

2ej 151

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

"BIODEGRADACION DEL MATERIAL BITUMINOSO"

TESIS PROFESIONAL

IRMA PATRICIA RODEA CASTRO

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGIA

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

TEXTO	Págs.
RESUMEN	
I. INTRODUCCION	1
I.1 ANTECEDENTES	2
I.2 OBJETIVOS	12
II. MATERIAL Y METODOS	13
III. RESULTADOS	30
III.1 OBSERVACIONES	33
IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES	37
V. BIBLIOGRAFIA	42
ILUSTRACIONES	Entre págs.
DIAGRAMA NO. 1	11 y 12
TABLAS Y GRAFICAS	30 y 33

AGRADECIMIENTOS

Quiero hacer patente mi agradecimiento sincero a todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron para facilitarme el desarrollo de este trabajo de tesis .

De la División de Corrosión de la Subdirección de Tecnología de Explotación del Instituto Mexicano del Petróleo muy especialmente al Ing. Manuel Felipe Guerrero , quien me brindó todo género de facilidades para la ejecución de este trabajo; y al Q.B.P. Rafael García Esquivel , director de esta tesis .

A la Dra. Aurora Brunner, a los Ingenieros Químicos Marco Antonio Ortiz y Felipe Serrano , de quienes recibí sugerencias valiosas y ayuda en el empleo de aparatos especiales .

A todos mis amigos y compañeros de trabajo de quienes siempre recibí ayuda afectuosa y efectiva .

Guardo un lugar especial a mi familia a quien con todo cariño dedico mis esfuerzos .

RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo con el objeto de verificar el grado de deterioración por la influencia de microorganismos en recubrimientos de tipo bituminoso , que se emplean para proteger la tubería subterránea .

Este estudio se basó en tres pruebas en las cuales se permite comprobar la acción directa de los microorganismos en cuatro tipos de recubrimientos bituminosos .

Las pruebas que se realizaron fueron : la pérdida de peso del material bituminoso, considerada como prueba tentativa ; el crecimiento microbiano , teniendo como única fuente de carbono al material bituminoso en un medio mineral y la prueba de medición de consumo de oxígeno que se empleó como una medida indirecta del metabolismo microbiano en un material bituminoso, adicionado a un medio mineral. Por último, se realizó una tipificación de tres colonias, aisladas del medio alquitránico y asfáltico .

Los resultados registrados de este trabajo y obtenidos en los estudios físicos y químicos de los materiales antes mencionados

darán una pauta para tener un mejor control de la corrosión o bien para una posible sustitución de otros recubrimientos, que basados en estudios ecológicos, presenten mas ventajas que los empleados actualmente.

I. INTRODUCCION

Con el desarrollo de la Industria Petrolera en México, surgió la necesidad de emplear tuberías metálicas en la red de distribución de gasoductos y oleoductos; estas tuberías están equipadas con un recubrimiento que evita la corrosión del material metálico.

Desde hace aproximadamente treinta años se han venido empleando diversos tipos de material bituminoso comercial, principalmente varios tipos de asfalto y alquitrán de hulla.

Actualmente, a través del Instituto Mexicano del Petróleo, se han encausado estudios en relación a los procesos de interacción de los factores físicos, químicos y biológicos que afectan la función de estos recubrimientos, así como el grado en que son dañados. Atendiendo a los factores biológicos que comprenden la degradación de la superficie del material bituminoso y/o metálico de los ductos, causada principalmente por hongos y bacterias comúnmente encontrados en el suelo, el presente trabajo pretende evaluar el grado de susceptibilidad de los diversos tipos de materiales bituminosos comerciales (tales como alquitrán de hulla, asfalto y cintas de asfalteno y polietileno), ante la acción de los microorganismos aislados

de los medios por los cuales atraviesan la red de distribución de gasoductos y oleoductos, con el objeto de apoyar los estudios físicos y químicos realizados sobre el deterioro de dichos recubrimientos.

I.1 ANTECEDENTES

Una tubería de acero sin recubrir está expuesta al medio terrestre y/o marino por el cual atraviesa ; cuando está sumergida requiere de gran cantidad de corriente para efectos de protección catódica. Estos requerimientos de corriente eléctrica para grandes extensiones de tubería de acero pueden ser reducidos a cantidades prácticas si la tubería se protege con recubrimientos orgánicos no conductores, de manera que quede el mínimo de superficie de acero sin recubrir. Evitando de esta manera que se generen diferencias de potencial a lo largo de la superficie en las que se establecen celdas galvánicas, formadas por dos zonas, una de alto potencial (cátodo) y una de bajo potencial (ánodo), lugar donde se libera el ion ferroso; de esta manera se genera la corrosión que es un proceso de degradación . (15) (10)

Dentro de los primeros mecanismos para el control de la corrosión está la interposición de una película protectora entre el

material y sus alrededores; de esta manera se emplean los recubrimientos que comprenden principalmente :

i) Recubrimientos metálicos.- Que incluyen cualquiera de los metales no ferrosos , con excepción de los metales alcalinos y los alcalinotérreos.

ii) Recubrimientos inorgánicos.- Consisten en esmaltes vítreos, cementos, concretos y productos arcillosos.

iii) Recubrimientos orgánicos.- Comprende pinturas, lacas, esmaltes, aceites, ceras y bitúmenes. Estos últimos incluyen asfaltos y alquitranes, que son agregados complejos de moléculas bastante grandes de hidrocarburos que contienen oxígeno, azufre, nitrógeno y metales como el vanadio y el níquel principalmente. (6) (25)

Tanto los recubrimientos orgánicos como los inorgánicos , se aplican a ductos equipados con protección catódica, preferentemente en tuberías enterradas y/o sumergidas. La protección catódica consiste en imprimir corriente a través de un circuito eléctrico externo o sistema de ánodos de sacrificio a la superficie metálica invirtiendo el sentido de flujo de electrones y evitando así la disolución del hierro, considerando el proceso de corrosión del acero como un flujo de electrones que abandonan la superficie metálica,

con la consecuente disolución del acero en forma de iones fierro(Fe^{++}).

