

## Optimización de la degradación de la parafina P-1 por *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1

Gloria Cuellar Orozco, Gabriel Pineda Flores y Rosa Salgado Brito

Universidad Simón Bolívar

### Resumen

Se optimizó la degradación de la parafina P-1 por *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 en cultivo mineral sumergido. El crecimiento microbiano se determinó por cuenta viable y la mineralización de la parafina por el método de Winkler para CO<sub>2</sub>. Se evaluó el efecto de la concentración de la fuente de carbono (parafina P-1), de la fuente de nitrógeno y de la concentración de un tensoactivo no iónico sobre el crecimiento de la cepa MGP-1 y la mineralización de la fuente de carbono.

La mayor degradación de la parafina P-1 se obtuvo con 5 g/l de parafina P-1, NH<sub>4</sub>Cl como fuente de nitrógeno y una concentración de 3mM del tensoactivo no iónico a una temperatura de 28 °C.

**Palabras clave:** *pseudomonas aeruginosa*, parafinas, biodegradación

### Abstract

The degradation of the paraffin P-1 for *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 in submerged mineral culture was optimized. The microbial growth was determined for viable count and the paraffin mineralization for CO<sub>2</sub> Winkler's method. The effect of carbon source concentration, nitrogen source type and nonionic surfactant concentration were evaluated on the strain MGP-1 growth and the mineralization of carbon source.

The major degradation of paraffine P-1 was obtained a 28 °C with 5 g/l of carbon source, NH<sub>4</sub>Cl and 3 mM of nonionic surfactant.

**Keywords:** *pseudomonas aeruginosa*, paraffines, biodegradation

### Introducción

La contaminación del medio ambiente es un problema que afecta la salud de las personas y los organismos que lo habitan; también disminuye la calidad y disponibilidad de las materias primas de las que dependemos para producir productos y servicios. En México la actividad de extracción, transporte y procesamiento de petróleo está dentro de las cinco primeras causas que deterioran la calidad

del ambiente, en donde los derrames de petróleo son muy conocidos por sus efectos contaminantes (Grimaldo, 1997; Salgado-Brito, 1998).

Algunos de los componentes del petróleo que ocasionan dicha contaminación son los hidrocarburos. Una vez que se derraman en el mar o en las aguas superficiales, forman una película o capa gruesa compacta e impermeable que evita el crecimiento de organismos acuáticos como aves, mamíferos y

plantas, ya que obstruye el intercambio gaseoso que impide la respiración y desvía los rayos luminosos necesarios para la fotosíntesis (Ruza et al., 1984). De entre los compuestos que forman al petróleo, las parafinas y los alcanos lineales en general, favorecen la formación de las películas debido a su baja solubilidad en agua y alto peso molecular.

El petróleo derramado en el ambiente se degrada por procesos físicos, químicos y biológicos (Bouchez-Naitalf et al., 1998), dentro de estos últimos la actividad metabólica de los microorganismos es fundamental para que el derrame pueda ser eliminado. Existen diferentes géneros de microorganismos degradadores de petróleo como *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Artrobacter sp*, *Bacillus sp*, *Corynebacterium sp*, *Clostridium sp*, entre otros (Salgado-Brito, 1998; Valderrama, 1999; Salgado-Brito et al., 2007).

La degradación de alcanos del petróleo por actividad microbiana es un proceso que ha sido estudiado con detalle (Yasuyoshi et al., 1994; So y Young, 1999; Throne-Holst et al., 2006), demostrándose que existen diferentes géneros microbianos que poseen la capacidad de degradar parafinas, como *Acinetobacter sp*, *Candida lipolytica* y *Mycobacterium sp*. (Crolla y Kennedy, 2004; Ollar et al., 1990). Dentro de esta actividad el género *Pseudomonas* es el más referido por su capacidad para la degradación de n-alcanos (Salgado-Brito et al., 2007) y las especies que más se han estudiado son *P. putida*, *P. fluorescens* y *P. aeruginosa*. (Singer y Finerty, 1984; Smits et al., 2002) y *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 (Cuellar y cols., 2004). Sin embargo, existen escasas evidencias de que *Pseudomonas aeruginosa* posee la capacidad de degradar parafinas con una longitud de 26 a 28 átomos de carbono y si la tiene, también se desconocen cuales serían las condiciones para estimular este proceso (Salgado-Brito et al., 2007).

## Objetivo

Determinar la concentración de la fuente de carbono, de tritón X-100 y la fuente de nitrógeno que se requieren para mejorar la degradación de la parafina P-1 por *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 en cultivo sumergido.

## Método

**Medio de cultivo y ajuste del inóculo.** Se utilizó el medio de cultivo mineral M9 (composición todo en g/l:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2.0,  $\text{NaCl}$  0.50,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.49 y  $\text{CaCl}_2$  0.01). El medio se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos, una vez frío se le adicionaron las soluciones de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CaCl}_2$  que fueron previamente esterilizadas en las mismas condiciones (Cuellar y cols., 2004).

