

# Biodegradación de gasoil rango Diesel por un cultivo mixto de bacterias

**Julio Otoniel Rojas\***, **Sylenne A. Moreno M.** y **Marisol C. Rondón Rivas**

Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos Sixto David Rojo. Departamento de Biología,  
Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Recibido: 31-03-04 Aceptado: 15-02-05

## Resumen

En el presente trabajo se estudió la degradación de gasoil de PDV rango *diesel* por un cultivo mixto constituido por una mezcla de tres cepas de *Pseudomonas*. Estas fueron aisladas de muestras de emulsiones de petróleo pesado en agua y de cultivos de enriquecimiento preparados con parafina líquida mezclada con dibenzotiofeno como única fuente de azufre, carbono y energía. Los productos originados por la población primaria durante su crecimiento en gasoil fueron analizados mediante: cromatografía de capa fina de gel de sílice, espectrofotometría UV-visible y por cromatografía de gases. Se seleccionaron las poblaciones secundarias que degradan a estos compuestos y evitan su acumulación en el medio de cultivo. El cultivo mixto bacteriano capaz de degradar una mezcla de dibenzotiofeno en parafina líquida también pudo degradar gasoil rango *diesel*. La actividad del cultivo mixto bacteriano fue mejorada al intercalar periodos de incubación aeróbicos y anaeróbicos y se mantuvo con cerca del 30% de la concentración de O<sub>2</sub> atmosférico, sugiriendo un proceso de metabolismo anaeróbico. También se encontró que las moléculas de asfaltenos disueltas en gasoil no inhibieron la actividad del cultivo mixto bacteriano. Se discute la estrategia de utilización de cultivos mixtos de microorganismos en procesos de degradación de hidrocarburos en el ambiente.

**Palabras clave:** Biodegradación; cultivos mixtos; gasoil; *Pseudomonas*.

## Biodegradation of diesel fuel by a bacterial mixed culture

### Abstract

In the present work we studied the diesel fuel biodegradation by a bacterial mixed culture constituted with three *Pseudomonas* strains. They were isolated from heavy crude oil in water emulsions and from enrichment cultures prepared with liquid paraffin and dibenzothiophene as sole carbon, sulfur and energy source. The products originated by the primary bacterial population were analyze by: Thin layer chromatography, UV-visible spectrophotometry and gas chromatography. Selected secondary population was able to biodegrades those compounds, avoiding their accumulation in the media. The bacterial mixed cultures able to biodegrade dibenzothiophene dissolved in liquid paraffin could also biodegrade diesel fuel PDV. The metabolic activity was enhanced when the cultures were incubated in aerobic conditions intercalated with anaerobic periods. We also found that the asphaltenes dissolved in the diesel fuel did not

Autor para la correspondencia. Teléfonos: 0274 2401309, Fax: 0274 2401286, E-mail: oroja@ula.ve

inhibit the catabolic activity of the bacterial mixed cultures. We discuss the strategies of using microbial mixed cultures in hydrocarbon biodegradation process in the environment.

**Key words:** Biodegradation; gasoil; mixed cultures; Pseudomonas.

## Introducción

Una de las funciones principales de los microorganismos en el medio ambiente es mineralizar la materia orgánica en los grandes ciclos del nitrógeno, carbono y azufre, entre otros. Desde hace tiempo se ha utilizado esta capacidad degradativa de ciertos grupos microbianos para eliminar hidrocarburos derivados del petróleo cuando entran en contacto con el medio ambiente (1).

En el presente, los métodos legalmente aceptables para la disposición de los desechos de refinería, clasificados como peligrosos, son la incineración, inyección en pozos profundos, enterramiento en rellenos de seguridad química y el tratamiento de terrenos llamados *landfarming*. Este último proceso usa la actividad de microorganismos para degradar o inmovilizar los desechos peligrosos. Los compuestos orgánicos son convertidos en minerales y humus, en tanto que los metales precipitan o se adsorben (2).

En nuestro país se han realizado estudios sobre biodegradación de lodos petrolizados de refinación y otros desechos orgánicos (85% de la industria petrolera). Se han empleado para tal fin la técnica de *landfarming* y de tratamiento en biorreactores. En algunos casos se ha inoculado el ambiente con microorganismos y para aumentar la biodisponibilidad del sustrato se ha usado agentes tensoactivos de origen microbiano (3). Más recientemente PDVSA Intevp ha desarrollado una tecnología registrada como INTEBIOS que permite tratar desechos de la industria petrolera susceptibles de ser biodegradados ya que, entre otras propiedades, ayuda a estimular el metabolismo de la microflora autóctona (4).

La biodegradación de hidrocarburos del petróleo y de mezclas complejas es llevada a

cabo en la naturaleza por sucesiones microbianas. Generalmente una sola especie microbiana no posee la capacidad de mineralizar un determinado compuesto. La mayoría de los microorganismos metabolizan los hidrocarburos hasta compuestos parcialmente oxidados que se acumulan en el ambiente (2, 5-9). Otras poblaciones microbianas se desarrollan a expensas de estos compuestos parcialmente oxidados y producen, por último, dióxido de carbono y agua.