Los recubrimientos orgánicos actúan como barreras físicas aislando los elementos corrosivos del medio ambiente a partir de la superficie del metal. Estos elementos corrosivos se pueden separar en factores físicos, químicos y biológicos que actúan sobre el recubrimiento. (2)

Dentro de los factores de tipo físico están los fenómenos mecánicos, que en sentido general pueden modificar el estado de superficie de un recubrimiento por la presión y movimientos del suelo, causando su agrietamiento.

En los factores de tipo químico, los metales del medio ambiente reaccionan con los de la tubería, modificando la geometría de superficie y/o la composición química de un metal. (8)

Los factores biológicos comprenden la degradación microbiana, llevada a cabo por hongos, levaduras y principalmente por una gran variedad de bacterias que van desde las gram-positivas hasta las gram-negativas. (8) (20)

Hace mas de ochenta años, el botánico japonés Manabu Migoshi (1895) reportó que la parafina era atacada por hongos del género Botrytis cinerea ; posteriormente, Söngen (1906) , quien hizo el primer artículo serio sobre la microbiología de los hidrocarburos, vino a aclarar que la utilización de estos es muy empleada entre los microorganismos . Otros materiales que incluyen los bitúmenes tales como asfalto, alquitrán, resina, brea ; y polímeros como el caucho y algunos plásticos polivinil son atacados de varias formas por los microorganismos, los cuales están presentes en el agua, aire y suelo. (16) (19)

Fuhs (1961) enlistó aquellos microorganismos capaces de crecer en hidrocarburos como un solo recurso de carbono reportando un total de 26 géneros en su lista .

Cerca de setenta y cinco especies utilizan hidrocarburos alifáticos y cerca de veinticinco especies utilizan hidrocarburos aromáticos .

Los microorganismos que probablemente llevan a cabo la mayoría de la degradación de los hidrocarburos en la naturaleza son los siguientes :

Bacterias	Bacterias miceliales
<u>Achromobacter</u>	<u>Mycobacterium</u>
<u>Brevibacterium</u>	<u>Nocardia</u>
<u>Corynebacterium</u>	<u>Streptomyces</u>
<u>Flavobacterium</u>	
<u>Pseudomonas</u>	(19)

Las bacterias pueden crecer bien en tres o cuatro tipos de materiales comúnmente usados como recubrimientos, siendo el medio ambiente de los ductos favorable para la actividad microbiana. (Diagrama I) (12)

Las bacterias que utilizan hidrocarburos causan una degradación inicial en las protecciones, iniciando una cadena de alimento eventual que beneficia a muchas formas microbianas del suelo. (14)

Los hongos, incluyendo mohos y levaduras, se ha visto que son capaces de atacar asfaltos, constituyentes asfálticos y productos de la degradación del asfalto. Kester estudió una variedad de suelos donde encontró que varios actinomycetes crecen sobre muchos tipos de hidrocarburos. (13) (15)

Harris y Worley ejecutaron una serie de experimentos para determinar el efecto de varias bacterias sobre el asfalto, observando que ocurría un endurecimiento y ablandamiento del asfalto, dependiendo de la naturaleza de las bacterias presentes. La viscosidad de los asfaltos utilizados se incrementó bajo el efecto de los microorganismos Mycobacterium renae y Nocardia coelificans a una temperatura de 30 °C durante cuatro meses. (23) (25)

Los microorganismos atacan preferentemente las porciones de bajo peso molecular; la tasa de degradación de hidrocarburos de crece conforme se incrementa el peso molecular del sustrato. Por esta razón es mas rápida la pérdida en parafinas, isoparafinas, naf-tenos y mas lenta para compuestos aromáticos.

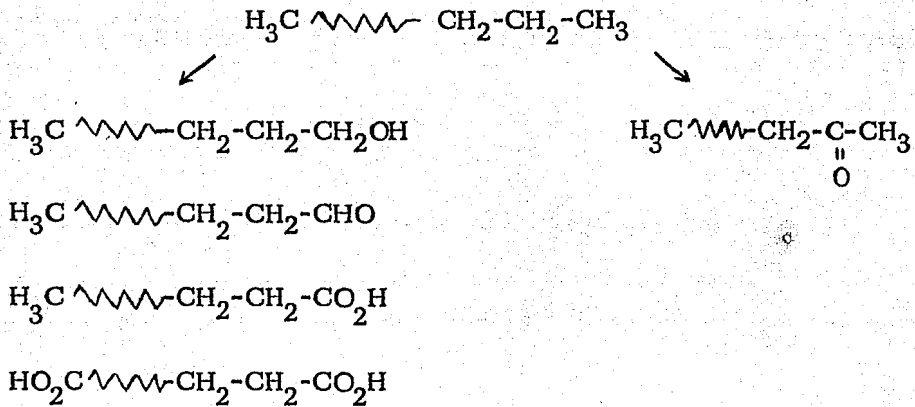
Metabolismo de Alcanos

Parecen ser tres los puntos de ataque oxidativo sobre una ca-
dena n-alcano.

a. Oxidación de un grupo metil terminal (C_1) que da sucesi-
vamente a un alcohol, un aldehído y un ácido carboxílico .

b. Oxidación de un penúltimo grupo metileno (C_2) para dar un metil-cetona.

c. Oxidación diterminal para dar un ácido α - ω -dicarboxílico.

