numérica*

[Tesis de grado, Fundación Universidad de América].

[http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/8641/1/6161740-2021-2-](http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/8641/1/6161740-2021-2-IQ.pdf)

[IQ.pdf](http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/8641/1/6161740-2021-2-IQ.pdf)

Brito, H., Santillán, A., Arteaga, M., Ramos, E., Villalón, P., & Rincon, A. (2015). Aprovechamiento

del suero de leche como bebida energizante para minimizar el impacto ambiental.

*European Scientific Journal*, 11(26), 257-268.

Carrera, M. C., Romero, A. I., Villegas, M., Parentis, M. L., & Gonzo, E. E. (2013). *Obtención de*

*la tensión superficial mediante el método de Du Nouy y el método de la gota pendiente.*

VII CAIQ, Argentina.

[https://www.aaq.org.ar/SCongresos/docs/04\\_025/papers/08a/08a\\_1469\\_611.pdf](https://www.aaq.org.ar/SCongresos/docs/04_025/papers/08a/08a_1469_611.pdf)

Carrero Puentes, S. V. (2019). *Evaluación del uso de suero lácteo con exopolisacáridos de*

*Lactobacillus delbrueckii en la producción de un queso tipo requesón adicionado con un*

*cultivo probiótico* [Universidad Nacional de Colombia].

<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/77128>

CHR HANSEN. (2014). *Streptococcus thermophilus (TH-4®)*. [https://www.chr-](https://www.chr-hansen.com/es/human-health-and-probiotics/our-probiotic-strains/th-4)

[hansen.com/es/human-health-and-probiotics/our-probiotic-strains/th-4](https://www.chr-hansen.com/es/human-health-and-probiotics/our-probiotic-strains/th-4)

- Contreras, H., & Carreño, C. (2018). Eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo por hongos filamentosos aislados de suelo contaminado. *Revista Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 1(1), 27-33.
- Cortés Sánchez, A. de J., Troconis Torres, I. G., & Jaramillo Flores, M. E. (2013). Surfactantes biológicos con aplicación potencial en tecnología de alimentos: Una revisión. *Biológicas*, 15(1), 16-23.
- Crespo, S. I. (2016). *Efecto de la temperatura de cuajado de la leche sobre el rendimiento quesero, la composición química y la valoración sensorial de quesos frescos de cabra* [Masterado, Universitat Politècnica de Valencia]. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/77788/CRESPO%20-%20Efecto%20de%20la%20temperatura%20de%20cuajado%20de%20la%20leche%20sobre%20el%20rendimiento%20quesero%2C%20la%20composi....pdf?sequence=1>
- Cruz Mendoza, I. L. (2022). *Biosurfactante de Bacillus subtilis DS03: Propiedades y aplicación en sistemas de limpieza "out of place" en una planta de procesamiento de salchichas* [Tesis de postgrado, Escuela Superior Politécnica del Litoral]. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/56654/1/T-112925%20Iana%20Lucia%20Cruz%20Mendoza.pdf>
- Dai, X., Lv, J., Zhang, Z., & Wang, H. (2023). Bioremediation of heavy oil-contaminated intertidal zones using slow-release nutrients and rhamnolipid biosurfactants. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(2), 109323. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.109323>
- De la Rosa, N., Sánchez-Salinas, E., & Ortiz-Hernández, L. (2014). Biosurfactantes y su papel en la biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 4(1), 47-67.
- Di Martino, C. (2015). *Estudio de bacterias del género Pseudomonas en la degradación de hidrocarburos y síntesis de biosurfactantes: Análisis del efecto de los*