Como fuente de carbono se utilizó la parafina P-I (punto de fusión 56-61 °C) y se adicionó al medio de cultivo en una concentración de 5 g/l antes de esterilizarlo (Cuellar y cols. 2004). El inóculo fue un cultivo *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 desarrollado en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio M9 con 5 g/l de parafina P-I a 28 °C con agitación magnética y ajustado a  $\text{DO}_{625} = 0.2$  (equivalente a  $6.3 \times 10^4$  UFC/ml) en un espectrofotómetro de luz visible y UV Baush and Lomb.

**Determinación de la cinética de crecimiento de la cepa MGP-1 con la parafina P-I como única fuente de carbono y energía.** Se utilizó un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio M9 preparado como se describió en la sección anterior y adicionado con una alícuota de 0.1 ml de inóculo ajustado como previamente se ha descrito (Cuellar y cols., 2004).

El cultivo se incubó a 28 °C con agitación magnética durante 16 días, y el crecimiento microbiano se determinó por cuenta viable en agar soya triptica-seína (AST). Como testigos negativos se utilizaron dos matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio M9, uno contenía parafina P-I en la misma proporción mencionada sin el inóculo y el otro con el inóculo sin la parafina.

**Evaluación de la mineralización de la parafina P-I por la cepa MGP-1.** La degradación de la parafina se evaluó utilizando el dispositivo ISO9439 y midiendo la producción de  $\text{CO}_2$  mediante la técnica de Winkler (Pineda-Flores et al., 2004)

**Determinación del efecto de la concentración de la fuente de carbono, de nitrógeno y de la concentración de Tritón X-100 sobre la degradación de la parafina P-I por la cepa MGP-1.** Las condiciones evaluadas y sus magnitudes se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones evaluadas sobre la mineralización de la parafina P-I por la cepa MGP-1

Variable	Magnitudes o compuestos evaluados
Concentración de la fuente de carbono (g/l)	1, 2.5, 5 y 7.5
Fuente de nitrógeno (2 g/l)	KNO <sub>3</sub> , NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> y NH <sub>4</sub> Cl
Concentración de Tritón X-100 (5 ml/l de la concentración en mM)	0.5, 1, 2 y 3

Para evaluar el efecto de cada variable se utilizaron dos sistemas de dos matraces Erlenmeyer de 250 ml, uno para medir el crecimiento de la cepa (las condiciones de incubación fueron las mismas aplicadas para obtener la cinética de crecimiento de la cepa MGP-1) y el segundo para evaluar la mineralización de la parafina de la manera descrita anteriormente. Los muestreos se realizaron cada tercer día durante dos semanas.

Para el caso de la determinación del efecto del Tritón X-100 se prepararon dos testigos por cada concentración evaluada para determinar si este compuesto puede servir como fuente de carbono y energía para la cepa MGP-1. Un testigo contenía 100 ml del medio M9, 2 g/l de NH<sub>4</sub>Cl, 5 ml/l de Tritón X-100 a una concentración de 3mM y el inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* MGP-I sin parafina y el segundo con 100 ml del medio M9, 5 g/l de parafina P-I, Tritón X-100 a una concentración de 3mM y 2 g/l de NH<sub>4</sub>Cl sin el inóculo de la cepa MGP- (Salgado-Brito, 1998).

