

SUSTITUCIÓN DE LOS COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO PARA PRODUCIR UN BIOTENSOACTIVO APLICABLE A LA ESTIMULACIÓN DE POZOS DE PETRÓLEO.

Ortiz E.¹, Villaverde M.J.², García A.¹, Nuñez R.¹

1 Instituto de Oceanología, Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente

2 Facultad de Biología, U.H.

RESUMEN

Se estudió la sustitución de algunos componentes del medio de cultivo empleados como reactivos químicos puros, a escala de laboratorio por variantes nacionales de bajo costo, aplicables a la producción en gran escala. En la sustitución del extracto de levadura como fuente de factores de crecimiento y nitrógeno orgánico (producto de importación), se estudiaron diferentes variantes de las cuales la crema de levadura resultó ser la más eficiente. La crema de levadura constituye un producto de desecho de la fermentación alcohólica dentro de la misma planta donde se produce el tensioactivo. Se llevó a cabo el balance de la concentración de nitrógeno orgánico e inorgánico en el medio de cultivo mediante un diseño bifactorial con tres niveles de concentración para cada uno, se estudió el comportamiento de la superficie de respuesta resultante, y se determinó la combinación de niveles óptima. Los mejores resultados se obtuvieron con la combinación: Sulfato de amonio 4.82 g/L; Crema de Levadura 86.32 mL/L. También el ácido fosfórico como fuente de fósforo (producto de importación) y el sulfato de amonio como fuente de nitrógeno inorgánico fueron satisfactoriamente sustituidos por el fosfato de amonio como fuente de ambos elementos, que es un fertilizante ampliamente usado en el país y de bajo costo.

Palabras clave: bacteria marina, biotensioactivo, optimización, pozos de petróleo

ABSTRACT

The replacement of some components of the culture broth employed at laboratory scale as pure chemicals, by cheaper national options suitable at great scale production was studied.

To replace the yeast extract as a source of growth factors and organic nitrogen (imported), different options were tested, from which yeast cream was found to be the most efficient. Yeast cream is a waste product from alcoholic fermentation inside the same plant where the biosurfactant is produced. The balance of inorganic and organic nitrogen concentration in the culture broth was carried out using a bifactorial design with three levels for each factor, and the resulting response surface was analyzed to find out the optimal level combination. The best results were obtained at: Ammonium sulphate 4.82 g/L; Yeast cream 86.32 mL/L. Orthophosphoric acid as phosphorus source (imported) and ammonium sulphate as inorganic nitrogen source were successfully replaced too by ammonium phosphate as the source of both elements. This is a cheap and widely used fertilizer.

Key words: Marine bacteria, biosurfactant, optimization, oil wells

INTRODUCCION

La industria petrolera es una gran consumidora de tensioactivos obtenidos por síntesis química que son empleados en la estimulación de los pozos de extracción para elevar así su productividad (Desai y Desai, 1993). Debido a la alta demanda nacional de combustible en la situación actual, las dificultades existentes con las importaciones y el alto costo de los tensioactivos de origen sintético, la producción de tensioactivos por la vía fermentativa constituye una alternativa con amplias ventajas económicas.

Por primera vez en nuestro país se desarrolló una tecnología para la producción de un caldo fermentado con un alto contenido de biotensioactivo, obtenido a partir de

un microorganismo aislado de aguas de la plataforma marina cubana y cultivado en un medio con un carbohidrato de producción nacional (Bellota *et al*, 1992).

La producción de biotensioactivos a gran escala para su aplicación industrial, está condicionada por un costo de producción competitivo con relación a los obtenidos por síntesis química (Martin, 1991). El estudio de las condiciones fisiológicas y nutricionales óptimas permiten lograr el escalado desde el laboratorio hasta nivel industrial de los bioproductos.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la posibilidad de sustituir estos reactivos por variantes de producción nacional más baratas, que puedan ser aplicadas en grandes cantidades en la fábrica, y en

caso de ser posible las sustituciones, efectuar el balance de los componentes en el medio de cultivo.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo empleado

Se trabajó con *Bacillus cereus* cepa IDO-503 aislada de los sedimentos de la Bahía de Cárdenas que pertenece a la Colección de Bacterias Marinas (CBM) del Instituto de Oceanología (CITMA). Esta cepa había sido seleccionada previamente de un grupo de 180 aislamientos, debido a sus características productivas, tomando como premisas el crecimiento microbiano y los cambios en las propiedades tensiométricas. (Ortiz, 1998).