- polihidroxicanoatos* [Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires].  
[https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n5752\\_DiMartino.pdf](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5752_DiMartino.pdf)
- Domínguez-Gaibor, I., Gallardo, K., & Cuenca, J. (2021). *Gestores ambientales en Ecuador: Enfoque a la biorremediación*. 4(2). <https://doi.org/10.53313/gwj42021>
- Dubey, K., & Juwarkar, A. (2001). Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17, 61-69.
- Fong Silva, W., Quiñonez Bolaños, E., & Tejeda Tovar, C. (2017). Caracterización físico-química de aceites usados de motores para su reciclaje. *Prospectiva*, 15(2), 135-144.
- Frolich, V. (2021). *Evaluación del potencial uso de biosurfactantes producidos por la Pseudomona aeruginosa en la biorremediación de suelos destinados a la agricultura* [Trabajo de grado]. Universidad de los Andes.
- García González, J. G., Peñafiel Heredia, D. P., & Rodríguez, R. (2019). Bioremediación de hidrocarburos en aguas residuales con cultivo mixto de microorganismos: Caso Lubricadora Puyango. *Enfoque UTE*, 10(1), 185-196.
- García, J. (2010). *Técnicas moleculares aplicadas a la caracterización y estudio de la supervivencia de bacterias lácticas del yogurt* [Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia].  
<https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/14010/tesisUPV3431.pdf?sequence=6&isAllowed=y>
- Gonzales Valdez, L. S. (2011). *Obtención de un surfactante a partir de biomasa residual de Agave durangensis y su aplicación en la remoción de arsénico por la técnica de aglomeración esférica*. [Tesis doctoral, Instituto Politécnico Nacional].  
[https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/19612/GONZALEZ\\_VALDEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/19612/GONZALEZ_VALDEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Harnett, J., Davey, G., Patrick, A., Caddick, C., & Pearce, L. (2011). Lactic Acid Bacteria | *Streptococcus thermophilus*. En J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*

- (*Second Edition*) (Second Edition, pp. 143-148). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00268-5>
- Hermosa Díaz, P. E. (2021). *Últimos avances en el tratamiento de suero lácteo con tecnología de membranas (Realidad en el Ecuador)* [Universidad Central del Ecuador].  
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/22562>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2011). *NTE INEN 2594:2011. Suero de leche líquido. Requisitos*.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2013). *NTE INEN 834:2013. Agentes surfactantes. Determinación de las tensiones interfacial y superficial*. Instituto Ecuatoriano de Normalización. [https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_834-1.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_834-1.pdf)
- Irigoin Gonzales, J. L. (2021). *Aplicación de biosurfactantes producido por Bacillus en la remediación de suelos contaminados con metales pesados: Revisión sistemática* [Tesis de grado, Universidad César Vallejo].  
[https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/77530/Irigoin\\_GJL-SD.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/77530/Irigoin_GJL-SD.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Jiménez Islas, D., Medina Moreno, S. A., & Gracida Rodríguez, J. N. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos: Una revisión. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 26(1), 65-84.
- Jiménez Vélez, V. C. (2020). *Evaluación de bacterias y hongos potencialmente utilizables para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos* [Tesis de grado, Universidad Agraria del Ecuador].  
<https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/JIMENEZ%20VELEZ%20VILMA%20CECIBEL.pdf>
- Jurado, E., Fernández, M., Núñez, J., Lechuga, M., & Ríos, F. (2011). Ecotoxicity of anionic surfactants AKYPO. *WIT Transactions on Ecology and the Environment. Ecosystems and Sustainable Development VIII*, 144, 497-505. <https://doi.org/10.2495/ECO110431>
- Kotoupas, A., Rigas, F., & Chalaris, M. (2007). Computer-aided process design, economic