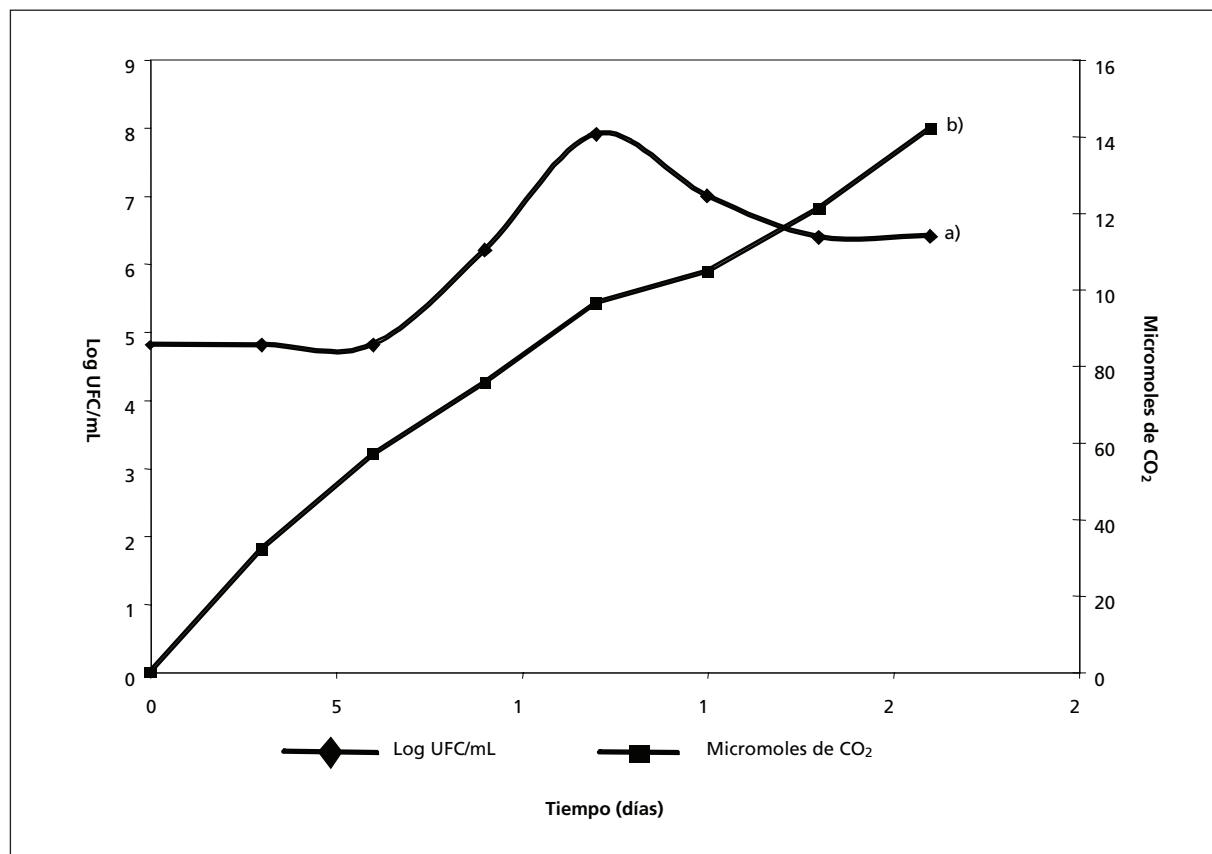
**Optimización de la degradación de la parafina P-I por la cepa MGP-1.** Una vez determinado el efecto de la concentración de la fuente de carbono, de nitrógeno y de la concentración de Tritón X-100 sobre la degradación de la parafina P-I por la cepa MGP-1, se procedió a optimizar la mineralización de la parafina aplicando de manera simultánea las magnitudes de las variables evaluadas que propiciaron el mayor crecimiento de la cepa MGP-1 y que produjeron la mayor cantidad de CO<sub>2</sub> de forma individual.

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml los cuales contenían 100 ml del medio de cultivo M9, 5 g/l de parafina P-1, 2 g/l de NH<sub>4</sub>Cl, 2 ml/l de Tritón X-100 3mM y 0.1 ml del inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 ajustado como se describió al inicio de la sección. La mineralización de la parafina se determinó de conformidad con lo descrito anteriormente. Estas determinaciones se realizaron por duplicado de la misma forma que lo descrito por Salgado-Brito (1998).

## Resultados

En la figura 1 se presenta la cinética de crecimiento y de mineralización de la cepa MGP-1 con la parafina como única fuente de carbono y energía. En ella se observa una fase de inducción corta, posteriormente comienza el crecimiento microbiano a partir del día 6 y sigue en aumento hasta el día 9. Posteriormente se observa una disminución en el crecimiento hasta el día 20, pasando este tiempo comienza a aumentar nuevamente hasta llegar a una fase de estabilización a partir del día 28 (datos no mostrados en la gráfica). En el caso de la mineralización de la parafina P-I por la cepa MGP-1, se observa un aumento en la producción de CO<sub>2</sub> desde el inicio de la cinética y alcanzó el valor más alto al final de su desarrollo en donde se registró una producción de CO<sub>2</sub> de 1420 μmoles.

Figura 1. Cinética de crecimiento (a) y de mineralización (b) de *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 con la parafina P-I como única fuente de carbono y energía



En la figura 2 se muestran las cinéticas de crecimiento utilizando las diferentes concentraciones de P-I. Se observa que sólo la concentración de 5 g/l favoreció un crecimiento abundante de la cepa MGP-1. En el resto de concentraciones probadas su incremento en el crecimiento se mantuvo por debajo de esta concentración desde el inicio de la cinética.

Con relación a la mineralización se observa que con la concentración de 1 g/l se obtiene la menor producción de CO<sub>2</sub> (530 μmoles en 12 días) y la mayor producción se presentó con 5 g/l de la parafina (1400 μmoles de CO<sub>2</sub>). Como comportamiento general se aprecia que al aumentar la concentración de la parafina la producción de CO<sub>2</sub> es mayor.

El crecimiento de la cepa MGP-1 y la mineralización de la parafina P-1 con las diferentes fuentes de nitrógeno empleadas se muestran en la figura 3, donde se observa que el crecimiento más abundante se obtuvo al utilizar NH<sub>4</sub>Cl.