Condiciones de cultivo.

Todos los experimentos se realizaron a partir de una siembra de tubos de cultivos de 24 h en medio #6 agarizado (Gorvienko, 1961). Se probaron diferentes variantes del medio de fermentación MS propuesto por Mulligan *et al*, (1984), para la producción de tensioactivo con el fin de sustituir algunos de los componentes de este medio por materias primas de bajo costo y/o disponibilidad nacional. El cultivo se inoculó al 5 % (v/v) en 100 mL de medio. Todas las fermentaciones se llevaron a cabo en zaranda orbital Bioblock durante 24 horas a 125 r/min y 30 °C.

Se determinó el crecimiento microbiano por DO a 650 nm en espectrofotocolorímetro Spekol 11 de fabricación alemana y la actividad superficial como tensión superficial (σ_s) y tensión interfacial (σ_i) en un tensiómetro Krüss K 10 T de fabricación alemana, mediante el método de anillo de Du Noüy (Duvnjak *et al*, 1982). Los valores de σ_i del caldo fermentado se realizaron utilizando diesel como fase oleosa. Estas determinaciones se realizaron con el caldo libre de células, obtenido por centrifugación a 8,000 r/min y 4 °C durante 30 minutos, en una centrífuga Beckman J2-H5 (USA).

La DMC se determinó en un gráfico de σ_s vs dilución en agua destilada del caldo centrifugado libre de células, por el método propuesto por Gerson y Zajic (1979).

Tratamiento estadístico de los resultados

Para el procesamiento estadístico de los datos se usó el análisis de varianza de clasificación simple y triple y la prueba de comparación de medias de rangos múltiples de Duncan (Lerch, 1977). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los datos se procesaron con el programa Microsoft Excel 6.0

Sustitución de algunos componentes del medio de cultivo.

1. Sustitución de microelementos y agua destilada

Para lograr un proceso de producción más económico a nivel industrial se sustituyeron algunos de los componentes del medio de cultivo ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, EDTA y agua destilada) por agua corriente. Se realizó un experimento completamente aleatorizado para comparar los niveles de crecimiento y producción de tensioactivo con respecto al medio MS. Este medio modificado se denominó MSP.

2. Sustitución del extracto de levadura

La sustitución del extracto de levadura por diferentes subproductos de la industria alcoholera se realizó utilizando un experimento completamente aleatorizado.

Variantes empleadas:

a) Crema de levadura: Biomasa húmeda de la fermentación alcohólica suministrada por la fábrica de Bebidas y Licores de Santa Cruz del Norte.

b) Levadura Torula: Suministrada por la fábrica de levadura torula del CAI A. Sánchez de la provincia de Cienfuegos. Previamente se alcalinizó (pH=8) una suspensión de levaduras en agua destilada al 2 % (w/v) y luego se incubó a 50 °C durante 1 hora.

c) Mosto de destilería: Procedente de la fábrica de Bebidas y Licores de Santa Cruz. Se trabajo con el producto íntegro y tratado (pH=8 e incubación a 50 °C por 1 hora) ya que el procesamiento de su obtención no garantiza un alto grado de lisis celular.

Estos subproductos se evaluaron en la misma proporción que el extracto de levadura en el medio original. Para el caso de la crema de levadura y el mosto de destilería se determinó la concentración de sólidos en suspensión por masa seca gravimétrica.

Las variantes se evaluaron respecto al medio MSP en cuanto crecimiento celular y actividad superficial.

