

BIODEGRADACIÓN DE PETRÓLEO DIESEL-2 EN AGUA DE MAR POR *Pseudomonas aeruginosa* EN UN BIORREACTOR AIREADO Y AGITADO

Biodegradation of petroleum diesel-2 in sea water by *Pseudomonas aeruginosa* in a bioreactor aerated and agitated

Allen Mendoza-Avalos¹, Ana Guerrero-Padilla²

Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo.

gerson_menav@hotmail.com¹, mguerrero@unitru.edu.pe²

RESUMEN

El medio ambiente marino es altamente susceptible a la contaminación por petróleo y sus derivados, ya que causa efectos perjudiciales en su ecosistema. La biodegradación es una alternativa para el tratamiento de la contaminación con petróleo. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la capacidad de biodegradación de petróleo Diesel-2 en agua de mar por *P. aeruginosa* en 5 días a condiciones de laboratorio. Para lo cual se construyeron 4 biorreactores de 2,5 litros de capacidad y posteriormente fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 2,5 % y luz ultravioleta. Los sistemas se acondicionaron colocando en los biorreactores agua de mar y petróleo Diesel-2 en condiciones de 1 y 2 % respectivamente, un sistema de control contenía agua de mar sin inóculo y con petróleo al 1 % y el otro contenía solo agua de mar e inóculo. Los biorreactores fueron inoculados con una suspensión bacteriana de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A los 0, 3 y 5 días se tomaron muestras para monitorear el consumo de hidrocarburos, la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) por el método de Winkler modificado por Alsterberg. Se observó que durante el proceso de biodegradación de petróleo Diesel-2 hubo una disminución de la tasa de oxígeno en relación a las concentraciones de petróleo Diesel-2 y estadísticamente hubo diferencias significativas ($p < 0.05$ %) en el porcentaje de degradación y DBO₅.

Palabras clave: Biodegradación, *Pseudomonas aeruginosa*, biorreactor.

ABSTRACT

The marine environment is highly susceptible to contamination by petroleum and its derivatives, since it causes detrimental effects on the ecosystem. The biodegradation of oil is an alternative for the treatment of oil pollution. This work had as main objective determine the ability of biodegradation of petroleum Diesel-2 in sea water by *P. aeruginosa* in 5 days to laboratory conditions. For which were built 4 bioreactors of 2.5 litres capacity and they were subsequently disinfected with sodium hypochlorite to 2.5 and ultraviolet light. Systems were conditioned by placing in bioreactors of seawater and oil diesel-2 in terms of 1 and 2 % respectively, a control system containing seawater without inoculum and with oil to 1 % and the other contained only water mar e inoculum. The bioreactors were inoculated with a bacterial suspension of approximately 1.5×10^8 UFC/mL. At time 0, 3 and 5 days were sampled to monitor the consumption of hydrocarbons, the biochemical oxygen demand (BOD₅) by the method of modified by Alsterberg Winkler. It was noted that during the process of biodegradation of petroleum Diesel-2 there was a decrease in the rate of oxygen in relation to concentrations of petroleum Diesel-2 and there were statistically significant differences ($p < 0.05$ %) in the percentage of degradation and BOD₅.

Key words: Biodegradation, *Pseudomonas aeruginosa*, bioreactor.

Recibido: 15 Setiembre, 2014

Aceptado: 09 Junio, 2016

INTRODUCCIÓN

La constante demanda energética en el mundo moderno ha determinado el uso intensivo del petróleo y sus derivados como fuente de energía y de unidades estructurales para la elaboración de materiales petroquímicos con un mayor valor agregado, lo que justifica su alta demanda creciente a pesar de los elevados precios del petróleo y sus altas inversiones en su exploración.¹

El crecimiento de la economía mundial en términos de energía tiene su base en el petróleo y sus derivados, generando así un rol importante en las economías de los estados y una dependencia asociada con el suministro energético, especialmente por los países del hemisferio norte.²

La contaminación por hidrocarburos del petróleo es una problemática de carácter mundial y amplia distribución geográfica³. A nivel mundial, el volumen de derrame anual de petróleo es de unos 1,7 a 8.8 millones de toneladas métricas y en nuestra región (Pacífico Sudeste) es de 6000 toneladas métricas⁴; teniendo en cuenta que independiente de la zona afectada (lagos, suelos, zonas freáticas, ríos y playas) por procesos biológicos y físicos, los hidrocarburos tienen como destino final los mares y océanos.⁵

En el Perú, la matriz energética está compuesta fundamentalmente por el petróleo y gas, de los cuales produce alrededor de 76 mil barriles de petróleo por día y demanda 160 mil barriles diarios, convirtiéndose en un país importador neto de diversos combustibles; siendo Ecuador, Colombia y Venezuela los principales abastecedores. En los últimos años la producción de petróleo en nuestro país está descendiendo y confronta un creciente déficit en su balanza comercial que puede ser revertido con el aumento de su producción interna mediante el descubrimiento de nuevas reservas de hidrocarburos y su puesta en explotación.⁶

Como consecuencia directa del aumento del uso masivo y de la necesidad por productos derivados del petróleo como fuente de energía y como materia prima, han aumentado la exploración de nuevos pozos petroleros y con ello el aumento en la incidencia de accidentes durante los procesos de extracción, transporte, refinó, transformación y utilización del petróleo y sus derivados los cuales han determinado la aparición de crecientes fuentes de contaminación ambiental.⁷

La contaminación del ambiente marino y especialmente en sectores costeros por derrames de petróleo, principalmente de crudo, son los derrames más grandes de petróleo crudo registrados en la historia, principalmente por que los procesos de extracción, carga, distribución y descarga de las inmensas cantidades de petróleo crudo producidas se llevan a cabo por medio marítimo siendo transportados a través de grandes buques, por lo mismo, es que estos sistemas marinos y costeros se presentan como los más susceptibles ante este tipo de eventos de contaminación.⁸

