

CIENCIA 23(1), 39 - 50, 2015
Maracaibo, Venezuela

Evaluación de la capacidad de ramnolípidos crudos para la remoción y emulsificación de hidrocarburos en un sistema modelo

Julio Otoniel Rojas^{1*}, William Velásquez², Zarack Chacón¹ y María Ball³

¹Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos,

²Laboratorio de Análisis Instrumental. Departamento de Química
Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología³,
Departamento de Biología. Facultad de Ciencias,
Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela

Recibido: 07-10-14 Aceptado: 27-02-15

Resumen

Entre los biosurfactantes más utilizados en estudios de biorremediación están los ramnolípidos. En el presente trabajo evaluamos las soluciones de ramnolípidos crudos, comparándolas con los ramnolípidos purificados, para la remoción y emulsificación de hidrocarburos del petróleo en un sistema modelo. Este estuvo formado por grava comercial para aves impregnada con una mezcla de petróleo pesado Cerro Negro disuelto en *diesel*. Las gravas fueron tratadas con las soluciones de ramnolípidos mediante un proceso de lavado en agitación (150 rpm) a 30 °C. El porcentaje de remoción se determinó gravimétricamente. Los ramnolípidos fueron purificados mediante precipitación ácida y cromatografía de adsorción con Amberlita XAD 2 y analizados, al igual que las gravas, mediante espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier (IRTF). Las cepas productoras de ramnolípidos fueron identificadas mediante secuenciación de ADNr 16S. Se encontró que los ramnolípidos crudos producidos por la cepa *P. aeruginosa* BIOMI-E5 presentaron los mejores resultados, con un porcentaje de remoción de los hidrocarburos del 101,16%, en comparación con los purificados. Tal mejora en la remoción se debió a la acidificación del medio (pH 5,8) por la acción sinérgica de metabolitos ácidos producidos conjuntamente con los ramnolípidos. Las soluciones de ramnolípidos crudos serían muy útiles en la remoción de hidrocarburos de suelos contaminados y podrían serlo también en los procesos de estimulación de pozos durante la recuperación terciaria del petróleo.

Palabras clave: ramnolípidos, *Pseudomonas aeruginosa*, remoción de hidrocarburos.

* Autor para la correspondencia: oroja@ula.ve

Evaluation of the ability of crude rhamnolipids for the removal and emulsification of hydrocarbons in a model system

Abstract

Among the most used biosurfactants in bioremediation studies are rhamnolipids. In this paper we evaluate the solutions of crude rhamnolipids, when compared with the purified ones, for the removal and emulsification of petroleum hydrocarbons in a model system. This consisted of commercial poultry gravel impregnated with a mixture of heavy crude oil Cerro Negro dissolved in diesel. Gravels were treated with solutions of rhamnolipids using a wash process with stirring (150 rpm) at 30 °C. The removal percentage was determined gravimetrically. The rhamnolipids were purified by acid precipitation and adsorption chromatography with Amberlite XAD-2 and analyzed as gravels by Fourier transform infrared (FTIR). Rhamnolipids producing strains were identified by 16S rDNA sequencing. It was found, that crude rhamnolipids produced by the strain *Pseudomonas aeruginosa* BIOMI-E5 were the most efficient, with a percentage of 101,16% of oil removal compared with the purified rhamnolipids. Such removal was improved due to the acidification of médium (pH 5,8) by the synergistic action of acidic metabolites, produced jointly with rhamnolipids. Crude rhamnolipids solutions would be very useful in the removal of hydrocarbons from contaminated soils and could be useful also in the process of well stimulation for tertiary oil recovery.

Keywords: rhamnolipids, *Pseudomonas aeruginosa*, removal of hydrocarbons.

Introducción

Cuando ocurre un derrame petrolero, este contamina el suelo, arenas, lodos o fondo de ríos u otros ambientes. El petróleo se adhiere a las partículas del suelo y puede penetrar en sus microporos. Los factores que intervienen en la adherencia son las fuerzas de capilaridad, las de tensión superficial e interfacial, las propiedades de humectabilidad y los ángulos de contacto (1). Para vencer estas fuerzas se pueden utilizar surfactantes de origen químico, pero esto traería como consecuencia la introducción de un contaminante más al ambiente. Los biosurfactantes (surfactantes de origen biológico) son iguales de efectivos que los surfactantes químicos y están llamando la atención debido a que representan una alternativa ecológica frente a sus contrapartes sintéticas (2).

Entre los biosurfactantes más utilizados en estudios de biorremediación están

los ramnolípidos (3). Estos biosurfactantes son producidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*. Otras bacterias también producen ramnolípidos tales como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *Pseudoxanthomonas sp.*, *Enterobacter sp.* y *Pantoea sp.*, perteneciendo estas dos últimas a la familia *Enterobacteriaceae* (4).

Se ha demostrado en muchos estudios la capacidad de remoción o desorción del petróleo que tienen los ramnolípidos purificados (5, 6, 7). Pero como es sabido, el hecho de que *P. aeruginosa* produce además de los ramnolípidos, dependiendo de las condiciones de cultivo y de la cepa, otros metabolitos tales como ácidos orgánicos (8) y pigmentos fenacínicos (9) entre otros. En el presente trabajo nos planteamos evaluar las soluciones de ramnolípidos crudos, al compararlas con los ramnolípidos purificados, en la remoción y emulsificación de hidrocarburos del petróleo en un sistema modelo, lo cual nos permi-

tiría determinar si algunos de los metabolitos presentes en las soluciones de ramnolípidos crudos pudiesen afectar la remoción y emulsificación de la mezcla de hidrocarburo estudiada.