Una vez seleccionada la fuente de nitrógeno orgánico a utilizar en el medio de cultivo se realizó un balance de nitrógeno orgánico e inorgánico utilizando un diseño factorial completo 3^2 , el cual permitió optimizar los valores de concentración de estas fuentes.

Para poder llevar a cabo la optimización, la función objetivo seleccionada fue la actividad superficial y se utilizó $\arctan(1/(\sigma_s + \sigma_i))$, porque esta transformación permite un aumento en las diferencias significativas entre los estimadores.

2. Sustitución del sulfato de amonio, el ácido ortofosfórico y el hidróxido de sodio

Se realizó un experimento completamente aleato-

rizado para la sustitución del sulfato de amonio, el ácido ortofosfórico y el hidróxido de sodio, que deben ser adquiridos en moneda libremente convertible, por el hidrógeno fosfato de amonio grado fertilizante, que puede adquirirse en moneda nacional.

Las variantes de concentración de fosfato de amonio en el medio de cultivo son las siguientes:

Variante	Concentración (g/L)
A	Medio Basal (M.S.)
B	5.30
C	6.62
D	4.0

RESULTADOS Y DISCUSION

Sustitución de algunos componentes del medio de cultivo.

La actividad microbiana se ve afectada no sólo por los componentes del medio de cultivo y la concentración de éstos, sino también por las interacciones entre éstos. Los estudios de modificaciones en los medios de cultivo, que disminuyan los costos de producción, deben garantizar la mínima afectación en los rendimientos del proceso tecnológico.

La actividad superficial y los niveles de concentración celular de la cepa IDO-503 en el medio de cultivo con agua corriente (MSP) no difieren significativamente de los alcanzados por esta bacteria marina en el medio MS (Tabla I).

Tabla I. Valores de DO, σ_s y σ_i para la cepa IDO-503 en los medios MS y MSP

Variante	DO	σ_s (mN/m)	σ_i /D (mN/m)
MS	0.879 ^a ± 0.06	29.1 ^a ± 0.30	1.8 ^a ± 0.02
MSP	0.867 ^a ± 0.03	29.9 ^a ± 0.23	1.9 ^a ± 0.02

El medio MSP obtenido a partir de estas sustituciones constituyen una variante muy atractiva en la biosíntesis de estos productos, ya que se disminuye considerablemente el costo de producción.

El análisis de los resultados de la sustitución del extracto de levadura en el medio de cultivo por componentes de producción nacional arrojó que las σ_s y σ_i en el medio con extracto de levadura sólo varían significativamente en el cultivo con autolizado de levadura.

Los residuos de la industria alcoholera como son la crema de levadura y el mosto de destilería sustituyen satisfactoriamente al extracto de levadura en el medio MSP para esta bacteria marina (Tabla II). Este resultado era de esperar, puesto que los mismos son ricos en factores de crecimiento y tienen, por su origen, una composición similar al extracto de levadura. También debe tenerse en cuenta que la miel final de la caña de azúcar aporta factores de

crecimiento y que además posee sustancias tensioactivas que favorecen la actividad superficial del caldo fermentado.

Las diferencias significativas de la actividad superficial entre el caldo con autolizado de levadura torula y el resto de las variantes utilizadas deben estar relacionadas con el método de obtención de este producto. El mismo se obtiene en condiciones muy drásticas (pH = 10 y 70 °C durante 12 horas), lo cual provoca la descomposición de factores de crecimiento que afectan la producción del tensioactivo de *Bacillus cereus* IDO-503 en esas condiciones.

La crema de levadura se seleccionó como factor de crecimiento para la producción industrial de bio-tensioactivos en esta cepa porque los valores de DMC⁻¹ obtenidos son similares a los del medio MSP (extracto de levadura).

La crema de levadura constituye un producto de desecho de la fermentación alcohólica dentro de la misma planta donde se produciría le tensioactivo y su aprovechamiento es económicamente rentable.

Para el balance de nitrógeno orgánico e inorgánico se realizó un diseño factorial completo 3², teniendo en cuenta que este diseño es de óptimos, ya que minimiza la suma de las varianzas de los estimadores. El diseño de la matriz codificada y los resultados obtenidos en el experimento se presentan en la Tabla III.