De los muchos contaminantes que entran al mar, el petróleo es considerado por algunos como el que tiene mayor potencial para alterar el medio natural. Entre los derivados del petróleo, el Diesel-2 es el combustible que más se consume en el Perú y es utilizado principalmente en el transporte, la industria y la generación eléctrica.⁹ El petróleo Diesel, así como otros derivados del petróleo, está formado por en su mayor parte por una mezcla de hidrocarburos (alcanos, alcanos ramificados, ciclo alcanos así como por productos químicos tóxicos, como el naftaleno y los hidrocarburos monoaromáticos)¹⁰, también contiene una fracción de azufre en

forma de compuestos aromáticos, la cual no es eliminada con la tecnología comúnmente utilizada de la hidrodesulfuración, estas contaminaciones pueden ser peligrosas para la salud de plantas, animales y seres humanos.¹¹

Los hidrocarburos del petróleo cuando llegan al mar se pueden encontrar en el agua flotando libremente, en emulsión, disueltos o adsorbidos a sólidos suspendidos. Los hidrocarburos con mayor número de carbonos tienden a flotar y están en forma libre formando una capa impermeable que obstaculiza el paso de la luz solar, fuente necesaria para realizar el proceso fotosintético del fitoplancton y de las microalgas generando de esta manera el primer impacto en ecosistemas marinos, ya que como productores primarios, son el primer eslabón de la cadena alimentaria, afectando de esta manera a los organismos en los diferentes niveles de la cadena trófica en los ecosistemas acuáticos^{12,13}. Por el contrario, las moléculas más pequeñas tienden a formar emulsiones con el agua y son más difíciles de remover. Otros informes sobre los efectos de los hidrocarburos en la vida acuática es la adhesión de estas partículas a las branquias de los peces, afectando su respiración.¹⁴

En general, las actividades relacionadas a los sectores de la cadena productiva del petróleo son actualmente una de las principales responsables por la contaminación de los ambientes marinos¹⁵, afectando profundamente a la fauna y vida en el lugar, razón por la cual la industria petrolera debe cumplir con normas y procedimientos muy estrictos en materia de protección ambiental; es bajo esta premisa que se surge el uso tecnologías limpias y naturales para recuperar aquellos ecosistemas perturbados por la actividad petrolera.^{16,17}

En el caso del agua, se pueden utilizar procesos físicos, químicos y biológicos para recuperar y remover petróleo. La National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) de Estados Unidos, ha discutido el uso de la mayor parte de las tecnologías no biológicas¹⁸. Sin embargo, existen evidencias de que los tratamientos físicos y químicos generalmente causan la dispersión del contaminante, y no su efectiva remoción, tornándolos de eficacia limitada, más allá de ser alternativas de costo elevado, pueden causar daños a la biota e impedir la recuperación de ciertos hábitats. Por lo anterior, los nuevos esfuerzos se han enfocado hacia el uso de tecnologías que promuevan los procesos naturales de remoción de contaminantes.^{18, 19}

Dentro de estos nuevos mecanismos la biorremediación es una técnica de recuperación de sitios impactados que utiliza tecnologías las cuales estimulan la biodegradación del contaminante por procesos biológicos, su objeto es minimizar las consecuencias de un derrame. Estos procesos de biodegradación pueden ser llevados a cabo por la microbiota autóctona de la zona contaminada o por microorganismos adicionados. En ambos casos, lo que se consigue es una biotransformación de sustancias peligrosas en sustancias menos tóxicas o inocuas. Este método a comparación de los otros anteriormente mencionados posee una alta eficiencia, tiene bajo costo y no causa contaminación secundaria.²⁰

Algunas bacterias marinas poseen capacidad de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono y son la mejor opción en los derrames de petróleo en zonas costeras. Los hidrocarburos están sujetos a la degradación aeróbica y anaeróbica. Las bacterias comúnmente encontradas en áreas de contaminación por hidrocarburos son del género *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium* y *Nocardia*.

El género *Pseudomonas* es un grupo de bacterias gram negativas que se encuadran dentro del grupo γ -proteobacterias. Se han aislado bacterias de este género tanto en suelos limpios como

en suelos contaminados por productos biogénicos y xenobióticos. También son microbiota predominante en la rizosfera y en la filosfera de plantas. Del mismo modo, se han aislado de ambientes acuáticos, tanto de agua dulce como de aguas marinas. Este género es uno de los más proclives a la degradación de compuestos orgánicos, especialmente cepas de la especie *Pseudomonas aeruginosa* siendo una opción muy viable el uso de esta cepa para el proceso de biorremediación, ya que son microorganismos que parecen ser el más ubicuo y el más adaptable a los diferentes contaminantes.^{21, 22, 23}

En tal sentido, la biodegradación del petróleo es un proceso aeróbico por lo tanto, la inyección de aire por otros métodos mecánicos, acelera sustancialmente la biodegradación ya que la degradación aeróbica de los hidrocarburos es considerablemente más rápida que el proceso anaeróbico¹. Este proyecto tuvo como objetivo determinar la capacidad de biodegradación de petróleo Diesel-2 en agua de mar por *P. aeruginosa* en 5 días en condiciones de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

El agua de mar procedente del balneario de Huanchaco, de la ciudad de Trujillo, fue colectada en botellas de vidrio ámbar estériles con capacidad de 4 litros, luego éstas se sellaron y rotularon. Se utilizó la metodología de D'croz¹² para procesar la mezcla de petróleo Diesel 2 y agua de mar.

Se trabajó con un cultivo puro de *P. aeruginosa* proporcionado por el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo. La cepa de *P. aeruginosa* fue enriquecida en caldo nutritivo²⁴ a 36°C por 48 horas y posteriormente transferidas a placas Petri con agar nutritivo bajo las mismas condiciones de crecimiento.

Diseño y construcción del biorreactor experimental

Para el tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos se utilizaron biorreactores cilíndricos tipo agitado con Aireación Lateral (BCAAL-16)²⁵, de capacidad de 2.5 L provistos de cuatro deflectores de 1.2 x 8 cm en cada biorreactor, con motores de 9 V que fueron regulados a 1.5 V para su funcionamiento. Los biorreactores fueron conectados a un sistema de aireación previamente purificado con solución salina al 20 %.