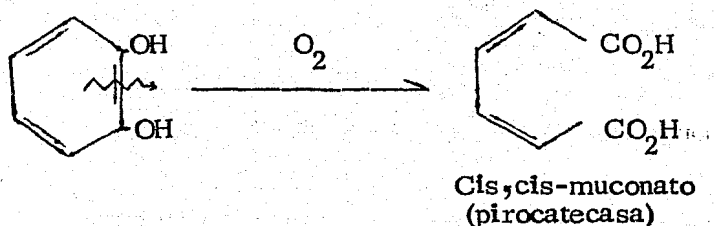


Principales puntos de ataque sobre los n-alcanos.

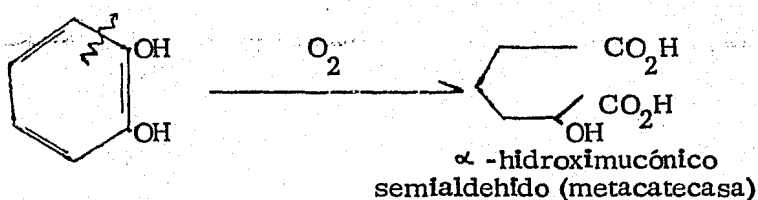
Metabolismo de los compuestos aromáticos

Hay dos tipos de rupturas en los anillos aromáticos que incluyen la acción de las enzimas dioxigenasa; esto puede ejemplificarse con la ruptura del catecol.

Reacción 1. Una enzima pirocatecasa rompe los enlaces c-c entre dos grupos OH e introduce dos átomos de oxígeno para dar Cis,cis-muconato :



Reacción 2. La enzima metacatecasa cataliza un enlace similar de reacciones pero rompe los enlaces entre un átomo de carbono hidroxilatado y un átomo de carbono no hidroxilatado para dar un hidroximucónico semi-aldehído. Ambas enzimas dependen del (Fe++) como co-factor :



Muchos investigadores han encontrado que el ataque bacteriano y fúngico en asfaltos e hidrocarburos es una reacción oxidativa. Los ácidos, aldehídos, ésteres, cetonas, alcoholes, olefinos y posiblemente hidrperóxidos , han sido detectados como productos intermedia -

rios de la oxidación microbiana sobre hidrocarburos. Los últimos productos de la oxidación microbiana son principalmente dióxido de carbono y agua. La acción avanzada de este ataque se atribuye a uno o mas de los siguientes factores :

- a. Pérdida de los aceites de bajo peso molecular.
- b. Conversión de los hidrocarburos de bajo peso molecular a compuestos oxigenados de alto peso molecular.
- c. Polimerización de compuestos no saturados que resultan a partir del ataque microbiano .

Zo bell establece que los cambios en las propiedades del aceite bajo la acción microbiana, es también debida en parte a la acumulación de células microbianas suspendidas en el aceite. (16)

El género Pseudomonas ha recibido atención respecto a la especificidad del sustrato ya que muestra preferencia por los alcanos de cadena recta. Las Pseudomonas se limitan a usar los n-alcanos (C_6-C_{22}) y alquenos (C_8 , C_{10} , C_{12} y C_{14}) siendo incapaces de crecer en cualquiera de los hidrocarburos aromáticos. Mycobacterium renae no es selectivo como las Pseudomonas; puede emplear n-alcanos, alquenos, ácidos grasos y todos los hidrocarburos aromáticos; utiliza una variedad de metil-etil y propil que han

substituido al benceno, pero no al benceno. (19) (23) (24)

La biodegradación aeróbica in vitro del alquitrán de hulla - por la cepa de Pseudomonas oleovorans da como resultado una intensa degradación de los alcanos siendo menos atacados los aromáticos. El crecimiento sobre compuestos aromáticos o acíclicos no es tan común como el crecimiento en los alcanos. (18) (19)

En conclusión, los compuestos de cadena larga son oxidados mas rápidamente que los de cadena corta. Los n-alcanos son oxidados mas rápidamente que los isoalcanos ; y los isoalcanos mas rápidamente que los cicloalcanos.

De esta manera, se observa un factor real de selectividad en la elección de un bítumen por un microorganismo dado; el origen de la especificidad observada es posiblemente la presencia de compuestos alifáticos y de los derivados substituidos del benceno que componen los bítúmenes utilizados en el curso de la biodegradación. (21)

(25)

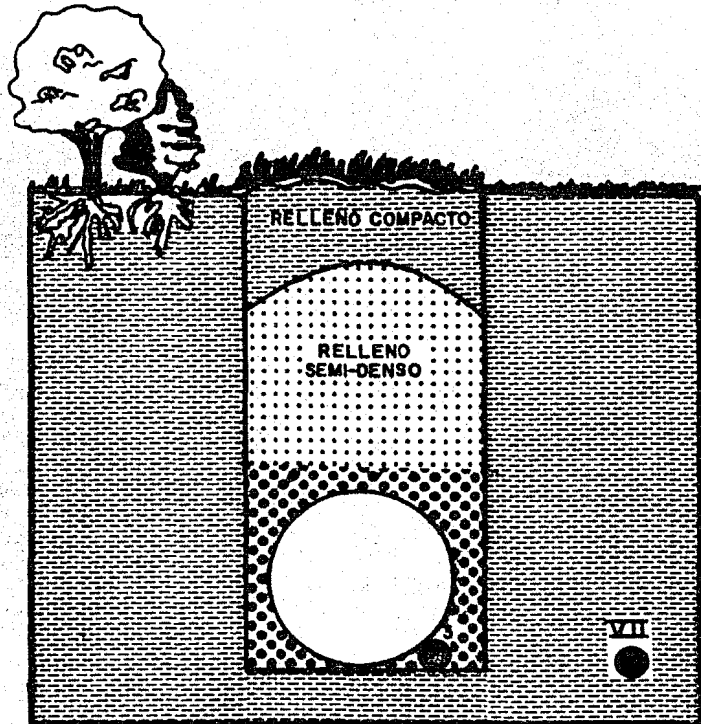


Diagrama 1.- Perfil de un corte en donde se muestra la tubería enterrada. La muestra 3 adyacente a la tubería presenta un desarrollo microbiano mayor que la muestra VII a la misma profundidad, separada de 3.65 m a 4.56 m, demostrando que las bacterias del suelo obtienen su alimento a partir del material de recubrimiento (Según Harris, J.O., 1960).