Materiales y Métodos

Microorganismos

Se utilizaron los siguientes microorganismos: *P. aeruginosa* BIOMI-E5 aislada de una muestra de Orimulsión, *Pseudomonas sp.* BIOMI-Alq8, *Pseudomonas sp.* BIOMI-Alq9 y *Pseudomonas sp.* BIOMI-Alq14, aisladas de muestras de suelo contaminadas con petróleo procedentes de los antiguos pozos de la Alquitrana, Estado Táchira. Estas cepas fueron aisladas y caracterizadas preliminarmente desde el punto de vista morfológico y bioquímico en trabajos previos (10,11).

Medio de cultivo para la producción de ramnolípidos

Se utilizó el medio mínimo salino MMS (12) para la producción de los ramnolípidos bajo condiciones no optimizadas: NaH_2PO_4 4g, K_2HPO_4 4g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g, MgSO_4 0,2g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mg, solución de trazas de elementos 0,5 ml, H_2O destilada hasta 1 L. El pH sin ajustar del medio fue de 6,8. El medio se complementó con la solución de elementos trazas de la siguiente constitución por litro de agua destilada: $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20mg; H_3BO_3 , 30mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20mg; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3mg; CuSO_4 , 1mg y $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2,6mg, (13). Se utilizó glicerol como fuente de carbono (1,5%). Los cultivos fueron incubados en matraces de 500 ml con 300 ml de medio, en agitación a 30 °C, durante 4 días. Los preinóculos se prepararon en tubos con caldo nutritivo los cuales fueron inoculados con las cepas e incubados a 30 °C durante 24 horas.

Detección de la producción de los ramnolípidos

Para determinar la producción de los biosurfactantes en los diferentes ensayos, se utilizó primeramente la denominada técnica de *oil spreading* señalada como una de las más sensibles y sencillas (14). Para lo cual, se colocaron 25 ml de agua destilada en una placa de petri de 15 por 100mm y se añadieron 30 μL del hidrocarburo utilizado como modelo (se describe más adelante) sobre la superficie del agua para formar una fina película superficial. Se agregaron delicadamente con una pipeta de precisión 10 μL de las muestras a ensayar en el centro de la película. A continuación se registraron las medidas, por triplicado, de los diámetros de los halos formados en la película de hidrocarburos, comparándolas con las de los controles realizados con medio MMS con glicerol sin inocular.

Otra técnica utilizada fue la del agar CTAB (Bromuro de Cetil-trimetil-amonio)-azul de metileno (15) pero modificada, con la finalidad de registrar la formación del complejo CTAB- azul de metileno-ramnolípidos en forma de precipitado directamente en las soluciones de ramnolípidos a estudiar. Por cada 2 ml de solución de ramnolípidos, contenidos en tubos de 5 ml, se agregaron 20 μL de solución madre de azul de metileno (40 mg/ml) y 10 μL de solución madre de CTAB (10 mg/ml). Se homogenizaron suavemente y se dejaron en reposo a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C \pm 1) durante 12 horas. Como controles se utilizaron 2 ml de medio MMS con glicerol y 2 ml de solución acuosa de ácido fenilsulfónico, en vez de las soluciones de ramnolípidos.

Purificación de los ramnolípidos producidos por las cepas de *Pseudomonas*

Los sobrenadantes obtenidos mediante centrifugación (4500 x g durante 15 minutos) con una centrifuga de mesa Heraeus Crist modelo Labofuge II, de los cultivos previamente esterilizados mediante autoclave (121 °C, 15

psi durante 15 minutos), fueron denominadas soluciones de ramnolípidos crudos. Los ramnolípidos presentes en estas soluciones fueron sometidos a precipitación ácida (pH 2 con HCL 1M) en frío (4 °C) durante 24 horas, y recuperados en buffer bicarbonato de sodio 0,1M mediante centrifugación (4500 x g durante 15 minutos). Se sometieron, posteriormente, a un proceso de purificación mediante cromatografía de adsorción para sustancias hidrofóbicas y anfífilas con Amberlita XAD 2 (Sigma, de diámetro de poro 90 Å y tamaño 20-60). La columna fue equilibrada con buffer fosfato 0,1M a pH 6,1. Los pigmentos y ácidos grasos libres se removieron con agua destilada y los ramnolípidos mediante eluciones con metanol (15). La solución de metanol se evaporó con ayuda de un rotavapor, quedando un concentrado al que denominamos ramnolípidos puros, que fue resuspendido en buffer bicarbonato de sodio 0,1 M. Para analizar los ramnolípidos purificados fueron extraídos del rotavapor con etilacetato (Sigma, grado **HPLC**) en vez de buffer bicarbonato de sodio y se determinó su huella espectral mediante espectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier (**IRTF**).

Para determinar la concentración de ramnolípidos precipitables se tomó un volumen de 40 ml de los extractos metanólicos y se evaporó el metanol mediante rotavapor. Luego se recuperaron los ramnolípidos mediante sucesivas extracciones con H₂O destilada en tubos plásticos Falcon pre-pesados. A continuación, se liofilizaron las muestras y por diferencia de peso de los tubos, se determinó la concentración de los ramnolípidos precipitables en mg/ml. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Sistema modelo para el estudio de la remoción y emulsificación de los hidrocarburos

Se utilizó grava comercial para aves formulada con partículas de forma y tamaño regular de aproximadamente 2 mm de diámetro, provenientes de conchas marinas y arena de cuarzo según datos de la casa

fabricante (Kantal) y una mezcla de hidrocarburos constituida con 10% de petróleo pesado Cerro Negro que contiene resinas y una alta concentración de asfaltenos (16) disuelto en *diesel*, para asegurar la presencia tanto de hidrocarburos saturados como de poliaromáticos en la mezcla de estudio. Se agregó la mezcla de hidrocarburos a la grava comercial (20% p/p) con la finalidad de simular una grava contaminada. Se dejaron reposando las gravas durante un máximo de dos días a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C ± 1) con la finalidad de permitir la homogenización de los hidrocarburos así como su adsorción sobre la superficie y poros de la grava comercial.