Ensayo de la actividad degradativa de petróleo Diesel-2 por *P. aeruginosa*

Se realizó un pre-ensayo con el fin de verificar de qué se trataba de una cepa con capacidad degradadora de hidrocarburos apta como inóculo inicial para iniciar el proceso de degradación en petróleo Diesel-2. La prueba de actividad degradativa consiste en proveer a la cepa bacteriana nutrientes mediante un medio mineral con una concentración mínima de petróleo Diesel-2, obteniendo el carbono necesario para realizar sus procesos enzimáticos y generar energía en forma de ATP, degradando el hidrocarburo a CO₂ y agua.

Después de la reactivación de la cepa de *P. aeruginosa* fue padronizada a una concentración microbiana de 1,5 x 10⁸ UFC/ml (escala de 0.5 de la escala de MacFarland). Luego utilizando tubos de 12 x 75 mm, se procedió a realizar este ensayo según la metodología de Hanson²⁶, para lo cual se tomaron 500 µL de medio Bushnell-Haas²⁷, 50 µL de la suspensión bacteriana padronizada en 1,5 x 10⁸ UFC/ml, 20 µl de la fuente de carbono (petróleo Diesel-2) y 10 µl

del indicador 2,6 diclorofenol-indofenol- DCPIP. Los tubos fueron incubados a 30 °C, durante 24 horas. El indicador 2,6-DCPIP muestra el potencial de *P. aeruginosa* al utilizar los hidrocarburos de petróleo como substrato por medio de la alteración del medio de la forma oxidada (azul) a la forma reducida (incolora).²⁸

Después que se identificó que *P. aeruginosa* es degradadora de hidrocarburos fue reactivada en caldo nutriente más NaCl al 3 % a 37 °C por 24 horas y luego se tomó 1 ml de este caldo y se transfirió a otro tubo con 9 ml de medio Bushnell-Hass (BH) modificado por la adición de 1/10 de FeCl₃ y alterado con 3 % NaCl ²⁹ juntamente con glucosa al 1 % como única fuente de carbono y energética para el crecimiento bacteriano.

Preparación de los sistemas de tratamiento

Se construyeron 4 biorreactores o sistemas de tratamiento tipo aireado y agitado de tres litros de volumen total, pero con un volumen de trabajo 2.7 litros de capacidad. Se evaluó la capacidad degradativa de dos concentraciones (1 y 2 % de petróleo Diesel-2), para lo cual antes de cada experimento todos los biorreactores fueron sometidos a desinfección química con hipoclorito de sodio al 5%, y luego en cámara UV durante una hora.

Los cuatro biorreactores fueron alimentados de la siguiente manera:

- **Tratamiento 1 (T₁):** Agua de mar, petróleo Diesel-2 al 1 %, sin inóculo (Para observar el porcentaje de biodegradación de los microorganismos ambientales).
- **Tratamiento 2 (T₂):** Agua de mar, inóculo, sin petróleo Diesel-2 (para observar la variación del porcentaje de biodegradación de los microorganismos ambientales con el inóculo).
- **Tratamiento 3 (T₃):** Agua de mar, inóculo, Petróleo Diesel-2 al 1%.
- **Tratamiento 4 (T₄):** Agua de mar, inóculo, Petróleo Diesel-2 al 2%.

Cada experimento se realizó por triplicado.

Monitoreo y control del bioproceso

La biodegradación del petróleo Diesel-2 por *P. aeruginosa* se evaluó a 0, 72 y 120 horas mediante el consumo del hidrocarburo por determinación gravimétrica ³⁰, la demanda bioquímica de oxígeno por el método de Winkler modificado por Alsterberg ³¹.

Análisis estadístico

Se calculó la media aritmética de los resultados obtenidos de las 3 repeticiones, luego se aplicó el análisis de varianza con un nivel de significancia del 95 %.

Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado y los datos se procesaron con el paquete estadístico STATGRAPHICS Plus Versión 5.1.

RESULTADOS

Al evaluar la biodegradación de petróleo Diesel-2 en agua de mar contaminada por *P. aeruginosa* en un biorreactor tipo aireado y agitado, se observó que, durante el proceso, el porcentaje de petróleo Diesel-2 y el consumo de oxígeno disminuyeron de manera inversamente proporcional.

La variación del porcentaje biodegradación de petróleo Diesel-2 a diferentes concentraciones en agua de mar por *P. aeruginosa*, se mostró en la Tabla 1 y Fig. 1, observándose aparentemente que los valores más altos se encontraron al 1% y 2 % de petróleo Diesel-2. Por otra parte, en la Tabla 2 mostró los valores de DBO₅ de *P. aeruginosa* obtenidos durante el crecimiento a diferentes concentraciones de petróleo Diesel-2. Aquí se puede observar la variación de la demanda bioquímica de oxígeno en función del tiempo en los tratamientos realizados.

En relación a la Fig. 2, se pudo apreciar que la demanda bioquímica de oxígeno fue disminuyendo al transcurrir el tiempo obteniéndose 2,69 mg O₂ disuelto /L al 2 % de petróleo Diesel-2 a los 5 días de incubación notándose diferencia con el tratamiento 2 que en ausencia de concentración de petróleo Diesel-2 presentó una demanda bioquímica de oxígeno de 2.89 mg O₂ disuelto /L a los 5 días de incubación. Además, en todas las concentraciones se observó la disminución de la demanda bioquímica de oxígeno.

En relación a la Fig. 3 se pudo apreciar las diferencias significativas ($p < 0.05$ %) entre los valores promedios para cada tratamiento con respecto a la variación del porcentaje de petróleo Diesel-2 y los valores de DBO₅ durante el proceso de degradación de petróleo Diesel-2 a diferentes concentraciones por *P. aeruginosa*.

Tabla 1: Variación de porcentaje de petróleo Diesel-2 durante la biodegradación de petróleo Diesel-2 en agua de mar por *P. aeruginosa*.

Tiempo (días)	Tratamiento 1 (T ₁)	Tratamiento 2 (T ₂)	Concentraciones de petróleo Diesel-2	
			1 % (T ₃)	2 % (T ₄)
0	0.019	0.249	0.157	0.671
3	0.008	0.106	0.038	0.233
5	0.006	0.0153	0.018	0.056

Tabla 2: Valores de DBO₅ durante el proceso de degradación de petróleo Diesel-2 a diferentes concentraciones por *P. aeruginosa*.