Las cifras representan, para cada punto del experimento, la media con el intervalo de confianza para un nivel de significación del 5%.

Los resultados obtenidos del ajuste del polinomio para las variables descodificadas se presentan a continuación:

$$Y = 7.421 + 0.244 Z_1^2 - 0.527 Z_1 + 5.15 \times 10^{-4} Z_1 Z_2 - 2.949 \times 10^{-5} Z_2^2 + 3.22 \times 10^{-3} Z_2$$

$$\sigma^2 = 0.013 \quad r^2 = 0.787$$

Con este modelo se obtuvieron los valores óptimos para las dos fuentes de nitrógeno.

Sulfato de amonio 4.82 g/L

Crema de Levadura 86.32 mL/L

El balance de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo entre la crema de levadura y el sulfato de amonio mediante un diseño central compuesto rotacional resultó efectivo, ya que con esta relación de fuentes de nitrógeno sólo se logra un aumento de la función objetivo en un 5%, sin embargo disminuye la cantidad de sulfato de amonio y crema de levadura a utilizar en el medio de cultivo en un 10% y 11% respectivamente.

Además la superficie de respuesta del balance ni-

trógeno orgánico e inorgánico muestra un óptimo local en la zona de estudio que permite trabajar con mayor libertad durante el proceso de obtención del

de amonio grado fertilizante en el medio MSP.

No se aprecian diferencias significativas en la actividad superficial del biotensioactivo al utilizar dife-

Tabla II Utilización de diferentes fuentes de factores de crecimiento en la producción de tensioactivo

Componente	σ_S (mN/m)	σ_i/D (mN/m)	DMC ⁻¹
Extracto de levadura	29.7 ^a ±0.13	1.0 ^a ±0.10	200
Autolizado de levadura	36.7 ^b ±0.63	5.9 ^b ±0.38	50
Crema termolizada	28.0 ^a ±0.07	0.6 ^a ±0.04	200
Mosto íntegro	28.1 ^a ±0.12	0.9 ^a ±0.04	100
Mosto tratado	28.4 ^a ±0.02	0.9 ^a ±0.06	100

Tabla III. Matriz codificada y los resultados obtenidos con el intervalo de confianza, utilizando un diseño factorial completo 3².

Experimento	X ₁	X ₂	X ₁ X ₂	X ₁ ²	X ₂ ²	Y
1	-1	-1	1	1/3	1/3	1.959 ± 0,030
2	1	-1	-1	1/3	1/3	1.958 ± 0,001
3	-1	1	-1	1/3	1/3	1.924 ± 0,012
4	1	1	1	1/3	1/3	1.943 ± 0,060
5	1	0	0	1/3	-2/3	1.948 ± 0,002
6	-1	0	0	1/3	-2/3	1.933 ± 0,040
7	0	1	0	-2/3	1/3	1.887 ± 0,002
8	0	-1	0	-2/3	1/3	1.850 ± 0,030
9	0	0	0	-2/3	-2/3	1.913 ± 0,002

X₁: fuente de N inorgánico X₂: fuente de N orgánico
 Y: actividad (1/TS + TI)

bioproducto a nivel industrial sin tener cambios significativos en la actividad superficial del caldo fermentado por *Bacillus cereus* IDO-503 (figura 1).

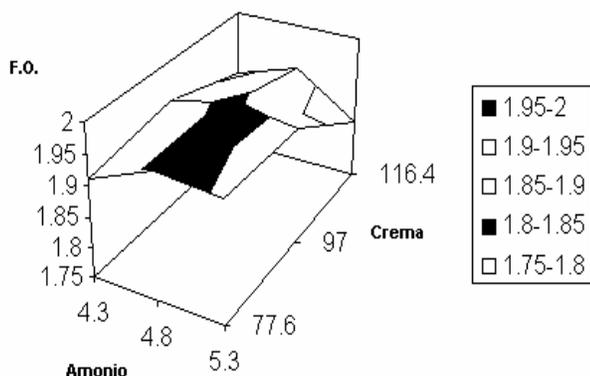


Figura 1. Superficie de respuesta del balance nitrógeno
Tabla IV . Valores de σ_S y σ_i para cada variante de concentración de fosfato de amonio.