- evaluation and environmental impact assessment for treatment of cheese whey wastewater. *Desalination*, 213(1-3), 238-252. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.03.611>
- Lai, C.-C., Huang, Y.-C., Wei, Y.-H., & Chang, J.-S. (2009). Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 167(1), 609-614. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.017>
- Lara-Severino, R. del C., Gómez Olivan, L. M., Sandoval Trujillo, Á. H., Isaac-Olive, K., Ramírez-Durán, N., Lara-Severino, R. del C., Gómez Olivan, L. M., Sandoval Trujillo, Á. H., Isaac-Olive, K., & Ramírez-Durán, N. (2017). Búsqueda de capacidad productora de biosurfactantes en actinobacterias haloalcalófilas y haloalcalotolerantes. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 33(3), 529-539. <https://doi.org/10.20937/rica.2017.33.03.15>
- Marín Velásquez, T. D., Heredia Jiménez, V. I., & Alcarraz Curi, M. (2019). Filtro de cascarilla de *Ricinus communis* y carbón vegetal para tratamiento de agua contaminada con hidrocarburos: Diseño de un sistema en serie por etapas. *Ingeniería del Agua*, 23(3), 187-198. <https://doi.org/10.4995/ia.2019.11426>
- Markakiou, S., Gaspar, P., Johansen, E., Zeidan, A. A., & Neves, A. R. (2020). Harnessing the metabolic potential of *Streptococcus thermophilus* for new biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 142-152. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.019>
- Maroto, M. E., & Rogel, J. M. (2004). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. *Geocisa. División de Protección Ambiental*, 4(5), 297-305.
- Martínez Aguilar, M. (2014). *Obtención de un biosurfactante para el recobro mejorado de petróleo* [Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/53556/1014217302.2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Martínez, E. P., & Osorio, J. A. (2007). Estudios preliminares para la producción de un biosurfactante bacteriano activo contra *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. *Carpoica. Ciencia y tecnología Agropecuaria*, 8(2), 5-16.
- Martínez Molina, C. E., & Paredes Moreno, H. P. (2019). *Aislamiento e identificación de microorganismos fermentadores de dos tipos de bebidas ancestrales fermentadas a partir de yuca (Manihot esculenta)* [Tesis de grado, Universidad Técnica de Cotopaxi]. <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/6147/6/PC-000744.pdf>
- Medina, J., García, F., & Paricagúan, B. (2014). Biodegradación de petróleo por microorganismos autóctonos en suelos contaminados provenientes de la bahía de Amuay del Estado Falcon. *Revista Ingeniería UC*, 21(1), 62-69.
- Mejía Gonzáles, C. J. (2022). *Efecto de las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas provenientes de yogurt probiótico sobre el crecimiento de Salmonella spp y Staphylococcus aureus* [Tesis de grado, Universidad Nacional de Cajamarca]. <http://190.116.36.86/bitstream/handle/20.500.14074/5362/Tesis%20Carlos%20Jhosef%20Mej%c3%ada%20Gonz%c3%a1les.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Menchón, C., Cadona, J., & Bruschi, J. (2016). *Caracterización físico-química y microbiológica de suero de queso en polvo desmineralizado y evaluación del impacto de microorganismos esporulados*. [Grado, UNCPBA Facultad de Ciencias Veterinarias]. <https://ridaa.unicen.edu.ar:8443/server/api/core/bitstreams/b805021a-5036-4d0a-8b15-e1d7f5044037/content>
- Mesa M, L., Falcón, J., Ruiz, Y., Arias, R., & Pérez, J. (2019). Monitoreo de la contaminación de agua por hidrocarburos en el espejo de la bahía de Santiago de Cuba. *Revista Boliviana de Química*, 36(4), 157-172.
- Ministerio del Ambiente. (2015). *Anexo 1 del Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente: Norma de Calidad Ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua*. <https://www.ambiente.gob.ec/wp->

content/uploads/downloads/2018/05/Acuerdo-097.pdf

Mondragón Mora, L. (2011). *Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas aerobias autóctonas de yacimientos petroleros productoras de biosurfactantes para su aplicación en técnicas de MEOR*. [Maestría, Instituto Politécnico Nacional].  
<https://repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/8140/1/TESIS%20LMM.pdf>

Montesdeoca, R. R., & Piloso, K. (2020). Evaluación físicoquímica del lactosuero obtenido del queso fresco pasteurizado producido en el taller de procesos lácteos en la ESPAM «MFL». *Revista Científica de Ciencia y Tecnología El Higo*, 10(1).  
<https://doi.org/10.5377/elhigo.v10i1.9921>

Mosquera Romero, S. S., & Serrano Mena, J. D. (2014). *Biorremediación de lodos de una planta regeneradora de Aceites Lubricantes Usados, recuperando el suelo para uso industrial*. [Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral].  
<https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/54972/1/D-99352.pdf>

Naranjo, C. A. (2006). *Elaboración de una bebida fermentada a base de suerolácteo con pulpa de manzana Emilia (malus comunis-L)* [Grado, Universidad Técnica de Ambato].  
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3342/1/P81%20Ref.2970.pdf>

Núñez, M., & Hurtado, J. (2005). Bioensayos de toxicidad aguda utilizando *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) desarrollada en medio de cultivo modificado. *Revista Peruana de Biología*, 12(1), 165-170.