Tiempo (días)	Tratamiento 1 (T ₁)	Tratamiento 2 (T ₂)	Concentraciones de petróleo Diesel-2	
			1 % (T ₃)	2 % (T ₄)
0	3.62	3.15	3.22	3.12
3	3.36	3.09	2.97	2.82
5	3.02	2.89	2.75	2.69

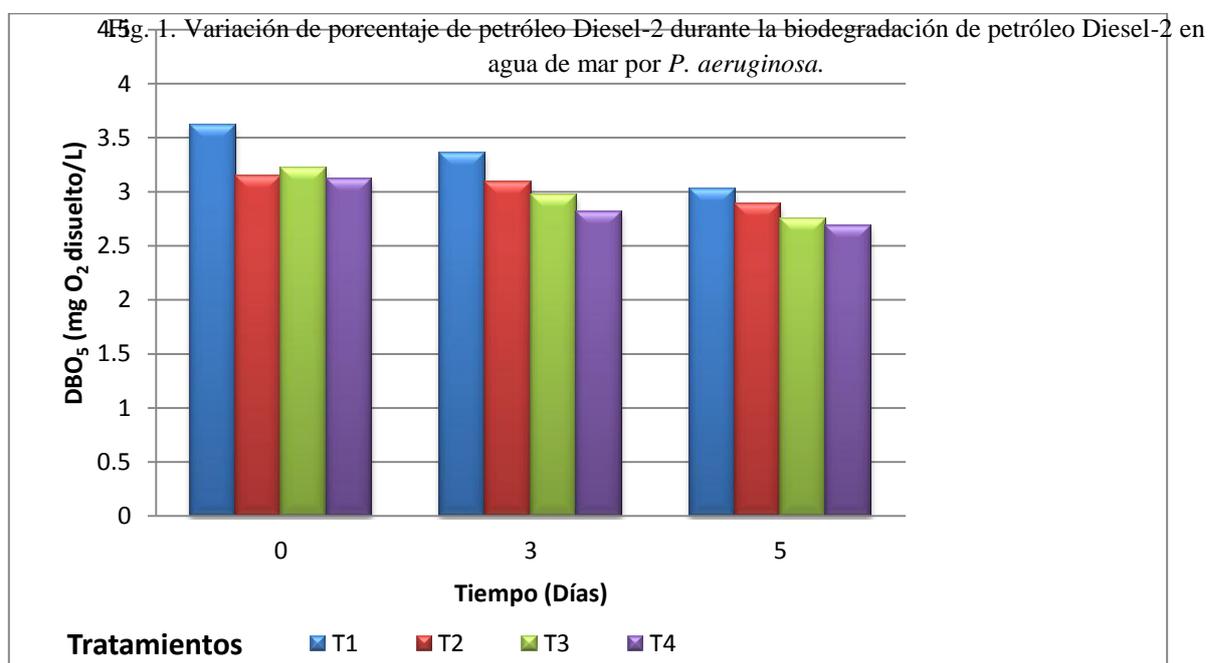
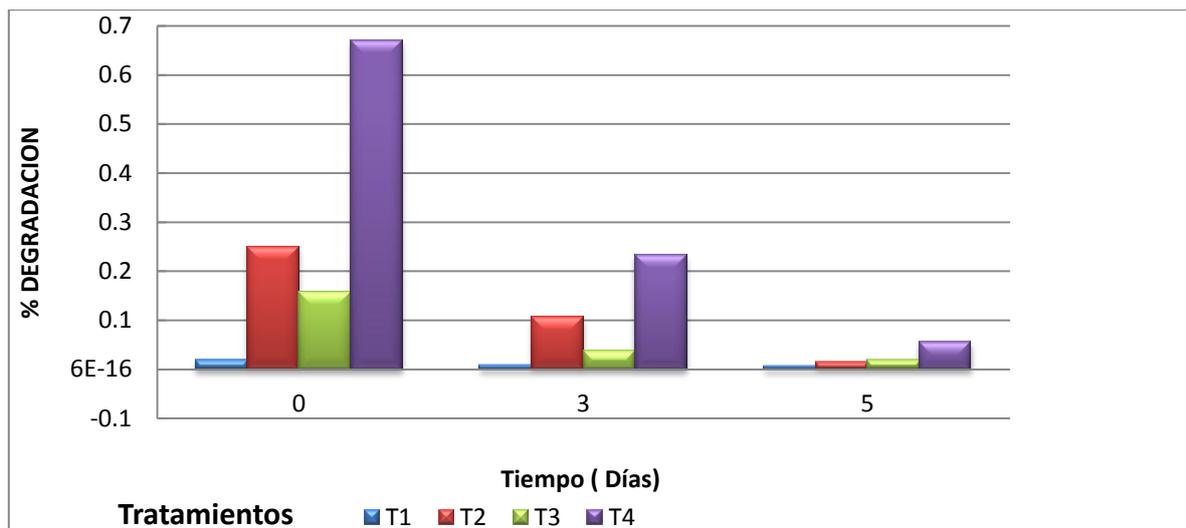


Fig. 2. Valores de DBO₅ durante el proceso de degradación de petróleo Diesel-2 a diferentes concentraciones por *P. aeruginosa*

DISCUSIÓN

Los vertidos de hidrocarburos al mar debido a accidentes de grandes petroleras que causan importantes daños ecológicos, que no se limitan a las zonas del derrame, la contaminación puede alcanzar las zonas costeras y afectar grandes extensiones del litoral. Se ha demostrado que los microorganismos degradadores de hidrocarburos y compuestos relacionados del petróleo son ubicuos en los ambientes marinos.³² Asimismo, Skayti³³, manifestó que cuando se da la contaminación por hidrocarburos, se producen cambios en las poblaciones microbianas autóctonas con un enriquecimiento de los microorganismos degradadores.

El proceso experimental de biodegradación de petróleo Diesel-2 en agua de mar fue evaluado durante 5 días, realizado en biorreactores provistos de aireación y agitación continua con el objetivo de proporcionar el medio adecuado para el crecimiento de *P. aeruginosa*. Algunos autores reportan el proceso de degradación del petróleo en 5 días³⁴, otros en 7 días³⁵, 30 días³⁶ y más aún en varias semanas.