Proceso de lavado de las gravas contaminadas

Se adaptó una metodología de lavado de suelo (6,17). La experiencia se realizó en matraces de 125 ml con 12 gramos de grava impregnada con la mezcla de hidrocarburos modelo y con 25 ml de las muestras de los ramnolípidos crudos o purificados, según el caso. Como control se utilizó agua destilada. Se observaron los resultados (remoción de los hidrocarburos y formación de emulsiones) cada 30 minutos durante 24 horas de incubación a una temperatura de 30 °C, en agitación relativamente suave (150 rpm) (6,17).

Determinación del porcentaje de remoción de los hidrocarburos

Se utilizó una técnica gravimétrica modificada en trabajos realizados con lodos aceitosos de perforación (6). Los hidrocarburos que emulsionaron en la parte superior en el sistema de lavado, fueron decantados. La grava que sedimentó y quedó en los recipientes, se lavó con varias porciones sucesivas de agua destilada hasta un volumen total de 200 ml para recuperar la emulsión remanente. La grava húmeda, lavada de esta manera, se filtró al vacío en membranas de filtro MFS número 2 (Advantec MFS, Inc.) de 5,5 cm de diámetro contenidas en embudos de polietileno (Sciencewere). Estos embudos permiten despres-

der la parte superior de los mismos con las membranas de filtro, los cuales se secaron hasta peso constante en la estufa a 40 °C durante 24 horas. Se determinó así el peso de la grava recuperada proveniente tanto de los tratamientos con las soluciones de ramnolípido como la de los controles (tratada con agua destilada). La pérdida de peso como consecuencia de la desorción y emulsificación de los hidrocarburos se expresó como porcentaje de remoción. Las lecturas se realizaron por triplicado para cada muestra con el objetivo de asegurar la precisión de las medidas y cada experiencia fue repetida, a su vez, 3 veces para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

Análisis de la grava tratada con las soluciones de ramnolípido

Muestras de un gramo tanto de las gravas previamente tratadas con las soluciones de ramnolípido como de las no tratadas, fueron lavadas con 5 ml de diclorometano grado analítico. Se agitó fuertemente la muestra en embudos de separación y se recuperaron las fases orgánicas en pequeñas fiolas. El diclorometano se evaporó con ayuda de una plancha térmica calentando las fiolas suavemente y pasando una corriente de aire. Los posibles hidrocarburos remanentes, obtenidos al evaporar el diclorometano, se resuspendieron en 5 ml de n-hexano grado analítico como solvente para los análisis de **UV**, mientras que para los análisis de espectroscopía **IRTF** se utilizó como solvente 2 ml etil-acetato grado **HPLC**. Se tomaron muestras de 100 μL del resuspendido con n-hexano para diluirlas con 2000 μL del mismo solvente con la finalidad de poder realizar las medidas de absorbancia desde 200 hasta 400 nm para el caso de los análisis **UV**.

Identificación de las cepas estudiadas mediante técnicas moleculares

El ADN bacteriano fue extraído y purificado mediante el kit y protocolo de extracción de Wizard Genomic (Promega). Se utilizó para tal fin 1,5 ml de cultivo en caldo nutritivo de cada cepa. Se centrifugaron

a 4000 x g durante 5 minutos para obtener las células. Una vez extraído el ADN genómico, se procedió a amplificar la secuencia parcial del ADNr 16S mediante la PCR utilizando los cebadores universales P1: CCT ACG GGA GGC AGC AG y P2: ATT ACC GCG GCT GCT GG específicos para bacterias (18). La electroforesis se realizó en geles de 1% para el ADN genómico y de 1,5% para los amplicones. Para realizar la identificación microbiana, las secuencias parciales obtenidas a partir del ADNr 16S de cada muestra, se compararon con las bases de datos universales del GenBank mediante Blastn (NCBI). Las relaciones filogenéticas de las secuencias nucleotídicas se realizaron alineándolas con *ClustalW* y con análisis *Neighbor-joining* a través de Mega 4.0.

Resultados y discusión

Producción de los ramnolípido

Los resultados obtenidos mediante los métodos de *oil spreading* y de la formación del complejo ramnolípido/azul de metileno, nos indicaron que todas las cepas estudiadas tuvieron capacidad para producir biosurfactantes. Mediante la técnica de *oil spreading* se determinó que la cepa que produjo mayor cantidad relativa de biosurfactantes fue la denominada BIOMI-E5, con un incremento de halo de 1094,56 % \pm 40,46 con respecto al control. El resto de las cepas produjeron halos de 543,78% \pm 35,04, 329,18% \pm 0 y de 60% \pm 17,52 para Alq14, Alq8 y Alq9 respectivamente. Pudimos también registrar la formación de los complejos ramnolípido/azul de metileno en forma de precipitados evidentes y visibles de color azul intenso directamente en las soluciones de ramnolípido crudos provenientes de todas las cepas estudiadas, sin la necesidad de utilizar placas de cultivo. A medida que se formaba el precipitado de color azul intenso, disminuía la coloración del sobrenadante hasta un azul pálido en algunos casos e incoloro, en otros. Tal como lo señala la bibliografía, estos pre-

precipitados corresponden a una reacción específica entre el complejo catiónico CTAB-azul de metileno y los ramnolípidos que son glicolípidos aniónicos (15,2). No se registró la formación del precipitado azul en los controles constituidos con medio MMS y glicerol sin inocular, agua destilada o solución de ácido fenilsulfónico (surfactante químico).