Osorio Dávila, K. (2022). *Caracterización de biosurfactantes producidos por cepas microbianas aisladas del río Lerma* [Proyecto de Servicio social]. Universidad Autónoma Metropolitana.

Pais Chanfrau, J. M., Núñez Pérez, J., Lara Fiallos, M. V., Rivera Intriago, L. M., Trujillo Toledo, L. E., & Cuaran Guerrero, M. J. (2017). Valorización del suero de leche: Una visión desde la biotecnología. *Bionatura*, 2(4). <https://doi.org/DOI.10.21931/RB/2017.02.04.11>

Poveda, E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista chilena de nutrición*, 40(4), 397-403.

<https://doi.org/10.4067/S0717-75182013000400011>

Raiger, L., & López, N. (2009). Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Química Viva*, 8(3), 146-161.

Ramírez, J. J. (2010). *Evaluación de la variabilidad según ISO 7889/IDF 117 de los cultivos iniciadores Streptococcus thermophilus y Lactobacillus bulgaricus en Yogurt y helado en almacenamiento y validación de un método para la enumeración del probiótico Bifidobacterium lactis*. [Grado, Instituto Tecnológico de Costa Rica]. [https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/698/Informe\\_final.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/698/Informe_final.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Riojas, H., Torres, L., Mondaca, I., Balderas, J. de J., & Gortáres, P. (2010). Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Química Viva*, 9(3), 120-145.

Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., & Oliveira, R. (2006). Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 32, 135-142.

Rodrigues, L. R., & Teixeira, J. A. (2008). Biosurfactants production from cheese whey. *Advances in Cheese Whey Utilization*, 81-104.

Rodríguez, J. M., Serna, M. A., Uribe, B. K., & Quintanilla, M. X. (2014). Aplicación de la metodología de superficie de respuesta para evaluar el efecto de la concentración de azúcar y de cultivos iniciadores comerciales sobre la cinética de fermentación del Yogurt. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(1), 213-225.

Rodríguez-Gonzales, A., Zárate-Villarroe, S. G., & Bastida-Codina, A. (2022). Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar biorremediación. *Revista de Ciencias Ambientales*, 56(1), 178-208. <https://doi.org/10.15359/rca.56/1.9>

Rosas Galván, N. S. (2018). *Producción, purificación, caracterización y elucidación de la*

- estructura de biosurfactantes por cepas de Serratia marcescens* [Doctoral, Universidad Autónoma del Estado de Morelos].  
<http://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/524/ROGNLS07T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ruiz, F., Rubio, M., & Pérez, R. (2018). *Efectos del proceso de elaboración de queso en el contenido protéico y microbiológico del lactosuero* (p. 41) [Investigación]. Universidad Nacional Autónoma de Chota.  
<https://repositorio.unach.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14142/290/Suero.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sánchez Jiménez, J. J. (2020). *Evaluación de la viabilidad de las bacterias ácido-lácticas usadas para la elaboración de yogurt frente a fluido gástrico simulado* [Tesis de grado, Universidad Central del Ecuador].  
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/21958/1/T-UCE-0008-CQU-242.pdf>
- Santos, O. (2017). *Detección e Identificación de Biosurfactantes y/o Bioemulsificantes producidos por Aislados Bacterianos asociados a una Fosa Petrolera de la Faja Petrolífera del Orinoco* [Tesis de grado, Universidad Central de Venezuela].  
<http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/16817/1/TEG%20Oriana%20Santos%20Mayo%202017.pdf>
- Satoque Cala, E. L. (2010). *Producción, caracterización y evaluación de la actividad biológica de biosurfactantes (ramnolípidos) a partir de rizobacterias de fique (Furcraea spp.)*. [Maestría]. Pontificia Universidad Javeriana.
- Sulbarán Mora, M., Bahsas, A., Velásquez, W., & Otoniel Rojas, J. (2005). Caracterización de Biosurfactantes producidos por Pseudomonas Fluorescentes aisladas de emulsiones de petróleo pesado. *Ciencia*, 13(2), 228-239.
- Terradillos, J., Bilbao, M., & Málaga, A. (2004). Lubricación y mantenimiento de motores de gas. *Boletín mensual sobre lubricación y mantenimiento. Wearcheckiberica*, 4.