Se demostró la capacidad degradadora de *P. aeruginosa*, como se observa en la Tabla 1, hay diferencias significativas en el porcentaje de degradación entre tratamientos. En el tratamiento 1 se observó la presencia de bacterias degradadoras de hidrocarburos en el ambiente marino reflejadas en la disminución del porcentaje de los hidrocarburos de 0.019 a 0.006. En la Fig. 1 se observó que la variación de porcentaje de petróleo Diesel-2 durante la biodegradación fue mayor en los demás tratamientos en comparación al tratamiento 1, debido a que los demás tratamientos se les inoculó *P. aeruginosa*, observándose que cuando esta cepa fue añadida en los demás tratamientos el porcentaje de biodegradación aumentó significativamente.

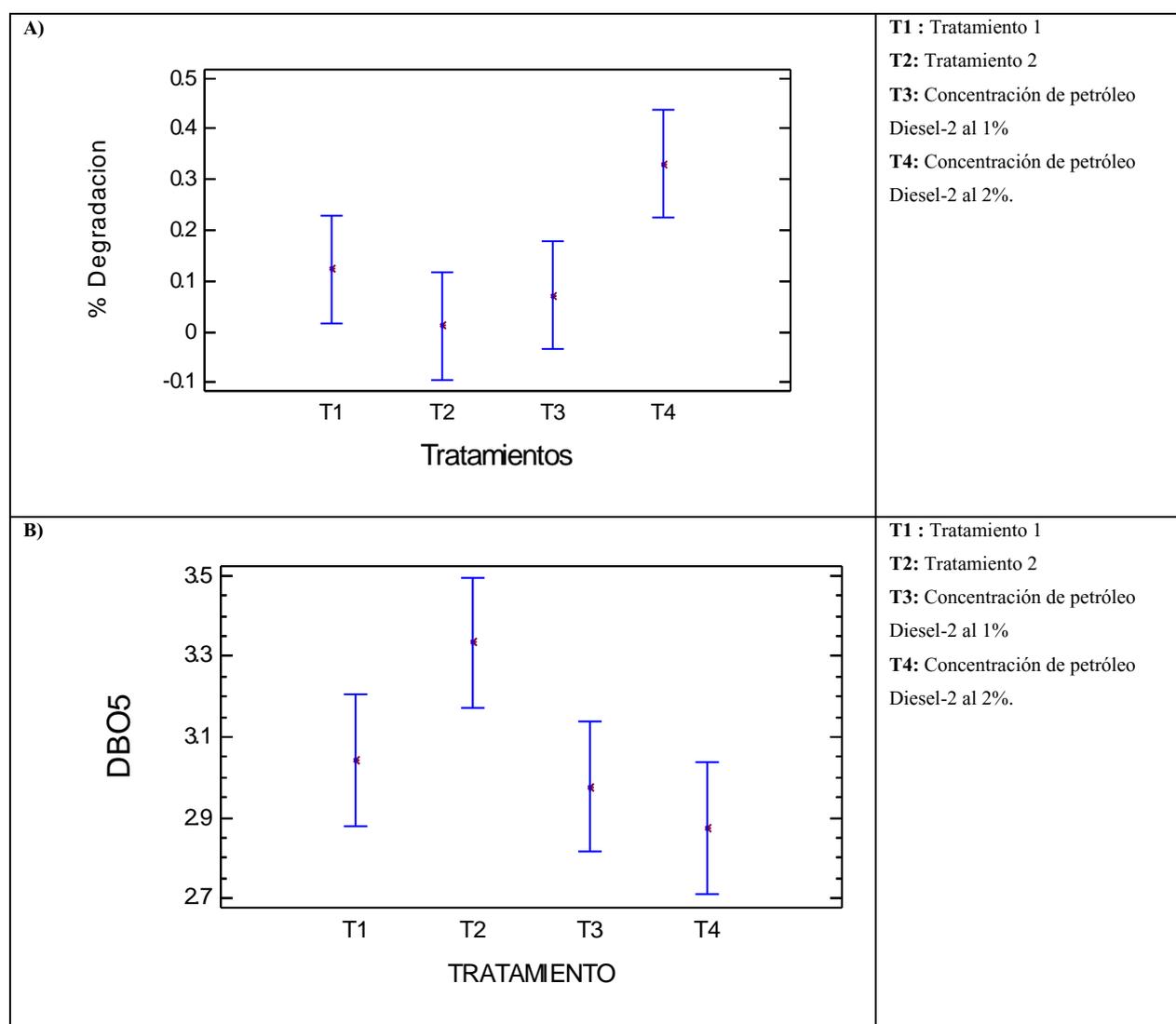


Fig. 3. A) Variación del porcentaje de degradación de petróleo Diesel-2 en agua de mar por *P. aeruginosa* en un biorreactor aireado y agitado. B) Valores de DBO₅ durante el proceso de degradación de petróleo Diesel-2 a diferentes concentraciones por *P. aeruginosa*.

Esta interacción entre el consorcio bacteriano endógeno con la cepa exógena según Liu ³⁷, se debe a que en los ecosistemas marinos, las bacterias constituyen un componente esencial en la cadena trófica, las cuales a través de su interacción con otros microorganismos, modifican los ambientes, y llegan a ser capaces de crecer en ambientes contaminados jugando de esta manera un papel ecológico de gran importancia dentro el ecosistema, por su capacidad de degradar compuestos contaminantes de origen orgánico. En el proceso de biodegradación fue necesario que en el sistema existan microorganismos con la capacidad de utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono. Las poblaciones microbianas con competencia para degradarlos se encuentran en el ambiente marino en la parte superficial como en los sedimentos o en las zonas intermareales ³⁸. En este sentido, Noriega ³⁹, aisló e identificó del puerto de Salaverry (Trujillo- Perú) algunas especies de microorganismos aerobios con capacidad biorremediadora como *Alcaligenes sp*, *Pseudomonas sp*, *Bacillus sp*; entre otras bacterias.