Purificación de los ramnolípidos producidos por la cepa de *P. aeruginosa* BIOMI-E5

Como consecuencia de los resultados obtenidos en los ensayos anteriores donde se evidencia que la cepa que produjo halos de mayor tamaño en las pruebas de *oil spreading* fue la denominada BIOMI-E5, se decidió realizar los estudios posteriores de purificación y de análisis con los ramnolípidos producidos por esta cepa. La formación de halos de mayor tamaño es indicativo de una mayor concentración de biosurfactantes en las soluciones de ramnolípidos crudos. La producción de ramnolípidos por la cepa BIOMI-E5, bajo condiciones no optimizadas y determinadas mediante las pruebas gravimétricas, fue de 240 mg/L. Este valor representó la media de 3 medidas con una desviación estándar de 0,374 y un intervalo de confianza del 95% con valor de 0,897. Por otro lado, los espectros **IRTF** de los ramnolípidos purificados analizadas desde los 450 hasta 4000 cm^{-1} (figura 1) concordaron con la huella espectral característica de los ramnolípidos producidos por la cepa BIOMI-E5 reportados en trabajo anteriores (13) y se correspondió muy bien con los publicados para otras cepas de *P. aeruginosa* (19,15).

Determinación del porcentaje de remoción de los hidrocarburos

Se registró un porcentaje de remoción de hidrocarburos del 101,16 % \pm 2,88 utilizando los ramnolípidos crudos provenientes de cultivos con *P. aeruginosa* BIOMI-E5 y de 26,66% \pm 2,88 para el control (agua destilada). Se observó, además, que las gravas

tratadas recuperaron su color blanquecino característico y los hidrocarburos fueron totalmente emulsionados. Para el resto de las cepas los valores de remoción de los hidrocarburos estuvieron entre 85,8% \pm 1,44 y 94,83% \pm 0,28 para BIOMI-Alq8 y BIOMI-Alq14, respectivamente. No se realizó la prueba para la cepa Alq9 ya que produjo un valor bajo de incremento del halo, tal como fue señalado anteriormente. Los análisis estadísticos Anova y la prueba Tukey realizado con el programa SPSS 13.0 para Windows (datos no mostrados) nos indicaron que los valores de remoción para las diferentes cepas son significativos. Los distintos valores de estos resultados se deben, probablemente, a que existen diferencias entre los ramnolípidos producidos por las cepas BIOMI-Alq14 y BIOMI-Alq8 con los producidos por la cepa BIOMI-E5, en cuanto a su balances HLB (hidrofilicos/lipofílicos), tipo de congénere (2) y presencia de insaturaciones, ya que los valores de concentración (200 a 240 mg/L) y CMC (100 a 120 mg) fueron similares para cada cepa.

Análisis de la grava tratada con soluciones de ramnolípidos crudos producidos por *P. aeruginosa* BIOMI-E5

Los análisis mediante espectrometría **UV** realizados a las gravas tratadas con las soluciones de ramnolípidos crudos, provenientes de la cepa *P. aeruginosa*. BIOMI-E5, mostraron una disminución acentuada en los máximos de absorbancia a los 190, 220 y 260 nm que se corresponden a las absorbtividades medias de las fracciones de monoaromáticos, diaromáticos y poliaromáticos respectivamente (20) al compararlos con los del control. Para el caso de los espectros **IRTF** (figura 2) presentaron, contrario a lo esperado, un número mayor de señales que las gravas sin tratamiento (control). Al analizar los grupos funcionales presentes en este espectro (OH, C=O, C-OH y O-C-O) vemos que estos se corresponden con los grupos presentes en el espectro de los ramnolípidos purificados (figura 1), lo cual nos está indi-