Por otro lado, la capacidad de una especie microbiana para degradar diferentes hidrocarburos (alifáticos, aromáticos, resinas, entre otros) es también limitada. La mayoría de los microorganismos se especializan en degradar una sola familia de hidrocarburos, si bien algunos poseen enzimas para degradar tanto alifáticos como aromáticos (10, 11).

En tal sentido, hay que tener en cuenta que en la eliminación eficiente de los hidrocarburos del petróleo, tratándose de un compuesto, de una mezcla compleja o de crudo mismo, se requieren más de una especie microbiana con capacidad de degradar cada uno de los contaminantes iniciales. A estas últimas las hemos denominado poblaciones primarias, siendo además necesaria la presencia de poblaciones secundarias que digieran los productos del metabolismo anterior para evitar su acumulación en el ambiente. Cuando éstos se acumulan, se produce inhibición del metabolismo de los hidrocarburos y, como consecuencia, el porcentaje de biodegradación disminuye.

Por las razones explicadas anteriormente se planteó en el presente trabajo como objetivo general determinar si un cultivo mixto de bacterias formado con cepas utilizadas en un trabajo anterior para degradar dibenzotiofeno disuelto en parafina li-

quida (12), pudiese mejorar la degradación de una mezcla más compleja de hidrocarburos como lo es el gasoil rango *diesel* para automóviles. Se estudia, también, el efecto que pueda tener los asfaltenos en la biodegradación del gasoil.

## Materiales y métodos

### Reactivos

Los reactivos se obtuvieron de las siguientes casas comerciales:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  p. a. de Merck,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  99,9% Baker Analyzed,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ISO ph eur de Scharlau,  $\text{MgSO}_4$  99% de Cer- Diagnósticos,  $\text{CaCl}_2$ , Sigma,  $\text{FeSO}_4$  Merck y extracto de levadura de Sigma, placas de gel de sílice tipo GF, 10 - 40 micras de Sigma con indicador fluorescente, placas Alugram sil G/UV254 con indicador fluorescente de Macherey-Nagel, Sílica Gel G sin indicador fluorescente de Fisher Scientific Company, Gasoil rango *diesel* para automóviles de PDV, otros reactivos de grado proanálisis.

### Microorganismos

Se utilizaron en el presente trabajo las cepas *Pseudomonas aeruginosa* BIOMI-E5, *Pseudomonas* BIOMI-E3 y *Pseudomonas* BIOMI-HPA2, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos Sixto David Rojo de la Universidad de Los Andes. Estas fueron aisladas a partir de muestras de emulsiones de crudo pesado en agua y de muestras de petróleo Morichal enviadas por PDVSA-INTEVEP.

### Biodegradación del gasoil por la población primaria

Para producir los metabolitos de la población primaria se prepararon cultivos con la cepa *Pseudomonas* BIOMI-HPA2 en matraces de 125 ml con 50 ml de medio salino de Mormile y Atlas (MS) de la siguiente composición en gramos por litro de agua destilada:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  4 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g;  $\text{MgSO}_4$  0,2 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  1 mg;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mg; extracto de levadura 0,25 g (13). Como

sustrato se utilizó 5% de gasoil rango diesel automotor (PDV). Los frascos se obturaron con tapones de gasa y algodón, se incubaron bajo agitación, durante 6 días a una temperatura promedio de  $30^\circ\text{C} \pm 1$ , en la oscuridad para evitar posibles reacciones fotoquímicas de los productos. Los inóculos consistían de 100 microlitros de preinóculos preparados en caldo nutritivo con la cepa de estudio e incubados bajo las mismas condiciones durante 24 ó 48 horas hasta una densidad óptica de 0,3.

### Biodegradación de los productos derivados del metabolismo del gasoil por las poblaciones secundarias

Transcurridos los 6 días de incubación de los cultivos con la cepa *Pseudomonas* BIOMI-HPA2, se determinó el crecimiento por medio del incremento de turbidez (densidad óptica) en el medio de cultivo y se hizo un registro de los cambios de colores en la fase acuosa y oleosa.

A continuación, se agregó a cada cultivo 20 ml del medio salino estéril descrito anteriormente (MS) y se inoculó, unos con la cepa *Pseudomonas aeruginosa* BIOMI-E5 y otros con la *Pseudomonas* BIOMI-E3, con la finalidad de estudiar su efecto sobre los metabolitos originados durante el crecimiento de la cepa *Pseudomonas* BIOMI-HPA2 en gasoil. Los controles se hicieron con los cultivos de 6 días más 20 ml del medio salino estéril sin las cepas anteriores. También se realizaron cultivos con la cepa *Pseudomonas* BIOMI-HPA2 pero utilizando como sustrato glucosa, en vez de gasoil. Otros controles estaban formados por cultivos que no contenían gasoil y por último, medio salino MS con gasoil sin inocular. Se inoculó cada cultivo de la misma forma que los anteriores (población primaria) y fueron incubados durante 15 días a  $30^\circ\text{C}$ , en agitación y en la oscuridad. Cada cultivo se preparó en replicas de 3 para sus análisis.