La mineralización de la parafina P-I por la cepa MGP-1 muestra que no existe una diferencia notable entre la degradación de la parafina con las tres fuentes de nitrógeno utilizadas. Se aprecia ligeramente que la mayor producción de CO<sub>2</sub> se presentó con el NH<sub>4</sub>Cl posteriormente con KNO<sub>3</sub> y por último con el NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

Figura 2. Cinéticas de crecimiento (a) y de mineralización (b) de *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 con diferentes concentraciones de parafina P-I

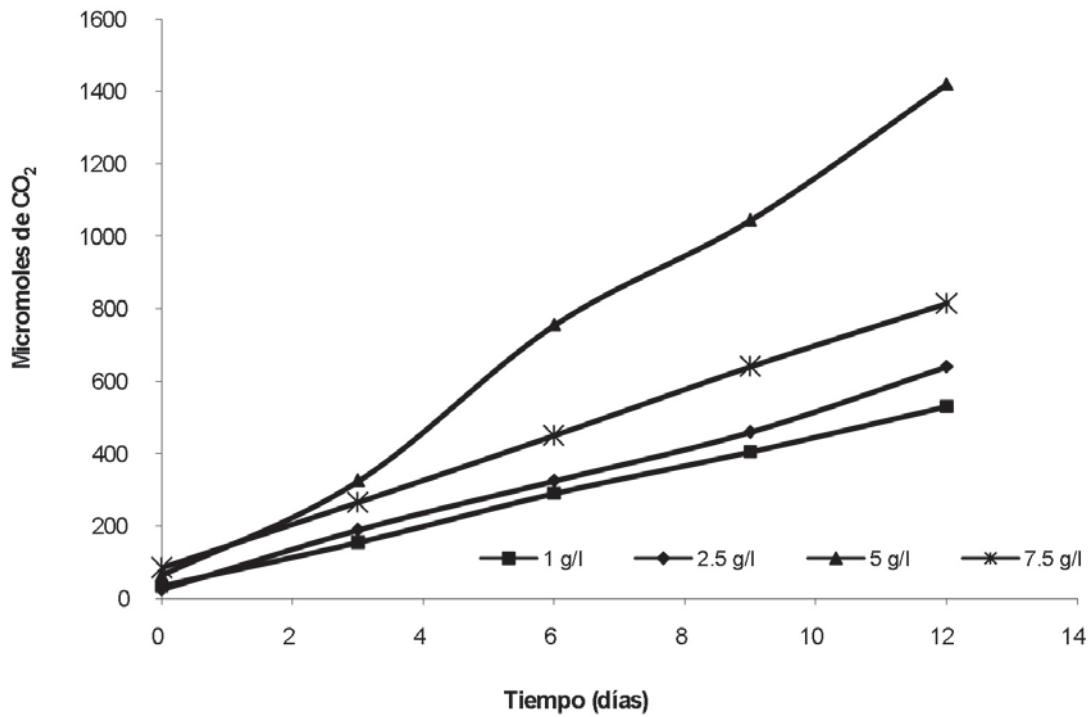
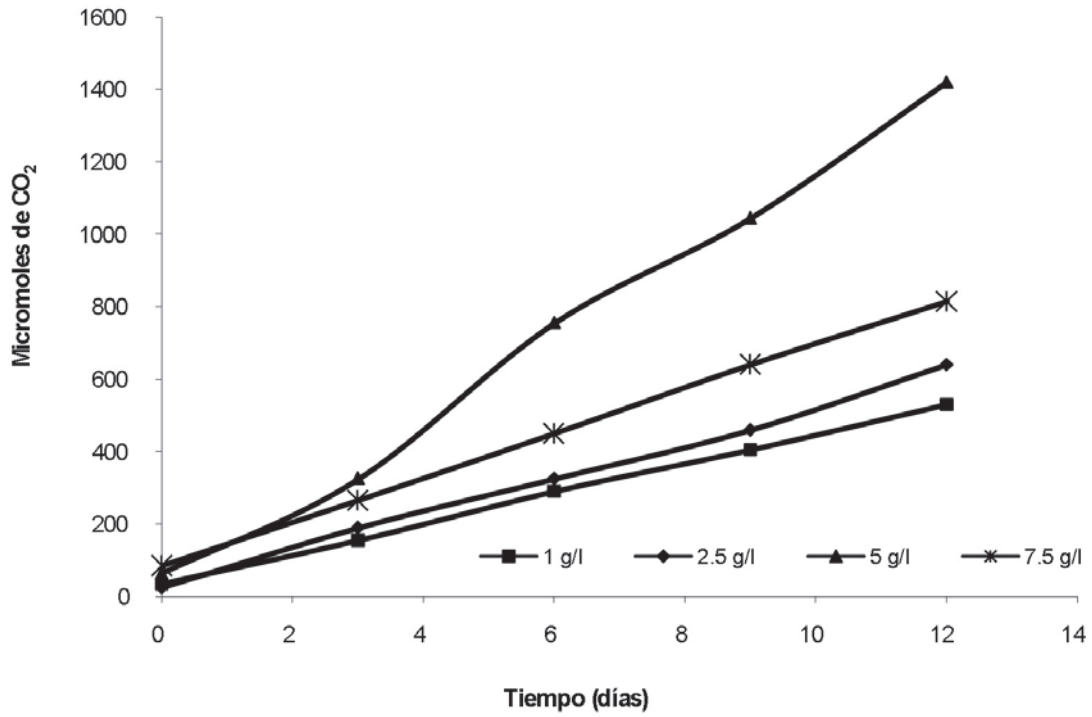
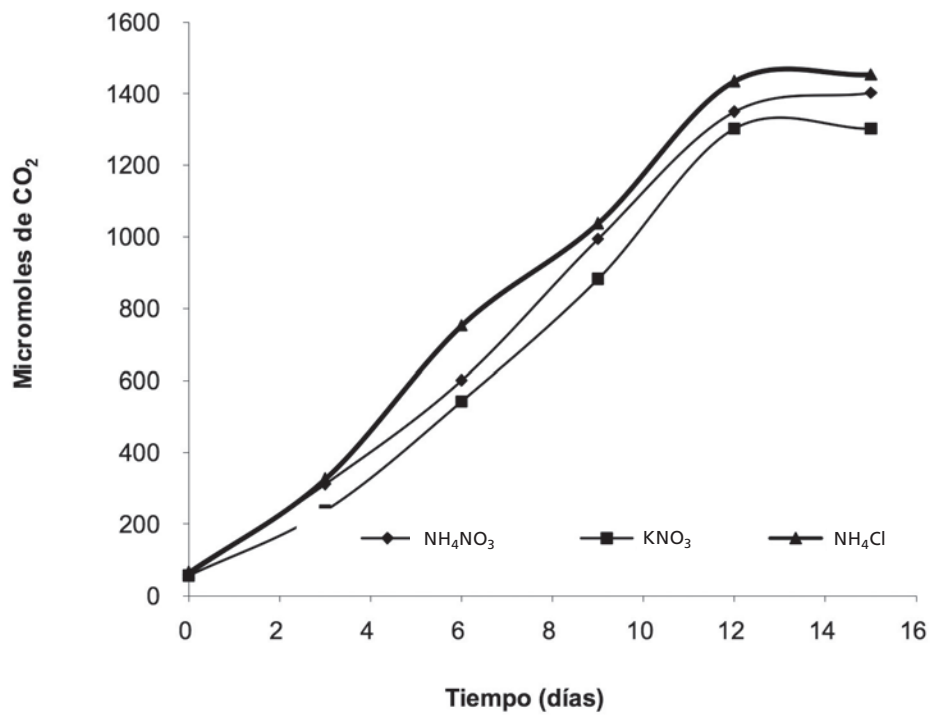
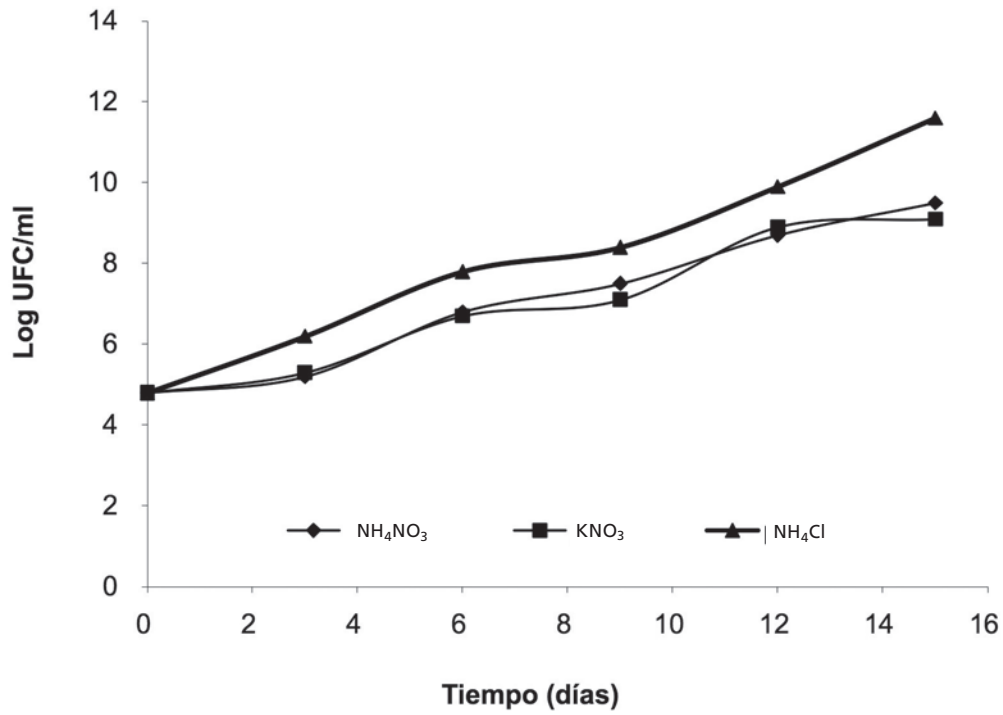