I.2 OBJETIVOS

1.- Verificar la degradación del material bituminoso por la acción de los microorganismos.

2.- Evaluar y comparar la susceptibilidad a la biodegradación de las diferentes muestras bituminosas, tomando como un índice de la susceptibilidad la pérdida de peso.

3.- Verificar la biodegradación del material bituminoso con diferentes métodos :

a.- Medición del consumo de oxígeno por el metabolismo microbiano en un medio mineral en donde la única fuente de carbono para el metabolismo sea proporcionada por el material asfáltico y alquitránico.

b.- Crecimiento de los microorganismos inoculando una población bacteriana inicial conocida en un medio mineral rico en material asfáltico y alquitránico como única fuente de carbono, llevando un registro cada 24 horas, durante un tiempo de 168 horas .

II. MATERIAL Y METODO

Para determinar el grado de susceptibilidad de las distintas muestras comerciales de asfaltos, alquitranes y cintas se seleccionaron tres medios distintos , simulando mediante un modelo los medios mas comunes en los cuales los ductos están en contacto.

Los paneles de las distintas muestras de material bituminoso se sometieron en cada uno de los siguientes medios :

- i) Medio acuoso : representando agua de mar
- ii) Medio terrestre:
 - a) Arena : representando zonas desérticas
 - b) Humus: representando zonas tropicales

Para evaluar la degradación de las muestras en los distintos medios se consideró la pérdida de peso de los paneles y con base a esta pérdida se determinó el porcentaje de biodegradación, graficándose dicho porcentaje en función del tiempo.

Como una prueba indirecta de la degradación del material bituminoso por los microorganismos (bacterias) se tomó en consideración

ción la medición del consumo de oxígeno, empleando el oxímetro (YSI Model 53 OXYGEN MONITOR).

Otra parte del método consistió en conocer la cinética de crecimiento de las bacterias para observar el comportamiento de la población, teniendo el material bituminoso como la única fuente de Carbono.

Como un apoyo para este estudio se consideró importante conocer el tipo de microorganismos que se desarrollaron bajo las condiciones ya establecidas, haciendo una tipificación de los microorganismos que se encontraron en la biodegradación de los materiales en estudio.

1.0 Cuantificación del material biodegradado por pérdida de peso en paneles de asfalto, alquitrán de hulla y cintas de asfaleno y polietileno.

El registro de la pérdida de peso en los paneles de las distintas muestras que estuvieron sometidas por un período de ocho meses en distintos sistemas (arena, agua y humus con una suspensión bacteriana) se tomó como un índice cuantitativo de la biodegradación.

Este método se llevó a cabo en tres etapas:

1.1 La primera etapa consistió en aislar los microorganismos de muestras de suelo que estuvieron en contacto con material asfáltico y alquitránico, así como también de agua de río.

1.1a De las muestras anteriores se propagaron los microorganismos en matraces que contenían medio mineral adicionado de caldo nutritivo y en medios sólidos como agar cuenta standard.

CUADRO I
Contenido del medio mineral con pH=6 (1)

Cloruro de sodio (NaCl).....	0.005 g/l
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	0.7 g/l
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	0.7 g/l
Nitrato de amonio (NH_4NO_3).....	1.0 g/l
Sulfato ferroso ($FeSO_4 \cdot 7 H_2O$).....	0.002 g/l
Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$).....	0.7 g/l
Sulfato de manganeso ($MnSO_4 \cdot 7 H_2O$).....	0.001 g/l
Sulfato de Zinc ($ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$).....	0.002 g/l

1.1b Posteriormente , los microorganismos aislados se inocularon en matraces (con capacidad de 500 ml) que contienen 200 ml de medio mineral (ver inciso 1.1a , Cuadro I) adicionados de alquitrán (1 g) y asfalto (1 g) pulverizado, siendo incubados a 30 ± 2 °C con aereación y agitación .

1.1c De los matraces que presentaron crecimiento se tomaron muestras , observándolas al microscopio y se monitorearon los matraces cada 48 horas para obtener una cinética cualitativa del crecimiento.

1.1d De cada uno de los matraces se hizo una resembranza en medios sintéticos adicionados de sales minerales, asfaltos y alquitranes con el fin de mantener un remanente para la siguiente etapa .

1.2 La segunda etapa consistió en someter los paneles de alquitrán de hulla, asfalto y cintas de asfaleno y polietileno en cada uno de los siguientes sistemas:

Ag-Bac. - Medio mineral con una determinada suspensión bacteriana .

Ar-Bac.- Arena estéril con una determinada su
pensión bacteriana.

Ter-Bac.- Humus sin esterilizar.

Estos sistemas se eligieron como un modelo para simular los distintos tipos de medio ambiente en los cuales es común la interacción recubrimiento-suelo.

1.2a Los paneles de prueba de las diferentes muestras se prepararon y etiquetaron (siendo secadas a 40°C y sometidas a alto vacío con el objeto de extraer toda humedad en las mue
stras) .

1.2b Todos los paneles se pesaron y se mantu
vieron en el desecador hasta su utilización.