Después de 15 días de incubación se retiraron los cultivos y se esterilizaron a  $121^\circ\text{C}$  durante 10 minutos para romper las

emulsiones e inactivar las células. Se dejaron en reposo durante una hora y a continuación se tomaron 15 ml de las fases acuosas de cada cultivo y se procedió a extraer los posibles metabolitos según el método modificado de Monticello y col, 1985 (14). Para lo cual se acidificaron 13 ml de las fases acuosas de cada cultivo con una solución de HCL hasta pH 3. En un embudo de separación se realizaron dos extracciones con 20 ml de cloroformo. Después de separarse la emulsión, se colectó la fase orgánica conteniendo el cloroformo y se descartaron las fases acuosas remanentes. Estas fases orgánicas se concentraron en un rota vapor a 30°C y se guardó a -20°C para su posterior análisis. A estas muestras las denominamos fases H. También, se guardaron muestras de las fases acuosas iniciales sin acidificar (2 ml remanente de cada cultivo) en las mismas condiciones; a estas muestras las denominamos fases A.

A continuación, se extrajo el sustrato remanente (gasoil no biodegradado) de cada uno de los cultivos. Para lo cual se empleó la metodología de Hug y Fisher (15). Se realizaron extracciones de cada muestra con pentano en embudos de separación. Las fases orgánicas, así obtenidas, se concentraron en un rota vapor a 30°C, las llamamos fases O y se guardaron en pequeños frascos de vidrio con tapones de goma a -20°C hasta su posterior análisis.

### Procedimientos analíticos

Con la finalidad de detectar los metabolitos que se acumulan durante la biodegradación del gasoil por la población primaria y verificar si éstos son utilizados como sustrato por las poblaciones secundarias se emplearon las siguientes técnicas: Se analizaron las muestras de las fases A, H y O provenientes de cada cultivo mediante: Espectrofotometría UV-visible en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo lambda 11 y en un Spectronic 20 D Milton Roy Company; Mediante Cromatografía en capa fina con gel

de sílice (TLC) y por cromatografía de gases en columna empacadas.

Para realizar las cromatografías en capa fina las muestras de las fases A y H se corrieron en el solvente etanol-agua-hidróxido de amonio 20:15:1 según Moticello y col, 1985 (14). Las muestras de las fases O, se corrieron en el solvente cloroformo-acetona 80:20 (14). Todas las placas fueron reveladas mediante iluminación con una lámpara ultravioleta.

En cuanto a las condiciones de las corridas cromatográficas, éstas se realizaron en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer provisto con un detector de conductividad térmica (TCD). Las muestras fueron inyectadas directamente en columna de acero inoxidable de 2 mts por 1/8 ", empacada con Cromosorb 102 80/100. El análisis se realizó bajo condiciones isotérmicas con un flujo de nitrógeno de 20 ml/min. El inyector, el horno y el detector fueron mantenidos a 225, 200 y 250°C, respectivamente.

### Biodegradación del gasoil por el cultivo mixto de bacterias

Estos ensayos se realizaron en matraces de 250 mL con 50 mL de medio MS y gasoil como sustrato a una concentración de 5% v/v. Estos matraces se taparon con tapones de goma # 6 por el cual se pasó un tubo de vidrio en forma de L. El tubo en su extremo exterior se cerró con una pequeña manguera de látex natural la cual servía para tomar las muestras de la fase gaseosa con ayuda de una jeringa Hamilton para gas-liquido de 10 microlitros. Se inocularon los matraces con 100 microlitros de preinóculos de cada una de las cepas *Pseudomonas aeruginosa* BIOMI-E5, *Pseudomonas* BIOMI-E3 y *Pseudomonas* BIOMI-HPA2 para formar el cultivo mixto de bacterias. Los preinóculos fueron preparados en el medio MS con gasoil al 5% como sustrato, e incubados a 30 °C ± 1, en agitación, durante

48 horas. Para conocer si el factor limitante del metabolismo es el oxígeno, se destaparon, de manera estéril, los frascos al séptimo día de incubación para permitir el intercambio de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> con la atmósfera. Se cerraron los cultivos nuevamente y se dejaron en incubación durante 24 horas más.

Para realizar el registro de la actividad microbiana se incubaron los cultivos en agitación, a 30 °C ± 1, y se determinó la evolución del CO<sub>2</sub> y del O<sub>2</sub> mediante cromatografía de gases en un cromatógrafo Perkin Elmer provisto con un detector de conductividad térmica (TCD). Las muestras fueron inyectadas directamente en columna de acero inoxidable de 2 m por 1/8 “, empacada con Cromosorb 102 80/100. Las condiciones de corrida fueron de 100, 120 y 150 °C para el inyector, horno y detector (TCD) respectivamente. Se utilizó como fase móvil nitrógeno a 20 mL/min.