- Toribio Jiménez, J., Velázquez Aradillas, J. C., Romero Rodríguez, Y., Rodríguez Barrera, M. Á., Chávez Gonzáles, J. D., Guevara Luna, J., & Aguirre Noyola, J. L. (2014). *Pseudomonas* sp productoras de biosurfactantes. *Tlamati*, 5(2), 66-82.
- Vásconez, L. (2018). Convenios en cinco ciudades del Ecuador para reciclar aceites usados. *El Comercio*. <https://www.elcomercio.com/actualidad/ecuador/convenios-ciudades-ecuador-reciclar-aceites.html>
- Vasileva-Tonkova, E., & Gesheva, V. (2007). Biosurfactant Production by Antarctic Facultative Anaerobe *Pantoea* sp. During Growth on Hydrocarbons. *Current Microbiology*, 54, 136-141. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0345-6>
- Viteri, C. A., Illera, M. G. de, & Pantoja, J. A. M. (2014). Caracterización fisicoquímica del suero dulce obtenido de la producción de queso casero en el municipio de Pasto. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 1(1), 1. <https://doi.org/10.23850/24220582.110>
- Whang, L.-M., Liu, P.-W. G., Ma, C.-C., & Cheng, S.-S. (2008). Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials*, 151(1), 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.063>
- Xia, W.-J., Luo, Z., Dong, H.-P., Yu, L., Cui, Q.-F., & Bi, Y.-Q. (2012). Synthesis, Characterization, and Oil Recovery Application of Biosurfactant Produced by Indigenous *Pseudomonas aeruginosa* WJ-1 Using Waste Vegetable Oils. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(5), 1148-1166. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9501-y>
- Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 339-347. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.001>

Anexos

Anexo A



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
 FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA  
 DEPARTAMENTO DE PETRÓLEOS, ENERGÍA Y CONTAMINACIÓN



INFORME DE RESULTADOS  
 ÁREA DE PETRÓLEOS

Informe N°: 23-132.1  
 Fecha de emisión: 2023-07-17

**Cliente<sup>a</sup>:** ARIANA PAOLA CHUMI PASATO  
**Contacto<sup>a</sup>:** Srta. Ariana Chumi  
**Dirección<sup>a</sup>:** Cuenca, sector El Batán  
**Teléfono<sup>a</sup>:** 0962006231 **Correo-e<sup>a</sup>:** [ariana.chumi@ucuenca.edu.ec](mailto:ariana.chumi@ucuenca.edu.ec)  
**Tipo de muestra<sup>a</sup>:** BIOTENSOACTIVO  
**Descripción de la muestra<sup>a</sup>:** Biosulfactante  
**Condiciones de la Muestra:** Muestra en envase de vidrio ámbar, sellado  
**Fecha de ingreso de muestra:** 2023-07-05  
**Código de la muestra:** 23-132.1  
**Fecha de realización de ensayos:** 2023-07-10  
**Lugar donde se realizaron los ensayos:** Laboratorio DPEC – Área de Petróleos

| DETERMINACIÓN                    | UNIDAD | MÉTODO / TÉCNICA        | RESULTADO | INCERTIDUMBRE (k=2) |
|----------------------------------|--------|-------------------------|-----------|---------------------|
| TENSIÓN SUPERFICIAL <sup>a</sup> | N/m    | MÉTODO INTERNO (Anillo) | 0,0527    | -                   |

**Nota:** Los ensayos marcados con (\*) no están incluidos en el alcance de acreditación del SAE.  
**Nota:** Los resultados que constan en el presente informe solo están relacionados con la muestra entregada por el cliente al DPEC.  
**Nota:** Los resultados se aplican a la muestra, tal y como se recibió