1.2c El medio de cultivo mineral se preparó y se esterilizó mediante milipore de 0.45 μ de poro .

1.2d Preparación de los sistemas Ag-Bac, Ar-Bac y Ter-Bac.

Sistema Ag-Bac. Consistió en disponer en una charola de acrílico medio de cultivo mineral y una suspensión bacteriana de 100 ml , sellada con una membrana de celofán "Kleen Pack" que permite la transferencia de oxígeno e impide la pérdida de agua.

Sistema Ar-Bac. Consistió en disponer en una charola de acrílico arena estéril (habiendo sido sometida durante una semana a $120 \pm 2^{\circ}$ C) mezclada con medio de cultivo mineral y una suspensión bacteriana de 100 ml , sellada con una membrana de celofán "Kleen Pack" .

Sistema Ter-Bac. Consistió en un área de terreno de 2 m^2 de superficie , en la cual se removió parte de la tierra superficial para ser reemplazada por humus.

1.2e En cada sistema se sumergieron tres paneles de cada muestra; estos paneles fueron retirados cada dos meses, lavándose muy bien con cepillo y detergente (con el objeto de desprender la tierra adherida a la superficie de los paneles) sometiéndolos a $40 \pm 2^{\circ}$ C y al alto vacío durante tres horas para extraer la humedad absorbida, dejando los paneles durante 24 horas en el desecador. Posteriormente se pesaron , registrando los datos obtenidos

para determinar con ellos la pérdida de peso.

1.3 Al término de la segunda etapa de cada una de las pruebas , se separaron dos paneles de cada muestra ,cada una de las cuales se sometió a dos pruebas diferentes (prueba A y prueba B) con el fin de comprobar si el ataque era superficial y/o profundo .

Prueba A

Los paneles de cada una de las muestras se lavaron con agua destilada, dejando su superficie libre de tierra adherida; con un isopropil alcohol se limpió la superficie de los paneles, haciéndose un cultivo en placas de agar cuenta estándar, incubándose a una temperatura de $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 a 72 horas.

Prueba B

Los paneles restantes de cada una de las muestras se lavaron perfectamente con agua y jabón ; posteriormente se cortaron superficies de paneles de 1 cm^2 aproximadamente y se colocaron en una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 10 o/o usada como germicida, durante 10 minutos ; al término de este tiempo se lavaron en una solución estéril de fosfatos ($\text{pH}=7$) y se dispusieron los cuadros

en placas de agar para cuenta standard y agar dextrosa-papa , incubándolos a una temperatura de 30 ± 2 °C durante 48 a 72 horas.

2.0 Medición del consumo de oxígeno en la biodegradación empleando el oxímetro (YSI MODEL 53 OXYGEN MONITOR) .

La siguiente técnica se empleó como un índice de la degradación de asfaltos y alquitranes, basándose en la medición del consumo de oxígeno durante el proceso metabólico de las bacterias.

2.1 Descripción Ajuste y calibración del equipo

Se conectó el electrodo de Clark y se dejó funcionando durante media hora. El electrodo fué adaptado a una cámara con agitación que contenía medio mineral. Se ajustó el graficador y el galvanómetro hasta saturación de oxígeno y se verificó que coincidieran en cero. Una vez calibrado el equipo, se hizo la prueba de referencia.

Se adicionó a la cámara de agitación tres milímetros de muestra bituminosa de concentración conocida, con el objeto de comprobar que el consumo de oxígeno era ajeno a la muestra bituminosa , exenta de la suspensión bacteriana .

El paso anterior se mantuvo durante tres minutos para que el equipo se estabilizara; una vez estabilizado, se conectó el graficador y se dejó durante siete minutos.

Posteriormente, de la cámara se extrajo 1 ml de la muestra bituminosa, aforando 1 ml de la suspensión bacteriana y nuevamente se conectó el graficador dejándolo por siete minutos y se tomó la lectura.

Se extrajeron los 3 ml de muestra con suspensión bacteriana, lavando perfectamente la cámara y el electródo con agua destilada; los pasos anteriores se hicieron con cada una de las muestras de asfalto y alquitrán.

2.2 La metodología anterior se empleó solo con las muestras de alquitrán (M530 y M532) y de asfalto (M540, M557 y M559) no siendo posible hacerlo con las muestras de las cintas (M560 a M-563) debido a su difícil proceso de pulverización .

3.0 Método empleado para la cuenta viable de bacterias mesofílicas aerobias utilizando la técnica de vaciado en placa .

Como un respaldo al trabajo anterior, se llevó a cabo una

cinética de crecimiento, observando de esta manera el comportamiento de la población bacteriana bajo la condición de tener como única fuente de carbono a los asfaltos y alquitranes en combinación con un medio mineral. (Ver inciso 1.1a, Cuadro I)

3.1 Se empleó como inóculo 1 ml de suspensión bacteriana en cada una de las muestras; estas muestras se llevaron a incubación durante 168 horas con agitación y a temperatura ambiente (24°C) .

3.2 Cada 24 horas (24, 48, 72, 96 y 168 horas) se tomó una alícuota de 1 ml para llevar una cuenta viable de los microorganismos mediante la técnica de vaciado en placa que a continuación se describe .

3.3 Se preparó el material necesario (tubos de rosca, tubos de ensaye, cajas de Petri, pipetas de 1 ml y 2 ml) .

3.4 Se esterilizó el material a 120°C durante 24 horas .

3.5 Se elaboró una serie de diluciones seriadas

de 10^{-1} hasta 10^{-9} de acuerdo con el periodo establecido en la introducción del método .

3.6 De cada una de las dos últimas diluciones superiores de cada muestra tomada , se hizo un cultivo en placas de agar cuenta standard .