#### **Efecto de los asfaltenos en la biodegradación del gasoil por el cultivo mixto de bacterias**

Se preparó una mezcla de gasoil con 20% p/v de asfaltenos. Se agitó fuertemente en un agitador vortex y se dejó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente (28°C ± 2) para precipitar los asfaltenos no disueltos.

Los asfaltenos fueron obtenidos por precipitación con n-heptano (16) a partir de petróleo pesado Cerro Negro. Esta mezcla, de gasoil con asfaltenos, fue utilizada como sustrato para los cultivos a una concentración de 5% v/v. Como control, se incluyeron otros cultivos con gasoil sin asfaltenos como sustrato. En todo caso, los cultivos se hicieron con las 3 cepas señaladas anteriormente e incubadas a las mismas condiciones. Se comparó la tasa de producción de CO<sub>2</sub> y consumo de O<sub>2</sub> mediante su registro por cromatografía de gases bajo las mismas condiciones señaladas anteriormente.

## **Resultados y discusiones**

### **Biodegradación de gasoil por la población primaria y de sus metabolitos por las poblaciones secundarias**

Los resultados muestran que la cepa *Pseudomonas* BIOMI-HPA2 puede crecer en gasoil y producir al cabo de 2 días una coloración amarilla en la fase acuosa. A los 6 días de incubación produjo una coloración ámbar en la fase acuosa y una violeta en el gasoil. Estas coloraciones no se presentaron en los cultivos preparados con glucosa como fuente de carbono, ni tampoco en los cultivos sin fuente de carbono. El control formado por medio MS con gasoil sin inocular, tampoco presentó variación. La presencia de estos compuestos coloreados podría indicar una posible ruta metabólica de los hidrocarburos aromáticos. Tanto el crecimiento como la producción de compuestos coloreados a partir del gasoil podría indicar que la cepa anteriormente señalada puede transformar algunos de los constituyentes del sustrato.

En muestras correspondientes a las fases A, proveniente de los cultivos con la cepa señalada anteriormente, se determinó la presencia de dos máximos de absorbancia a 510 y 460 nm. Luego hay un aumento pronunciado de la absorbancia desde los 440 hasta los 400 nm (Figura 1). En las muestras provenientes de los cultivos preparados con la misma cepa pero que fueron inoculados posteriormente con la cepa *Pseudomonas aeruginosa* BIOMI-E5 o con la *Pseudomonas* BIOMI-E3 los registros de absorbancia antes referidos no fueron detectados y solo se registró un progresivo aumento de absorbancia desde los 440 nm hasta los 340 nm. (Figura 2) En el resto de las muestras controles no se registraron estos valores. Los análisis de los resultados sugieren que los metabolitos que produce la cepa *Pseudomonas* BIOMI-HPA2 durante su crecimiento en gasoil, son biodegradados o biotransfor-

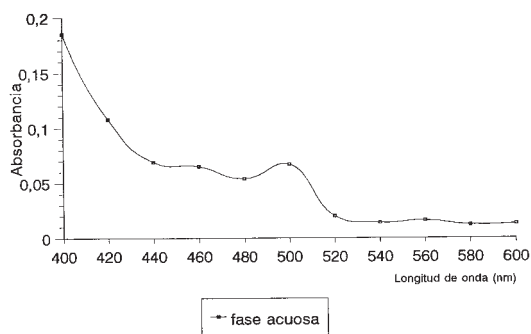


Figura 1. Espectro de absorción de la fase acuosa del cultivo realizado con la cepa *Pseudomonas* BIOMI HPA2. El cultivo fue realizado en medio salino de Mormile y Atlas, 1989 (13) con 5% de gasoil rango *diesel* como sustrato e incubado en agitación a 30°C durante 15 días.

mados por las otras cepas de estudio. Se obtuvieron resultados similares cuando se analizaron las muestras de las Fases H, provenientes de las extracciones realizadas con cloroformo a los mismos cultivos (resultados no mostrados).