Variante	σ_S (mN/M)	σ_i/D (mN/M)
A	29.6 ^a ± 0.04	1.8 ^a ± 0.09
B	29.6 ^a ± 0.06	1.6 ^a ± 0.04
C	29.9 ^a ± 0.02	1.8 ^a ± 0.04
D	29.8 ^a ± 0.28	1.8 ^a ± 0.14

En la tabla IV se muestran los resultados de la sustitución del sulfato de amonio, el ácido ortofosfórico y el hidróxido de sodio por el hidrógeno fosfato

rentes niveles de concentración de fosfato de amonio con respecto al medio de cultivo empleado hasta el momento (Tabla IV). Se seleccionó la variante D ya que requiere menos concentración de este nutriente y se alcanzan valores de σ_S y σ_i similares al resto de las variantes evaluadas.

La sustitución de las fuentes de nitrógeno, fósforo y factores de crecimiento en el medio de cultivo por materias primas menos puras y más asequibles, no produjo una afectación sensible en la actividad superficial del tensioactivo producido por *Bacillus cereus* IDO-503.

Estos resultados permitieron diseñar diferentes variantes de medios de cultivo en los que se sustituyen algunos de sus componentes (de costo elevado y que deben ser adquiridos en moneda libremente convertible) por materias primas de bajo costo y disponibilidad en Cuba y con los cuales se obtuvo una importante actividad superficial. Resultados similares se obtuvieron en el cultivo de otras cepas de origen marino por Villaverde *et al*, (1997).

CONCLUSIONES

La sustitución de las fuentes de nitrógeno, fósforo y factores de crecimiento en el medio de cultivo por materias primas menos puras y más asequibles, no produjo una afectación sensible en la actividad del tensioactivo producido por *Bacillus cereus* IDO-503

REFERENCIAS

- Bellota, M. *et al*, (1992). IDO-503: Tensioactivo Microbiano para la Estimulación de Pozos de Petróleo. Resultado Científico Destacado a Nivel Nacional. ACC.
- Desai J. D y A. J. Desai, (1993). Production of Biosurfactants. En Biosurfactants: production properties applications. Ed. Naim Kosaric. Ontario. pp 65.
- Duvnjak, Z. ;Cooper, D.P. y Kosaric, N. (1982): Production of surfactant by *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558 **Biotech. Bioeng.**,24: 165-175.
- Gerson, D.F. y Zajic, J.E. (1979). Microbial Biosurfactants. **Process Biochem.** 14:20-29.
- Gorvienko, Y.A. (1961): Sobre las ventajas cualitativas del agar nutriente en medios de cultivo para microorganismos heterogéneos. **Microbiol.** 30(1):168-172.
- Lerch, G. (1977). La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. Editorial Científico Técnica. La Habana. Capítulo 16: Análisis de Varianza. Clasificación triple: 251-277.
- Martin, M. (1991). Obtención de biotensioactivos de origen microbiano. Estructura y bioconversión de Trehalosalípidos. Tesis de Maestría en biotecnología, bioquímica y desarrollo de procesos. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Mulligan, O.N., Cooper, D.G. y Neufeld, J. (1984). Selection of microbes producing biosurfactants in media without hidrocarbons. **J.Fermentation Technol.**62:311-314.
- Ortíz, E. (1998). Obtención de un biotensioactivo para la estimulación de pozos de petróleo. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad de La Habana.
- Villaverde, M.*et al*, (1997). Informe parcial de proyecto de investigación. Estimulación de pozos de petróleo de Jatibonico. Archivo Científico. Instituto de Oceanología. CITMA Ciudad de la Habana, Cuba

Recibido: Nov. 99
Aceptado: Ene. 00