3.7 Cada una de las cajas de Petri se etiquetaron con los siguientes datos: fecha, muestra, horas, dilución y serie y se llevaron a incubación a 37°C durante 48 horas .

3.8 Después de cada 48 horas se llevó a cabo la cuenta correspondiente de cada muestra , haciéndose un registro con cada una de las muestras , graficando los datos en papel milimétrico.

4.0 Tipificación de las bacterias aisladas

Con el objeto de determinar qué tipo de bacterias se desarrollaron durante esta prueba en los medios alquitránico y asfáltico , se procedió a hacer una identificación en los sistemas API 20E identificando tres de las cuatro colonias aisladas.

PROCEDIMIENTO

4.1 De cada uno de los matraces empleados en la cuenta viable, se hizo una siembra en estría cruzada en placas de agar por duplicado , siendo incubados a 37°C durante 24 horas.

4.2 De todas las placas sembradas se observó crecimiento de cuatro diferentes colonias, las cuales se purificaron y se sembraron en tubos inclinados de agar standard .

4.3 De las cuatro diferentes colonias se eligieron tres para su tipificación.

4.4 Se observó bajo el microscopio láminas con tinción de Gram , así como preparaciones en fresco , observando la forma de los microorganismos.

4.5 El paso anterior se tomó como un complemento del sistema API 2OE

4.6 Sistema API 2OE

El sistema API 2OE está constituido de una colección de 20

microtubos y de un tubo OXI/FERM . Los 20 microtubos contienen los sustratos deshidratados, la suspensión bacteriana repartida en los microtubos disuelve los sustratos . Los metabolitos producidos son evidentes por las reacciones coloreadas o por adición de los reactivos después de 24 o 48 horas de incubación a 35°C- 37°C .

Sustratos API 20E

<u>ONPG</u>	Orthonitofenol
<u>URE</u>	Ureasa
<u>ADH</u>	Arginina hidrolasa
<u>TDA</u>	Triptofano desaminasa
<u>LDC</u>	Lisina descarboxilasa
<u>IND</u>	Indol
<u>ODC</u>	Ornitina descarboxilasa
<u>VP</u>	Voges-Proskauer(piruvato de Na creatina)
<u>CIT</u>	Citrato
<u>GEL</u>	Gelatina de Kohn
H ₂ S	Hidrógeno sulfuroso
GLU	Glucosa
MAN	Manitol
INO	Isositol
SOR	Sorbitol
RHA	Rhamnosa
SAC	Sacarosa
MEL	Melibiosa
AMY	Amigdalina
ARA	Arabinosa

Los reactivos usados para las pruebas de reacciones son los siguientes :

	Reactivo V.P.	
Hidróxido de Potasio	-----	solución al 40 %
α -naftol	-----	solución al 6% de α-naftol en alcohol etílico

Reactivo de Kovacs

Alcohol isoamílico puro	150 ml
Paradimetilaminobenzaldehído	10 g
Acido clorhídrico concentrado	50 ml

Cloruro férrico

Solución acuosa al 10%

Reactivo para nitratos

Acido sulfanílico al 0.8% en Acido acético 5N
1-Naftilamina al 0.6% en ácido acético 5N

Oxidasa

Tetrametil-p-fenileno diamina al 1% en alcohol isoamílico

Reactivo para Urea

Solución de urea al 20% (0.06 ml)
Buffer de fosfatos 0.025 M con pH=6.0
(Rojo fenol 0.06 ml)
Suspensión - 0.04 ml

Catalasa

Agua Oxigenada al 1.5%

4.7 Inoculación de las galerías del sistema API 20E

4.7a Ya bien aislada una sola colonia, se preparó una suspensión homogénea en 5 ml de agua destilada estéril.

4.7b Con la ayuda de una pipeta estéril se introdujo la suspensión en los tubos de la colección inclinando la caja para evitar burbujas .

Los microtubos marcados con CIT , VP y GEL fueron llenados completamente , tubo y cúpula . Los subrayados ADH , LDC , ODC y URE fueron llenados hasta el tubo y la cúpula fué sellada con aceite de parafina. Los restantes se llenaron solo hasta el tubo .

4.8 Después de la incubación (y de haber sido adicionados los reactivos requeridos) se tomó lectura de las reacciones de la colección .

4.9 Tubo OXI/FERM

El tubo OXI/FERM es un tubo en materia plástica estéril; los compartimientos permiten el diagnóstico diferencial de los gérmenes gram-negativos oxidantes y fermentantes. Una aguja transversal está unida para realizar el sembrado del sistema que comprende ocho medios de cultivo clásicos.

COMPARTIMIENTO	REACCION
ANA-DEX (dextrosa anaerobia)	Fermentación de la dextrosa
Arginina	Arginina dihidrolasa
N ₂ -Gas	Producción de Nitrógeno
H ₂ S- Indol	Producción de H ₂ S y del Indol
Xilosa	Oxidación de xilosa
AER-DEX (dextrosa aerobia)	Oxidación de dextrosa
Urea	Presencia de ureasa
Citrato	Utilización del citrato

4.10 Inoculación del tubo OXI/FERM

4.10a Previendo una colonia bien aislada, se tomó directamente con la punta de la varilla del tubo OXI/FERM y se sembró a lo largo del tubo, girando y retirando al mismo tiempo la varilla a través de los ocho compartimientos.

4.10b Se metió la varilla a través de cuatro compartimientos y en los cuatro compartimientos restantes se hicieron orificios (para las pruebas anaeróbicas respectivamente).

4.10c El tubo OXI/FERM fué incubado a 37°C durante 48 horas.

4.11 Ya anotadas todas las reacciones de la colección de microtubos , así como la del tubo OXI/FERM , los resultados fueron comparados con las descripciones del Manual Bergey's .