Los niveles de biodegradación de petróleo crudo y sus derivados según Michaud ⁴⁰ está limitada por factores ambientales como el oxígeno molecular y los nutrientes (fosfato, amonio, nitrato, nitrito y compuestos orgánicos del nitrógeno). Urum ⁴¹ relacionó la producción de biotensioactivos o biosurfactantes por parte de los microorganismos con las tasas de biodegradación de los hidrocarburos en el medio ambiente, debido a que las tasas de biodegradación están limitadas por la hidrofobicidad y baja solubilidad del petróleo en agua, por lo tanto, la producción de estas moléculas tensioactivas por parte de los microorganismos les permitieron asimilar los hidrocarburos. Entre los diversos biotensioactivos, los ramnolípidos son considerados como los más eficientes en la degradación de los hidrocarburos los cuales a su vez son producidos en mayor proporción por *P. aeruginosa* ⁴².

En este sentido cabe destacar la etapa de enriquecimiento de los microorganismos en el medio de cultivo, debido a que la producción de ramnolípidos se inicia durante la etapa exponencial de crecimiento, siendo esta la máxima al inicio de la fase estacionaria. En este experimento se utilizó el medio Bushnell-Haas ²⁷, debido a que es un medio que cuenta con los nutrientes necesarios para la producción de biotensioactivos, teniendo como componentes principales al magnesio (necesario tanto para el crecimiento como para la producción de biotensioactivos ya que forma parte de los cofactores enzimáticos), el NH_4NO_3 (como fuente de nitrógeno debido a que la cepa utiliza los nitratos como aceptor terminal de electrones para la respiración), el hierro (aumenta significativamente la producción de biotensioactivos) el K_2HPO_4 y el KH_2PO_4 (favorecen el óptimo crecimiento y producción de ramnolípidos). Las faltas de estos componentes limitan el crecimiento y por consiguiente la síntesis de biotensioactivos. ^{43,44}

Los bajos niveles de degradación de hidrocarburos por *P. aeruginosa* durante todo el bioproceso se debió al tiempo de adaptación por parte de la bacteria al sustrato (hidrocarburos) y la fuente de carbono utilizada en la etapa de enriquecimiento. Según Hoff ⁴⁵ las diferentes tasas de biodegradación tienen un tiempo de adaptación después de que se ha derramado el petróleo antes de que los microorganismos propios de la zona contaminada comiencen a romper las moléculas de petróleo. Este lapso de tiempo se relacionó con la toxicidad inicial de las fracciones volátiles del petróleo que se evaporan en los primeros días del derrame. En otras palabras, las poblaciones microbianas empiecen a usar el petróleo y expandir su población antes de la degradación medible o mensurable, requieren un periodo que suele durar varios días.

P. aeruginosa es la bacteria que mejores resultados muestra en la biodegradación del petróleo, esto se explica porque *Pseudomonas* es uno de los géneros bacterianos con mayor diversidad metabólica, la cual ha sido determinada en numerosos trabajos, empleando diferentes sustratos como fuente de carbono y energía ⁴²; no obstante, Norman ⁴⁵ reportó el tiempo de adaptación de *P. aeruginosa* cepas U1 y U3 depende de la adaptación de la superficie celular de *P. aeruginosa* a la fuente carbono usada en el medio de enriquecimiento, para cual se sometió a ambas cepas a diferentes fuentes de carbono (Glucosa y petróleo crudo) obteniendo un mayor retardo en el tiempo de adaptación cuando las cepa tuvieron a la glucosa como única fuente de carbono y energía, mientras que en las cepas que tuvieron como fuente de carbono al petróleo crudo obtuvieron menor tiempo de adaptación, debido a que, estas cepas han reducido la expresión del antígeno-O en comparación con las cepas que tuvieron a la glucosa, y que se debe a la pérdida de las subunidades del antígeno-O corresponde a la apariencia áspera de la morfología de la colonia, el aumento de la hidrofobicidad de la superficie celular.

A pesar de los bajos porcentajes de degradación de hidrocarburos se observó que en los tratamientos con concentraciones de petróleo Diesel-2 al 1 % y 2 % (Fig. 1) hubo un mayor porcentaje de degradación del petróleo Diesel-2 debido a la interacción de *P. aeruginosa* y el consorcio microbiano propio del ambiente marino. Según Arino ⁴⁷ observaron que la presencia de *P. aeruginosa* GL1 dentro de un cultivo mixto de bacterias degradadoras de hidrocarburos poliaromáticos (*Rhodococcus erythopolis*, *Bacillus cereus* y *P. flourescens*), aceleraban la degradación de los poliaromáticos presentes a partir de una relación de comensalismo entre la bacteria *P. aeruginosa* GL1 y el cultivo mixto. Esta relación de comensalismo se fundamenta en que el cultivo mixto crece a expensas de los poliaromáticos, mientras que *Pseudomonas* degrada los metabolitos de meta ruptura estabilizando la población microbiana.

A medida que ocurría el proceso de degradación se presentó una serie de fenómenos que sirvieron como indicadores de que la materia orgánica contaminante fue degradada, por ejemplo, aumenta la población bacteriana, mientras disminuye la concentración de oxígeno del medio, ya que el oxígeno es consumido por los microorganismos a una velocidad mayor a la que es reemplazado.¹

Se encontró una disminución de la DBO₅ en forma proporcional a la biodegradación de petróleo Diesel-2 (Fig.2), indicó que la materia orgánica disponible va en disminución, mientras la biomasa incrementó, demostrando de este modo la presencia de microorganismos capaces de utilizar como sustrato el petróleo Diesel-2. Por lo tanto, la presencia del oxígeno en el sistema favoreció el proceso de degradación aerobia (teniendo al oxígeno como aceptor final de electrones) el cual fue usado para el metabolismo de la bacteria. El metabolismo aerobio hidroxila anillos de benceno (HAPs) para romperlos y generar productos intermediarios cuyo metabolismo central incluye la vía del ciclo de krebs y de la β -oxidación ⁴⁸. En el caso de degradación de los alcanos, la mayoría inicia con la oxidación de los grupos metilos de las extremidades, a alcoholes primarios. Estos alcoholes primarios son oxidados a aldehídos, los cuales, bajo la acción de la enzima NAD-deshidrogenasa, son oxidados a sus correspondientes ácidos grasos. Estos a su vez, son degradados a por β -oxidación, o son utilizados por la célula.⁴⁹