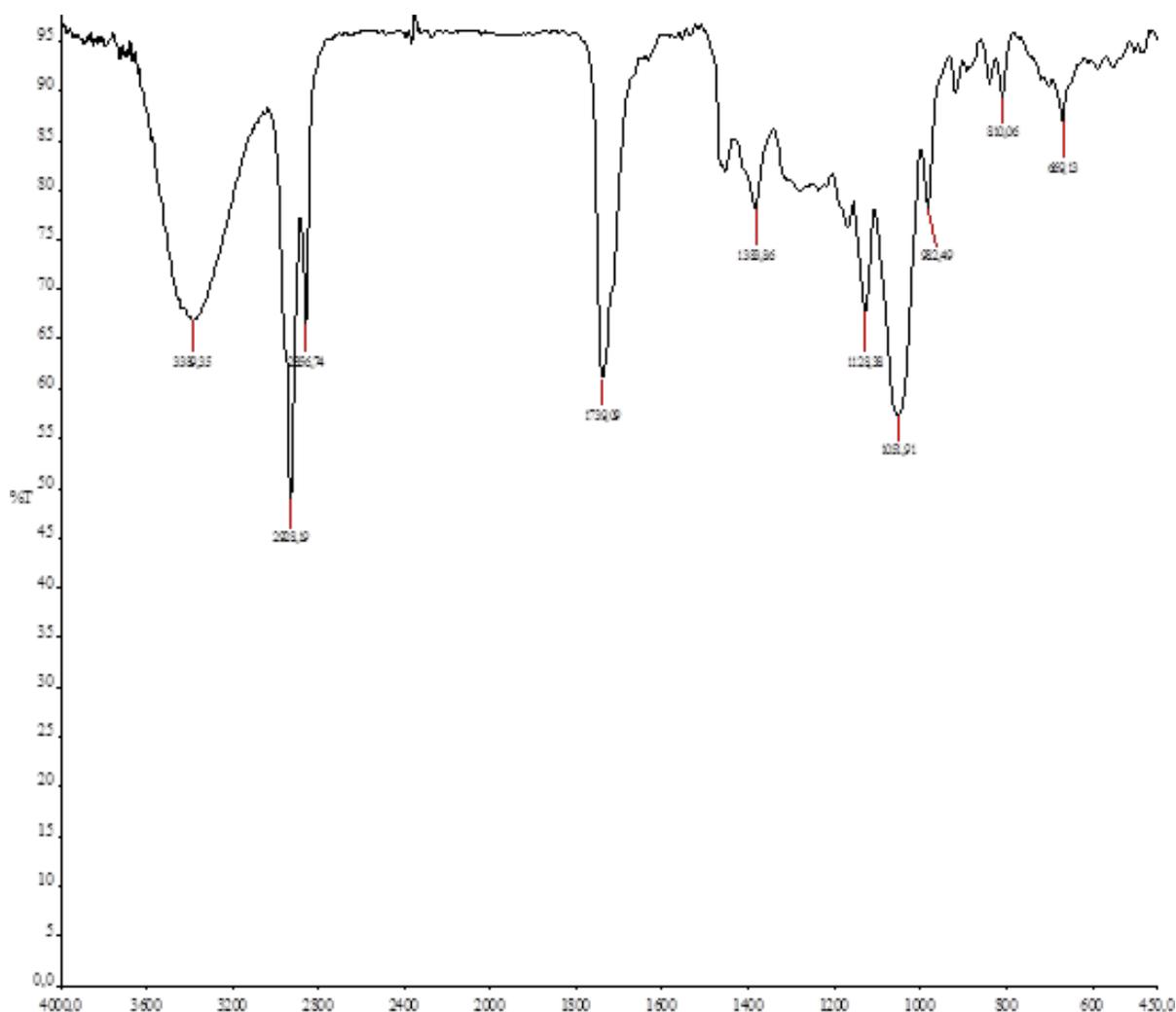


Figura 1. Análisis IRTF de los ramnolípidos purificados producidos por *Pseudomonas aeruginosa* BIOMI-E5. Huella espectral con las señales de los distintos grupos funcionales que conforman la molécula de un ramnolípidos producido por *Pseudomonas aeruginosa* BIOMI-E5. Se muestran las bandas de absorción para los grupos funcionales OH a los 3.389,35 cm^{-1} , las típicas vibraciones C-H para los grupos CH_2 y CH_3 se presentaron a los 2.928,19 y 2.856,74 cm^{-1} , respectivamente. Se apreciaron a continuación las bandas típicas de los grupos C=O de las funciones carbonilos a 1739,09 cm^{-1} . Posteriormente, se registraron las deformaciones C-H a los 1451 y 810,06 cm^{-1} y para los CH_3 a los 982,49 cm^{-1} . Las deformaciones C-O y O-H se registraron a los 1.383,86 cm^{-1} , las bandas simétricas de los enlaces O-C-O a los 1.051,91 cm^{-1} y el estrechamiento de los enlaces C-O a los 1.168 y 1.128,38 cm^{-1} .

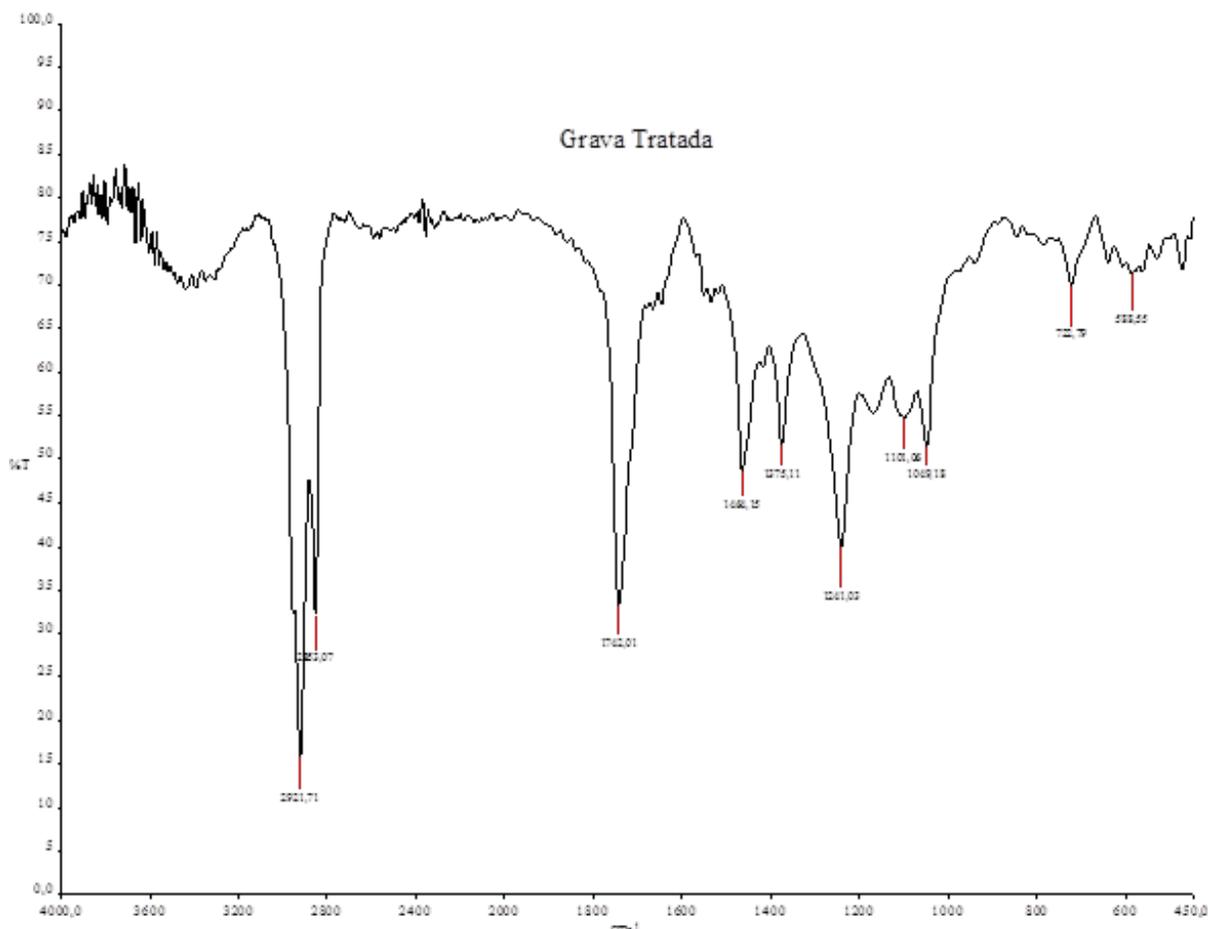


Figura 2. Espectro IRTF de las gravas tratadas con las soluciones de ramnolípidos crudos de *P. aeruginosa* BIOMI-E5. Obsérvese la presencia de los principales grupos funcionales OH (3370,66 cm^{-1}), CH_3 , CH_2 (2921,68 cm^{-1} ; 2853 cm^{-1}), C=O (1742,01 cm^{-1}) y O-C-O (1049,18 cm^{-1}) que se corresponden con los presentes en las moléculas de ramnolípidos.

cando que durante el proceso de remoción, los ramnolípidos quedan adsorbidos en la superficie de la grava desplazando a los hidrocarburos hacia la fase acuosa. Este fenómeno de adsorción también ha sido reportado en suelos contaminados con hidrocarburos poliaromáticos que fueron tratados con 5 g/L de ramnolípidos producidos por la cepa *Pseudomonas aeruginosa* UG2 (21).