III. RESULTADOS

Biodegradación del material bituminoso

De acuerdo a las tablas y figuras presentes, se observa que en los sistemas Ar-Bac y Ag-Bac , las muestras del grupo de las cintas presentaron una mayor resistencia al ataque microbiano con respecto a las muestras del grupo de los asfaltos y alquitranes.

Dentro del grupo de las cintas , las cintas asfálénicas M560 y M561 presentaron una menor biodegradación que las cintas polietilénicas M562 y M563 (Ver Tabla 1, figs. I, Ia, IV y IV a) .

En el grupo de los asfaltos, los paneles de la muestra M540 presentaron mayor resistencia al ataque microbiano en ambos sistemas Ar-Bac y Ag-Bac ; en cambio, los paneles de las muestras M557 y M559 se vieron mas afectados por la biodegradación .(Ver Tablas 2, Figs. II, IIa , V y Va) .

Dentro del grupo de los alquitranes, en el sistema Ar-Bac , la muestra M532 presentó una mayor resistencia a la biodegradación con respecto a la muestra M530 ; el caso contrario ocurrió en el sistema Ag-Bac , donde la muestra M532 presentó menor resistencia a

la biodegradación con respecto a la muestra M530 (Ver Tabla 3 ,
figs. III, IIIa , VI y VI a)

Metabolismo de los microorganismos

En relación con la medición del oxígeno consumido por el metabolismo de los microorganismos , en un medio mineral, en donde de la única fuente de carbono fueron los materiales asfálticos y alquitránicos ; se observa en general un mayor consumo de oxígeno en las muestras alquitránicas M530 y M532 que en las muestras asfálticas M540 , M557 y M559 . Así , la muestra M530 presenta el máximo de consumo de oxígeno en un tiempo de 300 segundos y la muestra M540 el mnimo de consumo de oxígeno en el mismo tiempo con respecto a las muestras ya mencionadas (Ver Tabla 4, figs. VII y VIII) .

Crecimiento de los microorganismos

Grupo de los asfaltos

En el grupo de los asfaltos , en las muestras M540 y M557 , se observa una fase lag o de adaptación de las 0 horas a las 24 horas; posterior a esta fase lag se observa una fase de crecimiento logarítmico , que en la muestra M540 va desde las 24 horas a las 48 horas ; y a partir de este tiempo continúa un crecimiento lento hasta

las 96 horas , en donde la población tiende a un crecimiento logarftmico lento . En la muestra M557, después de la fase lag se observa una fase de crecimiento logarftmico que se prolonga hasta las 72 horas , en donde se inicia un máximo de población que permanece hasta las 96 horas ; a partir de este tiempo se observa una fase de decrecimiento poblacional . (Ver Tabla 5 , figs. X y XI)

La muestra de asfalto M559 presenta un crecimiento logarftmico a partir de las 0 horas hasta las 72 horas, en donde se observa un máximo de población y se inicia una fase lenta de decrecimiento poblacional . (Ver Tabla 5, Fig. XII)

Grupo de los alquitranes

La cinética de crecimiento presentada por los alquitranes M530 y M532 es similar, observándose de las 0 horas a las 72 horas una fase de crecimiento logarftmico , presentando un máximo a las 72 horas ; a partir de este tiempo se desencadena una fase de decrecimiento acelerado hasta las 96 horas , en donde se inicia un proceso muy lento de decrecimiento hasta las 168 horas . (Ver Tabla 5, figs. XIII y XIV)

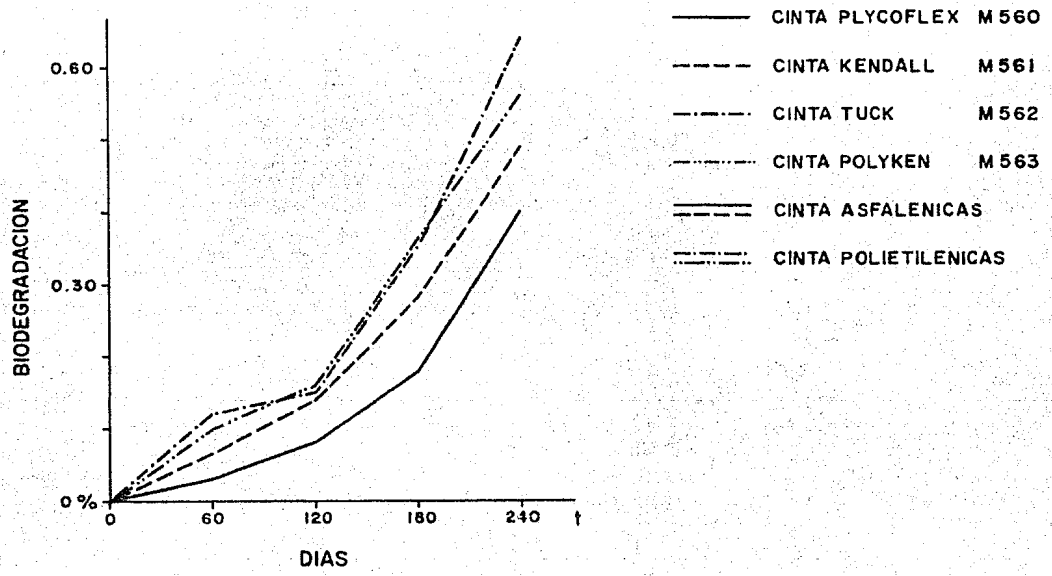


Fig. I.- Biodegradación de cintas asfálénica y polietilénica en el sistema Ar-Bac.