El material correspondiente a la fase O, presentó una coloración rojo intenso provenientes de los cultivos preparados con la cepa *Pseudomonas* BIOMI-HPA2; se determinó en las muestras la presencia de un máximo de absorbancia a 510 nm. Este color rojo en la fase oleosa desaparece del cultivo y los espectrofotogramas no registran presencia de compuestos cuando son inoculados con las cepas *Pseudomonas aeruginosa* BIOMI-E5 o con *Pseudomonas* BIOMI-E3. También se registra un nuevo pico de absorbancia a 380 nm. Si estos picos de absorbancia corresponden a metabolitos de la degradación del gasoil, los análisis de los re-

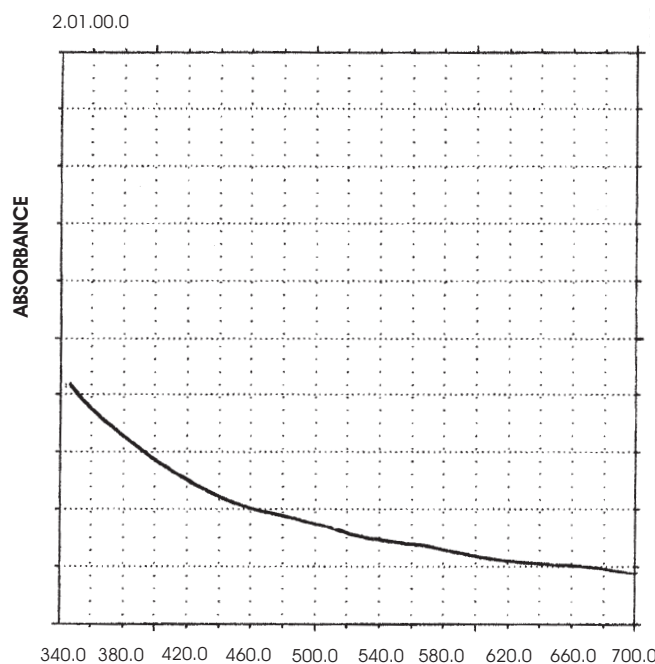


Figura 2. Espectro de absorción de la fase acuosa (fase A) del cultivo mixto realizado con la cepa *Pseudomonas* BIOMI- HPA2 y *Pseudomonas aeruginosa* BIOMI- E5. El cultivo fue realizado en medio salino de Mormile y Atlas, 1989 (13) con 5% de gasoil rango *diesel* como sustrato e incubado en agitación a 30°C durante 15 días.

sultados indican que pueden ser biodegradados directamente en la fase oleosa por estas dos últimas cepas, evitando así su acumulación en los medios de cultivo.

En las muestras de las fases A, proveniente de los cultivos mixtos realizados con la cepa *Pseudomonas* BIOMI-HPA2 y la cepa *Pseudomonas aeruginosa* BIOMI-E5, se logró detectar, mediante las cromatografías de capa fina en placas de gel de sílice sin fluoresceína, una mancha fluorescente de color verde claro con un Rf de 0,51. Esta mancha aparece con un Rf de 0,28 en las placas de gel de sílice con fluoresceína. En las muestras de la fase A provenientes de los otros cultivos no se reveló compuestos. El metabolito en cuestión fue producido copiosamente, detectable directamente en estas fases, sin necesidad de ser extraído y concentrado en fase orgánica (fases H). El método y las condiciones utilizados para la extracción de los metabolitos provenientes de los hidrocarburos, no permitieron extraer este compuesto en las fase orgánicas. Lo más probable es que se trate de una macromolécula muy compleja e hidrosoluble que, por su color verde fluorescente a la luz ultravioleta, podría tratarse de la fluoresceína (17) producida por la cepa *Pseudomonas aeruginosa* BIOMI-E5 al final del cultivo.

En las placas de gel de sílice sin indicador fluorescente, las cuales se desarrollaron las muestras H provenientes de los cultivos realizados con la cepa *Pseudomonas* BIOMI-HPA2 presentaron una mancha fluorescente a la luz ultravioleta con Rf de 0,96. En las placas de gel de sílice con indicador fluorescente posible detectar otra mancha no fluorescente, con Rf de 0,75. Mientras que en los mismos tipos de placas, pero con muestras de la fase H provenientes de los cultivos mixtos de *Pseudomonas* BIOMI-HPA2 la *Pseudomonas* BIOMI- E3 o la *Pseudomonas aeruginosa* BIOMI- E5, no se registraron estas manchas. La separación de los compuestos de las muestras de la fase O no fue posible al migrar con el sistema de solventes utilizado.

Los dos compuestos provenientes de las muestras H fueron separados únicamente de los cultivos formados con la cepa *Pseudomonas* BIOMI-HPA2, cuando el gasoil estaba presente como fuente de carbono. No se detectaron en las muestras de los cultivos con glucosa y en los controles sin inocular. Estos podrían corresponder a los compuestos pigmentados de coloraciones ámbar y violeta registrados en la fase acuosa y oleosa respectivamente, por lo que estos resultados coincidieron con los de los análisis de espectrofotometría. Estos resultados son similares a los obtenidos al sustituir gasoil por dibenzotiofeno (12). Igual como en este sistema tanto la cepa *Pseudomonas* BIOMI- E3 como la *Pseudomonas aeruginosa* BIOMI-E5 pueden degradar los compuestos producidos del metabolismo de la cepa *Pseudomonas* BIOMI HPA2.