Tanto los resultados de los análisis **UV** como los de **IRTF** nos permitieron concluir, al compararlos con los controles, que los ramnolípidos crudos fueron capaces de re-

mover la fracción de hidrocarburos aromáticos y hay que resaltar su capacidad en la remoción de los asfaltenos, ya que se utilizó petróleo pesado Cerro Negro en el estudio, el cual tiene una concentración de 5,1 % de estas macromoléculas aromáticas (**16**). Por lo tanto, la mezcla de hidrocarburos utilizada tendría una concentración final de asfaltenos de 1,02 %. No pudimos comparar las señales correspondientes a los hidrocarburos saturados mediante **IRTF** debido a que sus señales se solaparon con las de los ramnolípidos adsorbidos en la grava tratada.

Determinación del porcentaje de remoción de los hidrocarburos utilizando soluciones de ramnolípidos purificados

No se lograron remover los hidrocarburos de las gravas ni tampoco producir las emulsiones cuando se utilizaron los ramnolípidos purificados. Los valores de remoción fueron de 1,16%, 0% y 15% para las soluciones de ramnolípidos purificados a pH 6,7; 9,4 y para el agua, respectivamente. Los valores representan la media de 3 medidas con una desviación estándar que varió de 0,047 a 0,309 y el intervalo de confianza del 95% varió de 0,064 a 0,74 para las diferentes experiencias realizadas. Solo al utilizar soluciones de ramnolípidos purificados, pero concentrados a 960 mg/L en buffer bicarbonato de sodio 0,1 M a pH 9,4, se logró aumentar el porcentaje de remoción de hidrocarburos a 78%.

Dado que los cultivos estudiados presentaron valores finales de pH desde 5,8 hasta 6,8 dependiendo de la cepa, procedimos a determinar si era el pH el factor que condujo a mejorar la remoción de los hidrocarburos de las gravas en estudio, para lo cual se procedió a acidificar hasta pH 5 con HCL 1M las muestras de ramnolípidos purificados que estaban a pH 9,4 y las muestras de ramnolípidos crudos que estaban a pH 5,8 fueron ajustadas hasta un pH de 6,8 con solución de bicarbonato de sodio 0,1 M. Posteriormente, se determinaron los porcentajes de remoción de hidrocarburos. Obtuvimos como resultados que los ramnolípidos purificados al ajustarles el pH a 5 fueron capaces, esta vez, de remover el 100% de los hidrocarburos adheridos a la grava cuando fueron sometidos a las condiciones descritas anteriormente. Por el contrario, los ramnolípidos crudos, que fueron capaces de remover el 100% de los hidrocarburos adheridos a la grava anteriormente, perdieron sus capacidades al ajustarles el pH hasta un valor de 6,8.

Los resultados muestran claramente que las soluciones de ramnolípidos con valores de pH por encima de 5,8 no tienen capacidad para remover el 100% de los hi-

drocarburos del sistema modelo en estudio. Deben de existir en las soluciones de ramnolípidos crudos metabolitos ácidos que mejoran la remoción de los hidrocarburos. Se ha encontrado que la solubilidad aparente del fenantreno fue 3,8 veces más grande a pH 5,5 que a pH 7 en presencia de 240 ppm de ramnolípidos. Los autores señalan que tales resultados son probablemente debido a que los ramnolípidos forman diferentes estructuras micelares pH-dependientes por ser surfactantes iónicos (22). Esto explicaría los resultados obtenidos con los ramnolípidos crudos a pH 5,8, en el sentido de que tendrían una estructura micelar con mejores propiedades detergentes que a valores de pH por encima de 6,8 la cual permite remover el 100% de los hidrocarburos adheridos a la grava (figura 3). Sin embargo, no se puede descartar la acción directa de los metabolitos sobre los componentes de la grava. Los minerales y metales, así como las calcitas, que constituyen las gravas reaccionarían con los metabolitos ácidos sobre la superficie de la grava mejorando su porosidad y permeabilidad (3,23,24). Tal reacción, facilitaría la adsorción de los ramnolípidos sobre la superficie de las gravas, removiendo y desplazando así, a los hidrocarburos (tabla 1).

Identificación de las cepas estudiadas mediante amplificación por PCR del gen ADNr 16S y su posterior secuenciación

El resultado del Blastn en el NCBI (25) nos reveló un porcentaje de identidad de 99, 92, 96 y 96 % para las cepas BIOMI-E5, BIOMI-Alq8, BIOMI-Alq9 y BIOMI-Alq14, con las cepas *Pseudomonas aeruginosa* NRRL B-14935, *Pseudomonas aeruginosa* SJ-3 clon 1, *Pseudomonas sp.* CINBIN-A040-2 y *Pseudomonas sp.* 47, respectivamente. El árbol filogenético generados con *Neighbor-joining* (figura 4) nos muestra las relaciones existentes entre las secuencia del ADNr 16S de las cepas estudiadas con las secuencias obtenidas del GenBank, que corresponden a otras cepas de *Pseudomonas*, formando un grupo muy homogéneo con la excepción de la cepa



Figura 3. Remoción de los hidrocarburos. Tres muestras de gravas que habían sido contaminadas con hidrocarburos fueron tratadas con soluciones de ramnolípidos crudos provenientes de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* BIOMI-E5. Obsérvese la recuperación del color original de las gravas. A la derecha: grava tratada solo con agua destilada (control). Obsérvese la presencia de color negro debido a la presencia de los hidrocarburos no removidos.