Figura 3. Cinéticas de crecimiento (a) y mineralización (b) de *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 con diferentes fuentes de nitrógeno



En la figura 4 se muestra la cinética de crecimiento y de mineralización de *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 con las diferentes concentraciones de Tritón X-100. Se observa que las gráficas siguen la misma tendencia: el número de colonias de *Pseudomonas* va en aumento conforme al paso del tiempo. El crecimiento observado es proporcional a la concentración de Tritón X-100 empleada: a mayor concentración de tensoactivo el crecimiento de la cepa también es mayor.

La mineralización de la parafina P-1 con diferentes concentraciones de Tritón X-100 muestra que la degradación determinada es proporcional a la concentración de Tritón X-100 empleada: a mayor concentración de tensoactivo la producción de CO<sub>2</sub> también aumenta.

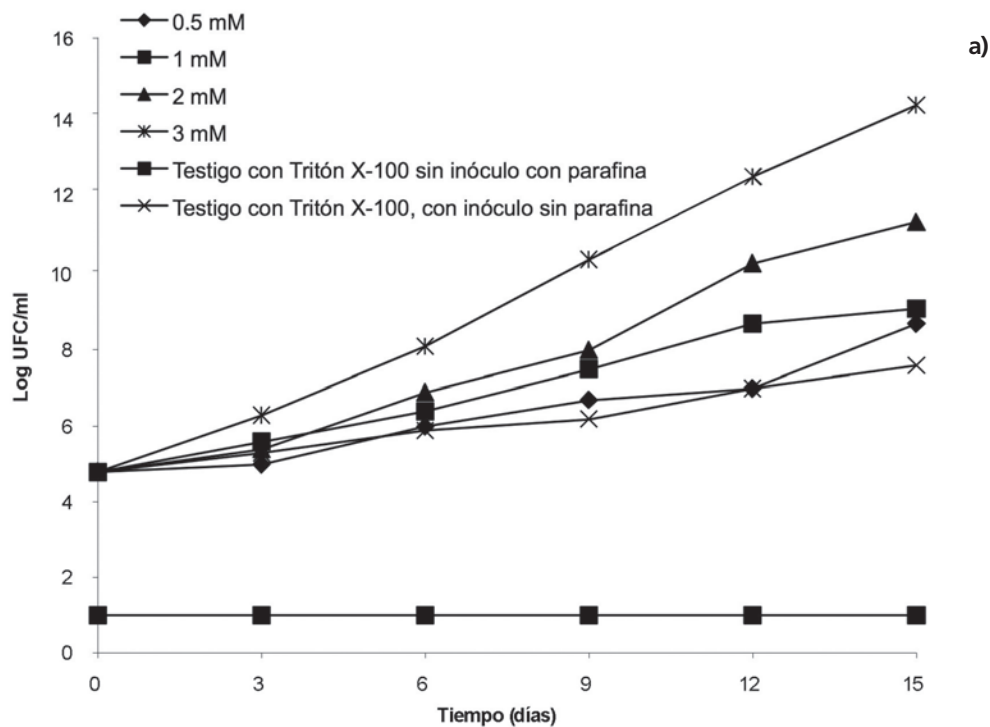
La figura 5 presenta la mineralización de la parafina P-1 por la cepa MGP-1, donde se observa que desde los primeros días se presenta una rápida producción de CO<sub>2</sub>, que va aumentando de manera gradual, determinándose una producción final de 1720 μmoles de CO<sub>2</sub>. La degradación de la parafina en condiciones sin optimizar determinó una producción de 1045 μmoles de CO<sub>2</sub>, y es un valor menor que el obtenido en la optimización.

## Discusión

En el presente trabajo se confirma que la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 tiene la facultad para utilizar a la parafina P-1 como única fuente de carbono y energía ya que es capaz de crecer y mineralizar a este sustrato (figura 1) (Cuellar y cols. 2004).

Los resultados muestran que la mineralización de la parafina es proporcional a su concentración (figura 2); se cuantificó la mayor producción de CO<sub>2</sub> con las concentraciones de 5 y 7.5 g/l. Con esta última se registraron 925 μmoles de CO<sub>2</sub> como valor máximo y es menor al obtenido con la concentración de 5 g/l. Este hecho puede originarse por la baja solubilidad en agua y a la tendencia de formar agregados de la parafina P-1 cuando aumenta su concentración en medio líquido, lo que dificulta la disponibilidad de este sustrato para la cepa MGP-1 y provoca una menor degradación.

Figura 4. Cinética de crecimiento (a) y de mineralización (b) de *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 con diferentes concentraciones de Tritón X-100