**Observaciones<sup>b</sup>:** El resultado de la tensión superficial se realizó a una temperatura de 20°C.

**Condiciones Ambientales. - Presión:** 542,0 a 543,0 mm Hg, **Temperatura:** 18,3 a 20,0 °C

<sup>a</sup> Información proporcionada por el cliente, el Laboratorio DPEC no se responsabiliza por esta información  
<sup>b</sup> La observación corresponde a adiciones, desviaciones o exclusiones del método

Analistas: RHV  
 Elaborado por: VRT

Revisado por:   
 Ing. Richard Herrera V.  
 RESPONSABLE TÉCNICO

Aprobado por:   
 Ing. Fernanda Toasa L.  
 RESPONSABLE DE CALIDAD

**ADVERTENCIA:** EL USUARIO DEBE EXIGIR EL ORIGINAL DEL INFORME COMPLETO O SOLICITAR UNA COPIA CONTROLADA DEL MISMO.  
 EL DPEC NO SE RESPONSABILIZA POR LA REPRODUCCIÓN PARCIAL DE ESTE INFORME

Dirección: Enrique Rither s/n y Bolívar

Teléfono: 2904794 / 2544631 ext. 26  
 QUITO - ECUADOR

E-mail: [fig.secretaria.dpec@ucue.edu.ec](mailto:fig.secretaria.dpec@ucue.edu.ec)

MC2201-P01-8

Hoja 1 de 1

## Anexo B



## STI-12

## Product Information

Version: 5 PI EU EN 11-11-2019

## Description

Thermophilic lactic acid culture.

## Culture composition:

Streptococcus thermophilus

|              |                  |         |  |
|--------------|------------------|---------|--|
| Material No: | 713516           | Color:  | Off-white to slightly reddish or brown |
| Size:        | 30X50 U          | Format: | FD-DVS                                 |
| Type:        | Pouch(es) in box | Form:   | Granulate                              |

## Storage and handling

&lt; -18 °C / &lt; 0 °F

## Shelf life

At least 24 months from date of manufacture when stored according to recommendations.

At +5°C (41°F) the shelf life is at least 6 weeks.

## Application

## Usage

The culture is primarily applied in Pasta Filata cheese types e.g. Mozzarella and Pizza cheese types. The culture can be applied alone or in combination with other lactic acid cultures, e.g. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*.

## Recommended inoculation rate

|   |       |       |        |         |         |         |         |
|---|-------|-------|--------|---------|---------|---------|---------|
| Amount of milk to be inoculated (in liters) | 500   | 2,000 | 5,000  | 10,000  | 15,000  | 20,000  | 25,000  |
| Amount of DVS culture                       | 50 U  | 200 U | 500 U  | 1,000 U | 1,500 U | 2,000 U | 2,500 U |
| Amount of milk to be inoculated (in lbs)    | 1,140 | 4,500 | 11,350 | 22,700  | 34,000  | 45,500  | 57,000  |
| Amount of DVS culture                       | 50 U  | 200 U | 500 U  | 1,000 U | 1,500 U | 2,000 U | 2,500 U |

Designed for optimal performance, the composition and recommended inoculation rate for this culture were carefully developed by use of unique microbial strains, advanced biotechnological principles and more than 140 years of accumulated experience from the dairy industry.

Warning: Applying lower than recommended inoculation rate may cause undesired variation in product quality, lower production efficiency, product yield losses, potential fermentation failures and an increased risk of bacteriophage attacks.

## Directions for Use

Remove cultures from the freezer just prior to use. Sanitize the top of the pouch with chlorine. Open the pouch and pour the freeze-dried granules directly into the pasteurized product using slow agitation. Agitate the mixture for 10-15 minutes to distribute the culture evenly. The recommended incubation temperature is 35-45°C (95-113°F). For more information on specific applications see our technical brochures and suggested recipes.

[www.chr-hansen.com](http://www.chr-hansen.com)

Page: 1 (4)

The information contained herein is to the best of our knowledge and belief, true and accurate and the product(s) mentioned herein do(es) not infringe the intellectual property rights of any third party. The product(s) may be covered by pending or issued patents, registered or unregistered trademarks, or similar intellectual property rights. All rights reserved.