En este caso se utilizó la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) como un instrumento para medir la degradación de materia orgánica de manera indirecta, por consiguiente, la DBO₅ es un índice del grado de contaminación en un efluente, y representa la cantidad de oxígeno que consume los microorganismos para degradar la materia orgánica presente, en condiciones

aerobias, hasta el quinto día de su existencia a 20 °C, se expresa en gramos de oxígeno /m³ ó mg de O₂ disuelto/L, una cantidad pequeña de oxígeno requerido para la oxidación de materia orgánica, corresponde a la presencia de una menor cantidad de materia orgánica degradable, por lo que la disminución del DBO₅ indica que el petróleo Diesel-2 está siendo consumido por los microorganismos.⁹

Se pudo observar que la degradación se estabilizó a los 3 días aproximadamente, tiempo en el que alcanzó la fase estacionaria de crecimiento, estos resultados se aproximaron al tiempo de estabilización de 64 h que encontró Pérez⁵⁰ en la degradación del naftaleno por *P. aeruginosa* AT18. Sin embargo, debido a la variedad de compuestos aromáticos que presenta el Diesel-2, resulta difícil la degradación de compuestos aromáticos de este combustible, puesto que la estructura química de estas moléculas condiciona tanto su toxicidad como su baja solubilidad en agua produciendo baja disponibilidad para la célula.⁵¹

CONCLUSIONES

La biodegradación por *P. aeruginosa* en ambientes marinos contaminados por petróleo Diesel-2 en 5 días fue baja en comparación cuando interactuó con un consorcio microbiano endógeno.

La demanda bioquímica de oxígeno es inversamente proporcional a la concentración de la biomasa, indicando de esta manera la biodegradación del petróleo Diesel-2.

Los valores de pH no son buenos indicadores de la evolución del proceso de biodegradación del petróleo Diesel-2.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chavez, E. Biodegradación de petróleo diesel 2, por un consorcio microbiano nativo de las lagunas del Distrito de Quiruvilca en un biorreactor aireado y agitado. Trabajo de Magíster en Biotecnología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2006; 45 p.
2. Rojas, O., Rojas, J. Salas, J. Situación energética de los hidrocarburos en el Perú. Ind. data 2006. 9(2):21-32.
3. Ñustez, D. Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible. Tesis para optar el grado de Magíster en Ecotecnología. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira-Colombia. 2012; 113 p.
4. Escalante; R. Biodegradación de Crudo de Petróleo en Terrarios. Tesis para optar al grado de Magíster. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. 2002; 56 p.

5. Shanidul, I. & Tanaka, M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries approach for management: a review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.*, 2004.48: 624-649.
6. Valcárcel, M. Inversiones, productos orgánicos y biocombustibles en el sector rural del Perú. Cuaderno12Valcarcel-Pontificia Universidad Católica del Perú, 2011. 56p.
7. Fernández, X.; Navarrete, J.; Sánchez, G.; Ontiveros, J.; Rodríguez, F., Jaime, E. Prospectiva de petróleo crudo 2012-2026. Secretaria de Energía, México. 2012: 173 p.
8. Ovando, L. Optimización *in vitro* para la degradación de hidrocarburos totales del petróleo (TPHS) asistido con biosolvente y nutrientes en tres zonas distintas del intermareal. Tesis para optar por el grado de Bioquímico. Universidad Austral de Chile. Valdivia – Chile. 2012.
9. Otiniano, N.; Chávez, M.; Robles, H.; Luján, M. Efecto de la fuente nitrogenada sobre la capacidad de mineralización de petróleo Diesel-2 por *Pseudomonas*. *Rebiol*; 2008. 28(2): 10
10. Vasudevan, N.; Rajaram, S. Bioremediation of oil sludge contaminated soil. *Environ. Int.*, 2001. 26(5-6): 409-411.
11. Abrão, A. Mecanismos gerais de degradação bacteriana dos compostos hidrocarboretos monoaromáticos: Benzeno, Touleno, Etilbenzeno e Xileno (BTEX). Tesis para optar el título en Microbiología Ambiental e Industrial. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte (MG)-Brasil. 2008. 46p.
12. D' cruz, L.; Torres, J. & Gómez, J. Efecto del Crudo Venezolano (BCF-24) sobre el crecimiento de la diatomea marina tropical *Chaetoceros gracilis* (Thomas, 1966). *Rev. Pacífico Sur* (Número Especial); 1988. 7 p.
13. Vera, G. Tam, J y Pinto, E. Efectos ecotoxicológicos del petróleo crudo, diesel 2 y kerosene sobre el crecimiento poblacional de la microalga *Chaetoceros gracilis* Schutt. *Ecol. apl.*; 2009. 8 (1): 1-7.
14. Olgúin, E.; Hernández, M.; Sánchez, G. Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 2007. 23 (3): 139-154.
15. Satow, M. Avaliação do método de Iwatsu et al., (1981) para isolamento de leveduras negras no solo, degradadoras de hidrocarbonetos. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”. Rio Claro (SP)-Brasil; 2008. 81 p.
16. Pardo, J., Perdomo, M., Benavides, J. Efecto de la Adición de Fertilizantes Inorgánicos Compuestos en la Degradación de Hidrocarburos en Suelos Contaminados con Petróleo. *NOVA*; 2004. 2 (2): 40-49.