Tabla 1
Porcentajes de remoción de los hidrocarburos a diferentes valores de pH

Muestras	pH	% de remoción
RC	5,8	101,16 ± 2,89
RC	6,8	0,00 ± 0,210
RP	6,8	1,16 ± 0,047
RP	9,4	0,00 ± 0,309
RP	5,0	100,00 ± 3,02
Agua destilada (control)	nd	26,66 ± 2,36

RC: ramnolípidos crudos obtenidos a partir de la cepa BIOMI-E5. RP: ramnolípidos purificados obtenidos a partir de la cepa BIOMI-E5. Agua destilada como control con pH no ajustado. nd: no determinado.

BIOMI-Alq14, que se presenta como la más alejada del grupo, cuando se compara con la secuencia de la cepa patrón *Serratia marcescens* BIOMI-Ro. Los resultados obtenidos nos permitieron demostrar, por un lado, que las cepas utilizadas en el presente estudio pertenecen a la especie *Pseudomonas aeruginosa* y por otro lado, que son cepas distintas entre sí. Estos resultados permitieron complementar los obtenidos previamente mediante pruebas bioquímicas y con galerías API (Biomérieux) (10,11).

Conclusiones

Las soluciones de ramnolípidos crudos son más eficientes que las soluciones de ramnolípidos purificados en la remoción de la mezcla de hidrocarburo en el sistema modelo estudiado. Esta mejora de la eficiencia en la remoción de los hidrocarburos se debió a la acidificación (pH de 5,8) de las soluciones de ramnolípidos crudos. Lo cual nos hace pensar que existen metabolitos ácidos que se producen conjuntamente con los ramnolípidos y que favorecen, de alguna manera, los

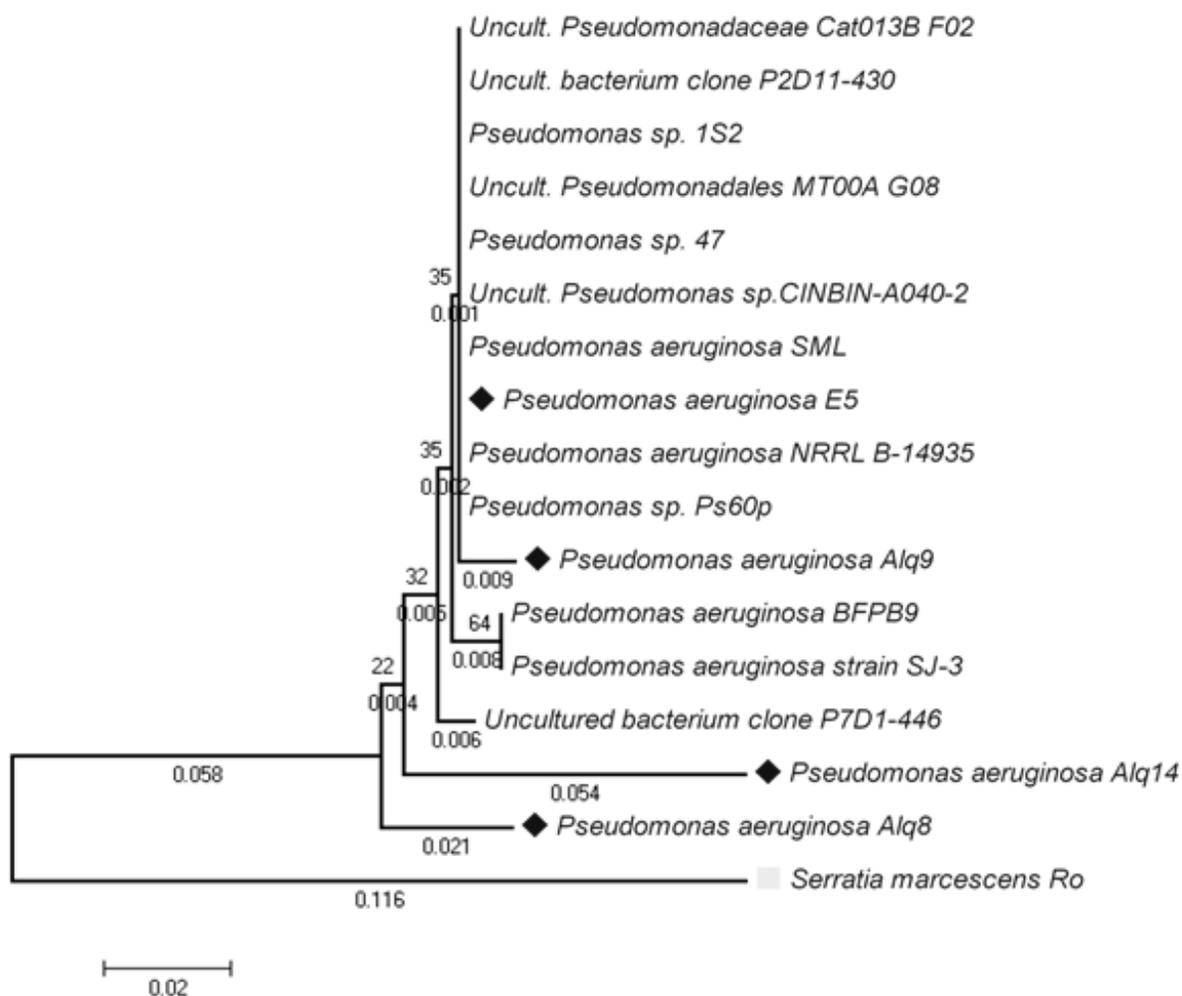


Figura 4. Árbol filogenético de las cepas estudiadas generado mediante Neighbor-joining. Las relaciones filogenéticas de las secuencias nucleotídicas fueron hechas alineándolas con ClustalW desde archivos Multifasta utilizando BioEdit y con análisis Neighbor-joining a través de Mega 4.0. El árbol fue generado utilizando el modelo p-distance con 500 bootstrap. Las cepas señaladas con los diamantes negros corresponden a las estudiadas en el presente trabajo. *Serratia marcescens* Ro, cepa control. Los valores señalados encima de las ramas representan los obtenidos del bootstrap y los señalados en la parte inferior corresponden a las distancias filogenéticas.