#### **Resultados de los análisis de cromatografía de gases**

Análisis de los resultados indican que en las fases acuosas de estos cultivos no ocurre acumulación de productos, por lo menos a altas concentraciones, al no registrarse señales de magnitud (Figura 3). En las muestras de los cultivos inoculadas únicamente con la cepa *Pseudomonas* BIOMI-HPA2 no se registraron los compuestos detectables en los análisis espectrofotométricos y cromatografía de capa fina. Es posible inferir que los puntos de ebullición y pesos moleculares interfirieron con su detección bajo las condiciones de la corrida.

Estos resultados presentan una aproximación preliminar de la eficiencia de los cultivos mixtos, sin embargo no es factible concluir sobre la eliminación de todos los metabolitos en la fase acuosa. Compuestos tipo hidrocarburos poliaromáticos oxidados con punto de ebullición elevado y de ácidos grasos con pesos molecular elevado que al estar presentes en baja concentraciones, no pueden ser detectados bajo las condiciones de corrida cromatográficas utilizadas en el presente trabajo.

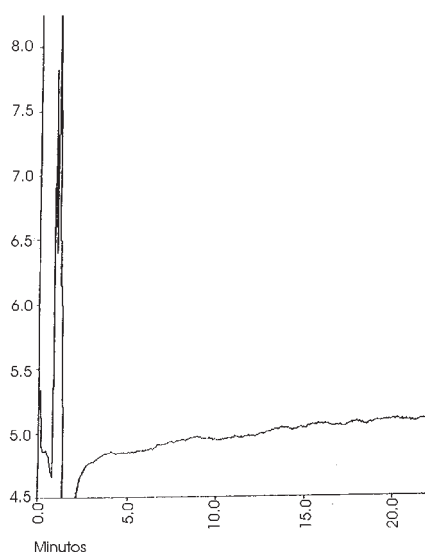


Figura 3. Cromatograma de la fase acuosa del cultivo mixto realizado con la cepa *Pseudomonas* BIOMI HPA2 y *Pseudomonas aeruginosa* BIOMI E5. Las muestras de 0,5 a 1 microlitro se corrieron en una columna empacada de Cromosorb 102 80100. El inyector, columna y detector (TCD) operaron a 225, 200 y 250° C respectivamente. Se utilizó nitrógeno a 20 ml/min como gas portador. Los picos en el cromatograma con señales superiores a 6 mV y de tiempos de retención inferior a 5 minutos, corresponden a impurezas del solvente. El pico inverso corresponde al cloroformo utilizado como solvente.

#### Biodegradación del gasoil por el cultivo mixto de bacterias

En la Figura 4, se representan los resultados de la evolución del dióxido de carbono y del oxígeno en el cultivo mixto bacteriano. Se señala el 100% de oxígeno como la concentración correspondiente a la del aire en las condiciones de trabajo, en ningún caso significa que se haya incubado bajo una atmósfera de oxígeno.

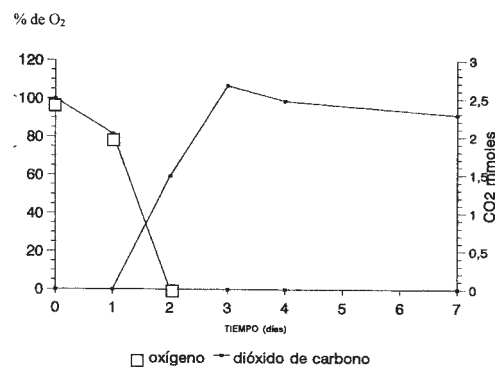


Figura 4. Evolución del O<sub>2</sub> y del CO<sub>2</sub> en el cultivo mixto bacteriano durante la biodegradación del gasoil. Las muestras de la fase gaseosa de los cultivos fueron tomadas con una jeringa y analizadas por cromatografía de gases. Cada valor es el resultado de promediar tres medidas. Para la curva del oxígeno las medias correspondientes a los 0 días y al día 1, fueron de 9,96 y 8,11 respectivamente (correspondientes al 100% y al 81,48% en la curva del oxígeno) con un intervalo de confianza del 95% de 1, 25 y 0,71. Para la curva del CO<sub>2</sub> se realizaron medidas a los 2, 3, 4 y 7 días con medias de 1,49; 2,67; 2,47 y 2,08 respectivamente. Los intervalos de confianza del 95% correspondiente a cada una de esos promedios fueron de 0,45; 0,08; 0,02 y 0,045.

La tasa de producción de CO<sub>2</sub> se hizo evidente a partir del primer día de incubación con un valor de 1,34 mmoles /día hasta el tercer día de incubación. Después de este tiempo no se registró actividad y la concentración del CO<sub>2</sub> registró una leve disminución desde un valor de 2,67 mM hasta 2,08 mM. Por otro lado, en cuando al oxígeno, se



determinó que este compuesto se consume durante los primeros 2 días de incubación. Sin embargo, se observa durante el primer día una baja tasa de consumo comparada con la del segundo día. Esto posiblemente se deba a la fase de latencia inicial. Es importante observar que aunque se haya consumido el oxígeno durante el segundo día de cultivo, al tercer día se mantuvo la producción de  $\text{CO}_2$ . Suponemos que ésta se realizó bajo un metabolismo anaeróbico que utilizó otro aceptor final de electrones distinto al oxígeno.