17. Montenegro, F. Aislamiento y selección de cepas bacterianas nativas de suelos de la XII región de Chile, para la degradación de crudos de petróleo. Tesis para optar el grado de Licenciado en Agronomía. Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile. 2007. 119 p.
18. Hoff, R. Hensel, P.; Proffitt, E. Delgado, P. Shigenaka, G. Yender, R. y Mearns, A. Oil Spills in mangroves. Planning & Response Considerations. National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). EUA. Technical Report, 2010. 72 p
19. Bao, M.; Wang, L.; Sun, P.; Cao, L.; Zou, J. & Li, Y. Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment. Marine pollution bulletin Elsevier; 2012. 64 (4): 1177–1185.
20. Van Hamme, J., Singh, D., Ward, O. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiol. Mol. Biol. Rev; 2003. 67: 503- 549.
21. Gómez, S., Gutiérrez, D., Hernández, A., Hernández, C., Losada, M., Mantilla, P. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. NOVA, 2008. 6(9):76-84.
22. Darvishi, P.; Ayatollah, S.; Mowla, D.; Nazi, A. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPP1-2. Colloids and Surfaces B. Biointerfaces.; 2011. 84: 292-300.
23. González, J. Aplicación del ramnolípido producido por *Pseudomonas aeruginosa*, en el lavado y biodegradación de compuestos presentes en suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Tesis para optar el grado de Magister en Bioprocesos. Instituto Politécnico Nacional. México. 2011. 122p.
24. Rivera-Cruz, M.; Ferrera-Cerrato, Victor, Rodriguez, R & Fernández, L. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. Terra Latinoamericana. 2002. 20 (4): 423-434.
25. Miranda, H. Robles, H. Villanueva, L. Rodríguez, C. Biorreactores Diseño y Aplicaciones. Sociedad Peruana de Biotecnología. Trujillo-Perú. 2006.
26. Hanson, K., Desai, J. & Desai, A. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. Biotechnology Techniques; 1993. 7(10): 745-748.
27. Bushnell, L; Haas, H. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. J. Bacteriol; 1941. 41: 653-673.
28. Afuwale, C; Modi, H. Study of bacterial diversity of crude oil degrading bacteria isolated from crude oil contaminated sites. Life sciences leaflets, 2012. (6):13-23.

29. Braddock JF, Gannon KA, Rasley BT. OCS Study MMS 2004-061 Petroleum Hydrocarbon – Degrading Microbial Communities in Beaufort – Chukchi Sea Sediments by Project Organization. 2004.
30. Schwab, A. ; Su, J. ; Wetzel, S.; Pekarek, S. ; Banks, M. Extraction of Petroleum Hydrocarbons from Soil by Mechanical Shaking. Environ. Sci. Technol.; 1999. 33 (11): 1940-1945.
31. Castillo, L. Efecto de la concentración de Petróleo Diesel II sobre la Demanda Bioquímica (DBO₅) y la cinética del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosas*. Tesis para obtener el Título de Biólogo-Microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo. 2008. Trujillo-Perú. 30 p.
32. Sutiknowati, L. Hydrocarbon degrading bacteria: Isolation and identification. Makara.Sains. 2007. 11: 98-103
33. Skayti, A.; Hidayati, N.; Yani, M.; Sudiana, I. PHA degraders marine bacteria isolated from chronically contaminated sediment by petroleum hydrocarbons. P.E.R.M.I. 2008: 22-23.
34. Pineda, G.; Boll, G.; Mesta, A. Biodegradación de asfaltenos por un consorcio microbiano aislado de petróleo crudo “Maya”. Rev. Int. Contam. Ambient. 2002. 18 (2): 67-73.
35. Amenaghawon,A. ; Osunbor,O. ; Obahiagbon, K. Impact of nutrients, aeration and agitation on the bioremediation of crude oil polluted water using mixed microbial culture. International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences, 2014. 2(2): 43-48.
36. Díaz,L.; Briceño,B.; García,M.; Rosales,N.; Marín,J.; Aiello,C. et al. Biodegradación de queroseno por cultivos de bacterias aisladas de una fosa petrolera en Venezuela. Revista Tecnocientífica URU, 2013. 4: 51 – 59.
37. Liu, C.; Chang, W.; Liu, H. Bioremediation of alkanes and the formation of bioflocules by *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 under various saline concentration and seawater. Biochem. Eng. J. 2009. 45: 69-75.
38. Bucker, F. Biodeterioração de misturas de diesel e biodiesel e seu controle com biocidas. Tesis de maestría en Microbiología Agrícola y del Medio Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre (RS)- Brasil. 2009. 14
39. Noriega, H. Aislamiento y selección de bacterias del sedimento marino del área costera del Puerto de Salaverry-Perú, capaces de degradar DiclorofenilTricloroetano “DDT”. Tesis de Maestría en mención de Biotecnología y Bioingeniería. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo- Perú. 2003. 47 p.

40. Michaud, L.; Giudice, A.; Saitta, M.; De Domenico, M.; Bruni, V. The biodegradation efficiency on diesel oil by two psychrotrophic Antarctic marine bacteria during a two month log experiment. *Marine Poll. Bult.*; 2004. 49: 405-409.
41. Urum, K. Pekdemir, T. Gopur, M. Optimum conditions for washing of crude oil-contaminated soil with biosurfactant solutions. *Process Safety and Environm Protect: Transact of the Institut of Chem Engin.*2003; 81:203–209.
42. Zhang, G.; Wu, Y.; Qian, X.; Meng, Q. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University Science*; 2005. 6B (8):725-730.
43. Robert, M.; Mercadé, M.; Bosch, M.; Parra, J.; Espuny, M.; Manresa, A. *et al.* Effect of carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*44T1. *Biotechnol.Lett*; 1989. 11: 871-874.
44. Holmboe N., Kristensen E.; Andersen F. Anoxic decomposition in sediments from a tropical mangrove forest and the temperate wadden sea: implications of N and P additions. *Estuar. Cost. Shelf S.*; 2001. 53: 125-140.
45. Hoff, R. Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup. *Marine Pollution Bulletin*; 1993. 29: 476-481.
46. Norman, R.; Frontera, R.; Morris, P. Variability in *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide expression during crude oil degradation. *Appl Environ Microbiol.*; 2002. 68(10):5096-103.
47. Arino, S. MarchaL, R. Vandecasteele,J. Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *J Appl Microbiol*; 1998. 84(5):769-76.
48. Van Bailen, J.; Li, Z.; Duetz, W.; Smit, T; Witholt, B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & Gas Sc. Technol.*; 2003. 58: 427-440.
49. Sharma, S.; Pant, A. Biodegradation and conversion of alkanes and crude oil by a Marine *Rhodococcus sp.* *Biodegr.* ; 2000.11:289-294.
50. Pérez, R. Abad, G. Abalos, A. Marañón, A. Bermúdez, R. Biodegradación de naftaleno por *Pseudomonasaeruginosa* AT18. *Tecnología Química*, 2003. 23 (3): 21-27.
51. Kanaly, R. Harayama, S. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *J Bacteriol.* 2000; 182(8): 2059–2067.