procesos de remoción y emulsificación. Evidentemente, se necesitan estudios posteriores en este sentido para determinar la causa. Durante el proceso de remoción los ramnolípidos quedan adsorbidos sobre la grava por lo que se produce un desplazamiento de los hidrocarburos adsorbidos. Los resultados de los estudios realizados con **UV** y **IRTF** nos muestran que las soluciones de ramno-

lípidos crudos son capaces de remover las fracciones aromáticas adsorbidas en la grava. Las soluciones de ramnolípidos crudos presentaron propiedades tanto tensoactivas como esmulsionantes. Dado que, las soluciones mantienen su pH y sus propiedades tensoactivas a temperaturas de, por lo menos, 121°C y presiones de 15 libras, podrían ser muy útiles también en los procesos de esti-

mulación de pozos durante la recuperación terciaria del petróleo. El ahorro en los procesos costosos de purificación de los ramnolípidos hace económicamente viable la producción de estas soluciones de ramnolípidos crudos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CDCHTA de la Universidad de Los Andes por el soporte financiero al presente trabajo mediante el proyecto CDCHTA C-1320.95-03-B.

Referencias bibliográficas

- FRANZETTI A., TAMBURINI E., BANAT I. M., BIOSURFACTANTS. **Applications of biological surface active compounds in remediation technologies**. Ramkrishna Sen, Springer, New York, USA, 1-14, 2008.
- PERFUMO A., BANAT I. M., CANGANELLA F., MARCHANT R. **Appl Microbiol Biotechnol** 72:132-138, 2006.
- RAIGER L. J., LÓPEZ N. I., **Revista Química Viva** 3:146-161, 2009.
- ABDEL-MAWGOUD A., LÉPINE F., DÉZIEL E. **Appl Microbiol Biotechnol** 86:1323-1336, 2010.
- REIS R. S., PEREIRA A. G., NEVES B. C., FREIRE D. M. G. **Bioresour Technol** 102:6377- 6384, 2011.
- Yan P, Lu M., Guan Y., Zhang W., Zhang Z., **Bioresour Technol** 102:10252- 10259, 2011.
- HELMY Q., KARDENA E., NURACHMAN Z., WISJNUPRAPTO. **Inter J Civil Environm Engineer IJCEE** 10(01): 7-14, 2010.
- ESCHBACH M., SCHREIBER K., TRUNK K., BUER J., JAHN D., SCHOBERT M. **J Bacteriol** 186(14):4596- 4604, 2004.
- PIERSON III L. S., PIERSON E. A. **Appl Microbiol Biotechnol** 86:1659- 1670, 2010.
- ROJAS J. O., MORENO S., RONDÓN M., **CIENCIA** 13(1), 23-33, 2005.
- CABALLERO C. Biodegradación de petróleo e hidrocarburos por bacterias aisladas del campo La Alquitrana, Estado Táchira. (Para obtener el título de Magister Scientiae en Biotecnología de Microorganismos). Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida (Venezuela) pp. 94, 2003.
- MONTICELLO D. J., BAKKER D., FINNERTY W. R. **Appl Environ Microbiol** 49 (4):756-760, 1985.
- Sulbarán M. M., Bahsas A., Velásquez W., Rojas J. O. **CIENCIA**, 13 (2):228-239, 2005.
- YOUSSEF N. H., DUNCAN K. E., NAGLE D. P., SAVAGE K. N., KNAPP R. **J Microbiol Methods** 56(3) 339-347, 2004.
- HEYD M., KOHNERT A., TAN T. H., NUSSER M., KIRSCHHÖFER F., BRENNER-WEISS G., Franzreb M., Berensmeier S. **Anal Bioanal Chem** 391: 1579-1590, 2008.
- RIVAS H., GUTIERREZ X., SILVA F., CHIRINOS M. **ACV** 54(3): 216-234 2003.
- URUM K., GRIGSON S., PEKDEMIR T., MC-MENAMY S. **Chemosphere** 62(9): 1403-1410, 2006.
- MUYZER G., DE WAAL E. C., UITTERLINDEN A. G., **Appl Environ Microbiol** 59 (3): 695-700, 1993.
- RIKALOVIC M. G., GOJGIC-CVIJOVIC G., VRVIC M., KARADZIC I. **J Serb Chem Soc** 77 (1) 27-42 2012.
- WAUQUIER J. P., **El refinado del petróleo. Producto crudo Productos petrolíferos. Esquema de fabricación**. Technip, Paris (Francia), 53-55, 1994.
- VAN DYKE M. I., GULLEY S. L., LEE H., TREVORS J. T. **J Ind Microbiol** 11: 163-170, 1993.
- SHIN K. H., KIM K. W., SEAGREN E. A. **Appl Microbiol Biotechnol** 65:336- 343, 2004.
- AL-SULAIMANI H., JOSHI S., AL-WAHAIBI Y., AL-BAHRY S., ELSHAFIE A., AL-BEMANI A., **Biotechnol Bioinf Bioeng** 1(2): 147-158, 2011.
- LAZAR I., PETRISOR I. G., YEN T. E., **Petrol Sci Technol** 25: 1353-1366, 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Fecha de consulta 11/01/15
- NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Fecha de consulta 11/01/15.