Las concentraciones de  $\text{CO}_2$  y de  $\text{O}_2$  luego de destapar los cultivos fueron de 0,5 mM y de 3,6 mM respectivamente. A las 24 horas de incubación se determinó que el  $\text{CO}_2$  aumentó hasta un valor de 3,5 mM y el  $\text{O}_2$  disminuyó hasta nivel no detectable por vía cromatográfica. Evidentemente el metabolismo microbiano podía continuar bajo las condiciones de cultivo siempre y cuando existiera oxígeno disponible, pero sorprendentemente, como se observa, tan solo con el 27, 5% del oxígeno presente en la atmósfera puede reanudarse el metabolismo a una tasa importante medida mediante la producción del  $\text{CO}_2$  (3 mmol/día).

Reportes bibliográficos indican que experimentos realizados a escala piloto sobre biodegradación de combustible diesel en arena, registran un consumo mayor de oxígeno y una producción de  $\text{CO}_2$  mayor durante cambios alternos en las condiciones de aerobiosis y anaerobiosis que en incubaciones realizadas solamente en condiciones aeróbicas (18). Esto podía indicar que el sistema propuesto opera un metabolismo celular bajo dos condiciones, aeróbico y anaeróbico, favorecido al restaurar las condiciones aeróbicas después de un periodo de incubación bajo condiciones anaeróbicas.

Tomando como temperatura promedio 22 °C y 640 mm de Hg de presión atmosférica medida con un barómetro Arthur H. Thomas C. O. De Phila P. A. USA y correlacionando estos valores con tablas de datos so-

bre la composición del aire (19) tenemos una concentración de oxígeno en el área de nuestro laboratorio de 20,946 g/L. Mediante este valor pudimos transformar los datos porcentuales de la figura 6 en valores de molaridad para el oxígeno.

Además del  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ , pudimos observar en los cromatogramas que al segundo día de incubación se registra la producción de un compuesto con tiempo de retención de 0,8 que fluye muy próximo al  $\text{CO}_2$ . Pudiese tratarse de un compuesto gaseoso de nitrógeno producto de la desnitrificación o de sulfuro de hidrógeno originado por una respiración anaeróbica de compuestos de azufre presentes tanto en el medio como en el gasoil. De todas formas, el compuesto desaparece al final de la incubación lo cual evita su acumulación. Los controles de las experiencias anteriores presentan variaciones en los valores de oxígeno, pero no hay consumos significativos tomando como media los valores de 5 medidas. No se registró tampoco producción de  $\text{CO}_2$  en estos controles.

#### **Efecto de los asfaltenos durante la biodegradación del gasoil por el cultivo mixto de bacterias**

La presencia de la fracción asfáltica no inhibió la actividad del consorcio microbiano. El oxígeno contenido en los cultivos con asfaltenos se consumió en 2 días de incubación, mientras que en los que no contenían asfaltenos tardó 3 días en consumirse. La producción del  $\text{CO}_2$  en los cultivos con asfaltenos comenzó después del primer día, con una tasa de 0,25 mmoles/día simultáneamente con el consumo de  $\text{O}_2$ . Después del segundo día, y en ausencia de  $\text{O}_2$ , se incrementó la producción hasta 0,5 mmoles/día hasta el tercer día de incubación, para decaer luego hasta una tasa de 0,035 mmoles/día. En los cultivos sin asfaltenos la producción de  $\text{CO}_2$  fue de 0,52 mmloes/día desde el primer día de incubación para caer luego a una tasa de 0,049 mmol/día después del segundo día de incubación. Al cabo de 5 días de incubación la

concentración de CO<sub>2</sub> en la fase gaseosa para los cultivos con asfaltenos fue de 0,83 mM y para los que no contenían asfaltenos fue de 0,66 mM.

Al parecer la presencia de los asfaltenos estimulan la actividad de oxidación pero precedida por una pequeña fase de latencia, sin embargo al final del periodo de incubación los cultivos con asfaltenos presentan mayor proporción de CO<sub>2</sub>. Esto sugiere que los asfaltenos deben contener moléculas susceptible de ser oxidadas y metabolizadas por el cultivo mixto de bacterias, aunque no pudimos determinar directamente si los asfaltenos fueron biodegradados.

Debido a la escasa literatura disponible sobre la biodegradación de la mezcla que preparamos con gasoil y asfaltenos, no fue posible comparar el metabolismo de nuestro consorcio microbiano con otros sistemas, puesto que dependiendo del sistema los asfaltenos podrían presentar distintos grados de accesibilidad (biodisponibilidad) a las células.