## STI-12

Product Information  
Version: 5 PI EU EN 11-11-2019

### Food Safety

No guarantee of food safety is implied or inferred should this product be used in applications other than those stated in the Usage section. Should you wish to use this product in another application, please contact your Chr. Hansen representative for assistance.

### Labeling

Suggested labeling "lactic acid culture" or "starter culture", however, as legislation may vary, please consult national legislation.

### Trademarks

Product names, names of concepts, logos, brands and other trademarks referred to in this document, whether or not appearing in large print, bold or with the ® or TM symbol are the property of Chr. Hansen A/S or an affiliate thereof or used under license. Trademarks appearing in this document may not be registered in your country, even if they are marked with an ®.

### Technical support

Chr. Hansen's Application and Product Development Laboratories and personnel are available if you need further information.

---

### GMO information

In accordance with the below mentioned legislation of the European Union we can inform that:

STI-12 is not a GM (genetically modified) food\*.

It does not contain or consist of GMOs and is not produced from GMOs in accordance with Regulation 1829/2003\* on GM food and feed.

As such GM labelling is not required for STI-12 or the food it is used to produce\*\*. Moreover, the product does not contain any GM labelled raw materials.

\* Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed.

\*\* Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC.

Please note the information presented here does not imply that the product can either be used in, or is externally certified to be used in, food or feed labelled as 'organic' or 'GMO free'. Requirements to make these claims vary per country, please contact us for more information.

---

[www.chr-hansen.com](http://www.chr-hansen.com)

Page: 3 (4)

The information contained herein is to the best of our knowledge and belief, true and accurate and the product(s) mentioned herein do(es) not infringe the intellectual property rights of any third party. The product(s) may be covered by pending or issued patents, registered or unregistered trademarks, or similar intellectual property rights. All rights reserved.



## STI-12

Product Information  
Version: 5 PI EU EN 11-11-2019

### Allergen Information

| List of common allergens in accordance with the US Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004 (FALCPA) and EU Regulation 1169/2011/EC with later amendments | Present as an ingredient in the product |
|---|---|
| Cereals containing gluten* and products thereof   | No                                      |
| Crustaceans and products thereof  | No                                      |
| Eggs and products thereof   | No                                      |
| Fish and products thereof   | No                                      |
| Peanuts and products thereof  | No                                      |
| Soybeans and products thereof   | No                                      |
| Milk and products thereof (including lactose)   | Yes                                     |
| Nuts* and products thereof  | No                                      |
| List of allergens in accordance with EU Regulation 1169/2011/EC only  |   |
| Celery and products thereof   | No                                      |
| Mustard and products thereof  | No                                      |
| Sesame seeds and products thereof   | No                                      |
| Lupine and products thereof   | No                                      |
| Mollusks and products thereof   | No                                      |
| Sulphur dioxide and sulphites (added) at concentrations of more than 10 mg/kg or 10 mg/litre expressed as SO <sub>2</sub>   | No                                      |

\* Please consult the EU Regulation 1169/2011 Annex II for a legal definition of common allergens, see European Union law at: [www.eur-lex.europa.eu](http://www.eur-lex.europa.eu)

[www.chr-hansen.com](http://www.chr-hansen.com)

Page: 4 (4)

The information contained herein is to the best of our knowledge and belief, true and accurate and the product(s) mentioned herein do(es) not infringe the intellectual property rights of any third party. The product(s) may be covered by pending or issued patents, registered or unregistered trademarks, or similar intellectual property rights. All rights reserved.

## Anexo C

Tabla 12

*Pesos del biosurfactante obtenido con respecto al tiempo y temperatura*

|              | <b>24 horas</b> | <b>48 horas</b> | <b>72 horas</b> |
|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>38 °C</b> | 0.098           | 0.105           | 0.112           |
|              | 0.096           | 0.109           | 0.121           |
|              | 0.093           | 0.102           | 0.102           |
| <b>40 °C</b> | 0.021           | 0.132           | 0.093           |
|              | 0.025           | 0.141           | 0.088           |
|              | 0.019           | 0.141           | 0.081           |
| <b>42 °C</b> | 0.051           | 0.078           | 0.112           |
|              | 0.079           | 0.099           | 0.111           |
|              | 0.044           | 0.077           | 0.068           |