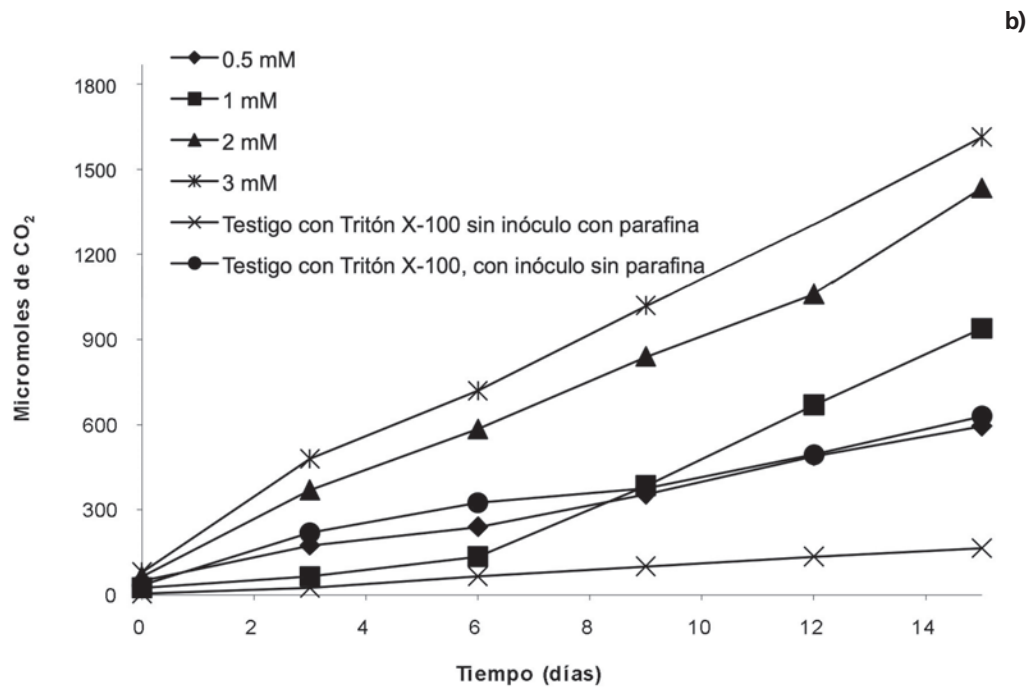
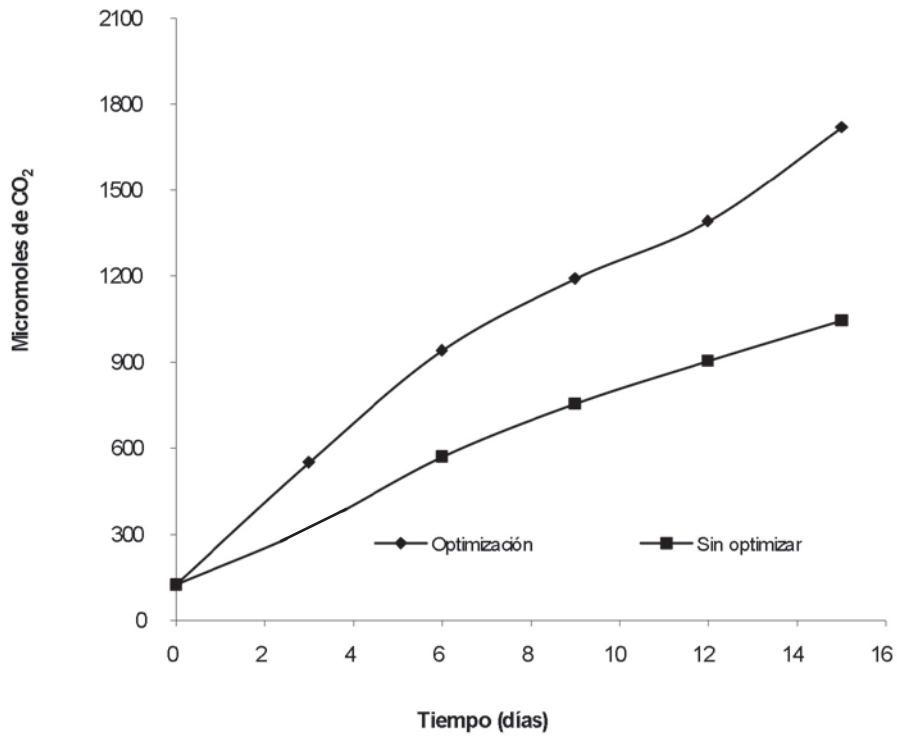


Figura 5. Optimización de la degradación de la parafina P-I por *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1






La aplicación de una fuente de nitrógeno y tensoactivos para estimular la biodegradación del petróleo crudo es un proceso que ha dado resultados favorables (Wrenn e .al., 1994; Salgado-Brito, 1998), por lo que se decidió probar el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno y concentración de Tritón X-100 sobre la mineralización de la parafina P-I. De acuerdo con los resultados,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  favorecen la mineralización de la parafina (figura 3) y se observa que el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  produce el mayor crecimiento de la cepa MGP-1. Esta fuente de nitrógeno forma parte de la formulación de otros medios de cultivo que han sido empleados con éxito para degradar otros hidrocarburos del petróleo por actividad microbiana (Salgado-Brito, 1998; Pineda-Flores et al., 2004).

El Tritón X-100 es un tensoactivo no iónico y no tóxico para los microorganismos y se ha utilizado para estimular con éxito la degradación de fenantreno por las cepas *Sphingomonas yanoikuyae* B8/36 y *Pseudomonas sp* (Allen et al., 1999), sin embargo no se ha evaluado la función del Tritón X-100 sobre la degradación de parafinas. Las cinéticas de la figura 4 muestran que *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 tiene un mejor crecimiento y mineralización de la parafina P-I con una concentración de 3mM del tensoactivo, incluyendo a los testigos empleados. Con esto se confirma que la adición de Tritón X-100 en cultivo sumergido favorece la degradación de la parafina P-I (Salgado-Brito, 1998).