### Conclusiones

El sistema modelo formado por una población primaria con apenas una especie bacteriana, *Pseudomonas* BIOMI HPA 2, permitió establecer la acumulación de metabolitos durante el cultivo y que estos, a su vez, pueden ser biodegradados por las poblaciones secundarias carbonoclásticas, evitando su acumulación. Trabajos recientes sobre la biodegradación de crudo indican que se puede lograr la degradación de fracciones de saturados, aromáticos y compuestos modelos mediante cultivos mixtos de 3 especies de cianobacterias (20). Es de esperar que al utilizar poblaciones primarias con distintas especies se pueda mejorar el range de los sustratos degradados.

Se determinó que el cultivo mixto utilizado en la biodegradación del dibenzotiofeno disuelto en parafina líquida (12), es capaz de degradar compuestos modelo y crecer en un sustrato más complejo como el gasoil formado por una extensa mezcla de hidrocar-

buros. Los asfaltenos provenientes de crudo pesado no resultaron tóxicos para este cultivo mixto, por lo que parece existir en estos microorganismos un grado amplio de tolerancia frente a diversos hidrocarburos. Estos resultados concuerdan con los trabajos realizados sobre los rangos de sustratos que pueden degradar ciertas bacterias (21). Así por ejemplo tenemos, que bacterias que degradan bifenil y naftaleno también pueden biodegradar o biotransformar una amplia variedad de otros compuestos tanto monoaromáticos, diaromáticos como poliaromáticos (22). Todos estos resultados demuestran el potencial uso de los cultivos mixtos de microorganismos para los procesos de biodegradación de mezclas de hidrocarburos en el ambiente.

La actividad del cultivo mixto puede estar presentes a concentraciones menores al 30% del oxígeno atmosférico y cuya actividad metabólica puede incrementar al intercalar la incubación aeróbica con condiciones anaeróbicas. Es factible que el procesos de respiración anaeróbica durante la cual otros aceptores de electrones, tales como el nitrato, pueden facilitar la biodegradación de los componentes del gasoil y de otros contaminantes en el ambiente, en vez de utilizar procesos únicamente aeróbicos.

### Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado con recursos del Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos Sixto David Rojo de la Universidad de Los Andes y con el apoyo del CDCHT de la ULA.

### Referencias bibliográficas

1. BARTHA R. *Microbial Ecology* 12:155-172, 1986.
2. LEVIN M., GEALT M.A. *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos*. McGraw-Hill, Interamericana de España, pp. 1-17, 1997.
3. ROCHA C., INFANTES C. *Appl Microbiol Biotechnol* (47): 615- 619, 1997.

4. INFANTE C. *PDVSA Intevep, Visión tecnológica* 7 (1): 5-6, 1999.
5. ANDERSSON B.E., HERYSSON T. *Appl Microbiol Biotechnol* 46: 647-652, 1996.
6. KORDA A., SANTAS P., TENENTE A., SANTAS R. *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 677- 686, 1997.
7. KOTTERMAN M. J., VIS E. H., FIELD J. A. *Appl Environ Microbiol* 64(8): 2853-2858, 1998.
8. MORMILE M.R., ATLAS R.M. *Appl Environ Microbiol* 54(12): 3183-3184, 1988.
9. WIESCH IN DER C., MARTENS R., ZANDRAZIL F. *Appl Microbiol Biotechnol* 46: 653- 659, 1996.
10. CHURCHILL S.A., HARPER J.P., CHURCHILL P.F. *Appl Environ Microbiol* 65 (2): 549-552, 1999.
11. WHYTE L.G., BOURBONNIRE L., GREER C.W. *Appl Environ Microbiol* (9): 3719-3723, 1997.
12. MORENO S.A., ROJAS J.O. *Ciencia* 10(3): 203-214, 2002.
13. MORMILE M.R., ATLAS R.M. *Canadian J Microbiol* 35: 603-605, 1989.
14. MONTICELLO D.J., BAKKER D., FINNERTY W.R. *Appl Environ Microbiol* 49 (4): 756-760, 1985.
15. HUG H., FIECHTER A. *Arch Microbiol* 88: 77-86, 1973.
16. LOPEZ L., PASCUALI J. *Acta Científica Venezolana* 39:41-50, 1988.
17. BUDZIKIEWICZ H. *Fems Microbiol Reviews* 104: 209- 228, 1993.
18. LOSER C., SEIDEL H., ZEHNSDORF A. *Appl Microbiol Biotechnol* 49: 631-636, 1998.
19. LIRE D.R. *Handbook of chemistry and physics*. CRC Press Edition 72, USA, 1991-1992.
20. RAGHUKUMAR C., VIPPARTY V., DAVID J.J., CHANDRAMOHAN D. *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 433- 436, 2001.
21. NADALING T., RAYMOND N., NI'MATU-ZAHROH, GILEWIEZ M., BUDZINSKI H., BERTRARD J.C. *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 79-85, 2002.
22. BALDWIN B.R., MESARCH M.B., NIES L. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:748-753, 2000.