De acuerdo con los resultados anteriores, se seleccionó la fuente de carbono de 5 g/l,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fuente de nitrógeno y el Tritón X-100 a 3mM para optimizar la degradación de la parafina P-I. En la figura 5 se observa claramente que se aumenta la producción de  $\text{CO}_2$  por la degradación de la parafina en las condiciones óptimas y esta diferencia se produce por la adición del tensoactivo, ya que el medio sin optimizar contiene tanto la misma concentración de parafina como la fuente de nitrógeno que el medio optimizado, iguales resultados al adicionar el tensoactivo han sido obtenidos por Salgado-Brito (1998).

## Conclusión

*Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 es capaz de mineralizar la parafina P-I; se establecieron las condiciones para aumentar este proceso en cultivo sumergido. La cepa y las condiciones reportadas podrían ser utilizadas para estimular la degradación y eliminación de derrames de petróleo con alto contenido de n-alcanos en ambientes acuáticos.

Por otra parte, para aumentar la utilidad de lo reportado será necesario demostrar que la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 es capaz de mineralizar la parafina P-I en condiciones diferentes al del cultivo sumergido, como en suelo o sedimento, para ampliar su aplicación a este tipo de ambientes contaminados. 

## Referencias

- Allen, C.R.; Boyd, D.R.; Hempenstall, F.; Larkin, M.J. y Sharma, N.D. (1999). Contrasting Effects of a Nonionic Surfactant on the Biotransformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to cis-Dihydrodiols by Soil Bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (Vol. 3), 1335–1339.
- Bouchez-Naitalf, M.; Rakatozafy, H.; Marchal, R.; Leveau, J.Y. y Vandecasteele, J.P. (1998). Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *J. Appl. Microbiol.*, 86, 421-428.
- Crolla, A. y Kennedy, K.J. (2004). Fed-batch production of citric acid by *Candida lipolytica* grown on n-paraffins. *J Biotechnol.*, 110 (Vol. 1), 73-84.
- Cuellar Orozco, G.; Mesta-Howard, A.; Pineda, F. G. y Salgado-Brito, R. (2004) Degradación de parafinas por *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1. *Revista de Investigación Universitaria Multidisciplinaria de la Universidad Simón Bolívar*, Vol. 6. p 41-46.
- Grimaldo, J.C. (1997). *Pseudomonas sp. MGP-1 como posible agente de recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos*. Tesis de maestría en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Ollar, R.A.; Dale, J.W.; Felder, M.S. y Favate, A. (1990). The use of paraffin wax metabolism in the speciation of *Mycobacterium avium-intracellulare*. *Tubercle* 71 (Vol. 1), 23-8.
- Pineda-Flores, G.; Boll-Argüello, G.; Lira-Galeana, C. y Mesta-Howard, A.M. (2004). A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltene as a carbon and energy source. *Biodegradation*, 15, 145-151.

- Ruza, T.F.; Marques, V.B.; Fuentes, B.F.; Alvarez, A.; Torralba, C.; Gómez, A.; Sarda, F.; Salcedo, F.; Villaverde, M.; Martín, F.; Montero, M. y Sanz, J.M. (1984). *Tratado del Medio Ambiente*. Buenos Aires: E.R. LAFER.
- Salgado-Brito, R. (1998). Consorcio Microbiano Degradador de petróleo maya, Tesis de maestría en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Salgado-Brito, R.; Neria, M.I.; Mesta-Howard, A.M.; Díaz, C.F. y Wang, E.T. (2007). Oxidation of soil paraffin (C11-40) by *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1. *Annls. Microbiol.* 57:3:321-328.
- Singer, M.E. y Finnerty, W.R. (1984). Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. En Atlas, R.M. *Petroleum Microbiology*, 2-32: McMillan Publishing.
- Smits, T. H. M.; Balada, S. B.; Witholt, B. y Van Beilen, J. B. (2002). Functional Analysis of Alkane Hydroxylases from Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *J. Bacteriol.* 1 (Vol. 184), 1733-1742.
- So, C. M. y Young, L. Y. (1999). Initial Reactions in Anaerobic Alkane Degradation by a Sulfate Reducer, Strain AK-01. *Appl. Environ. Microbiol.* 12 (Vol. 65), 5532-5540.
- Throne-Holst, M.; Markussen, S.; Winnberg, A.; Ellingsen, T.E.; Kottlar, H.K. y Zotchev, S.B. (2006). Utilization of n-alkanes by a newly isolated strain of *Acinetobacter venetianus*: the role of two AlkB-type alkane hydroxylases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72 (Vol. 2), 353-60.
- Valderrama, B.B. (1999). Microbiología del petróleo y sus derivados. *Microbios en línea*. Recuperado el 24 de octubre de 2004, en [www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap2](http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap2)
- Wrenn, B.A.; Haines, J.R.; Venosa, A.D. y Kadkhodayan, M.S.M. (1994). Effects of nitrogen source on crude oil biodegradation. *J. Industrial Microbiol.* 13, 279-286.
- Yasuyoshi, S.; Jun, H.M.; Yoshiki, T. y Nobuo, K. (1994). Use of Long-chain n-Alkanes (C<sub>13</sub>-C<sub>44</sub>) by an isolate, *Acinetobacter* sp M-1. *Osci Biotec. Biochem.* 58, 2128-2130.