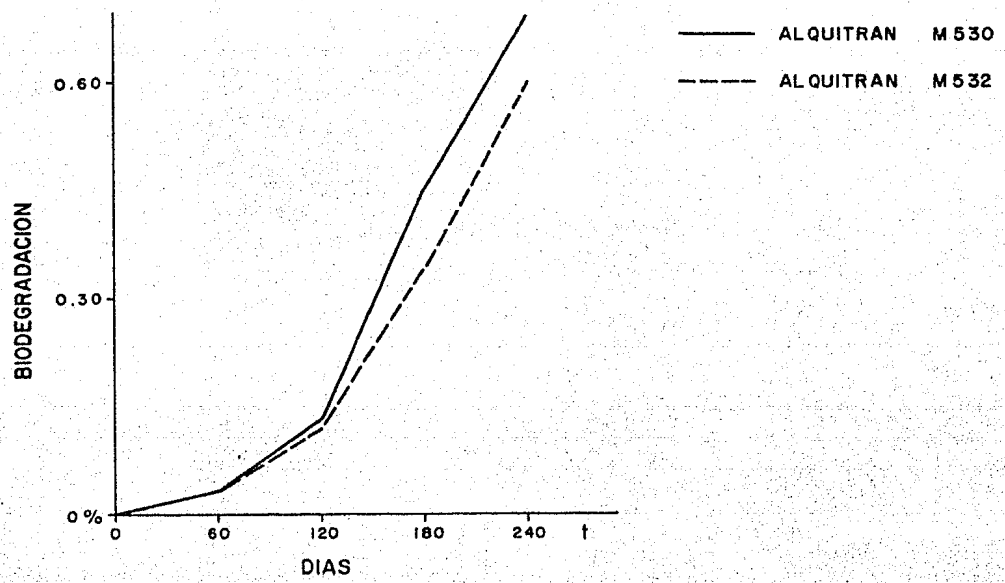


Fig.III.- Biodegradación de los alquitranes en el sistema Ar-Bac.

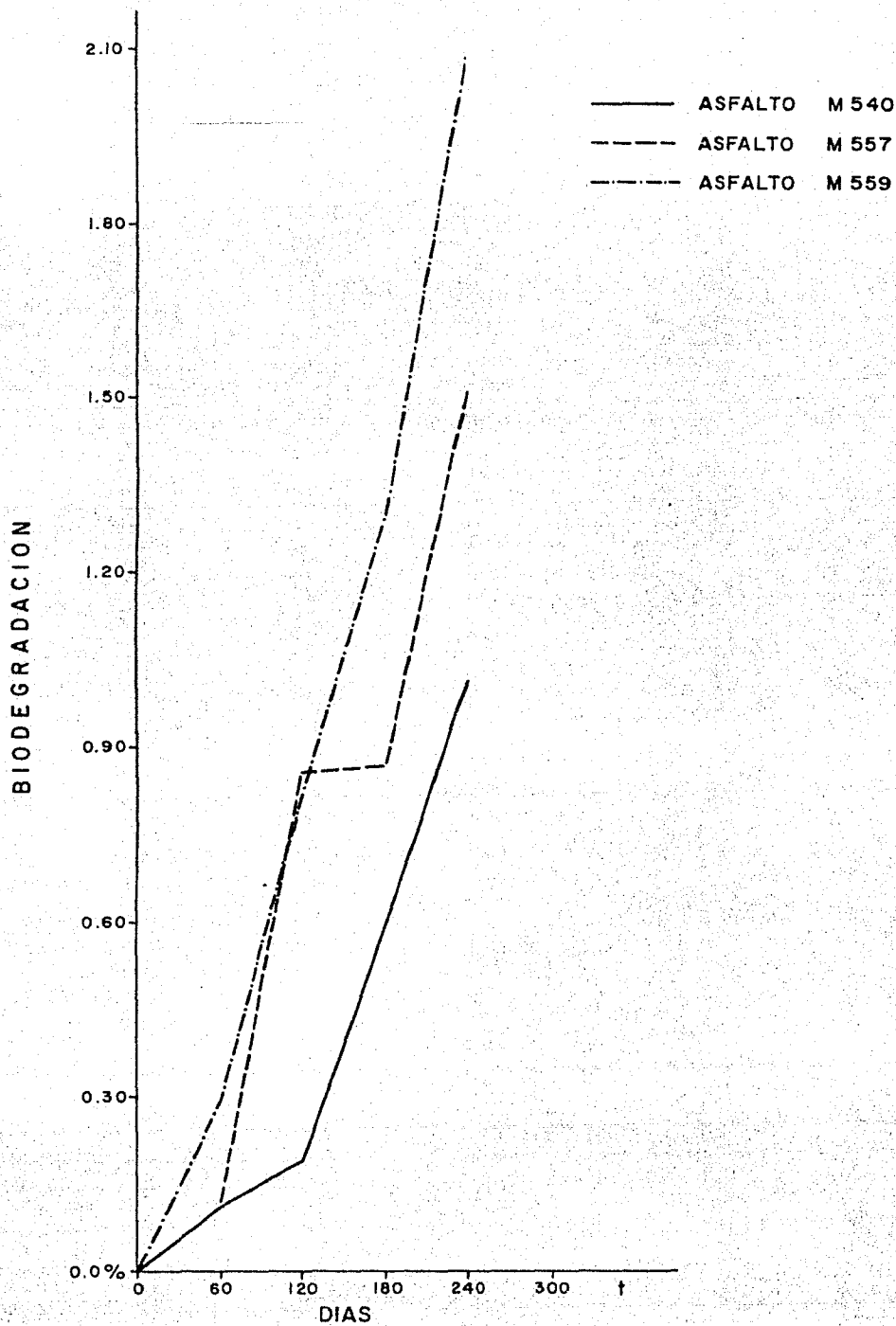


Fig. II.- Biodegradación de los asfalto en el sistema Ar-Bac.

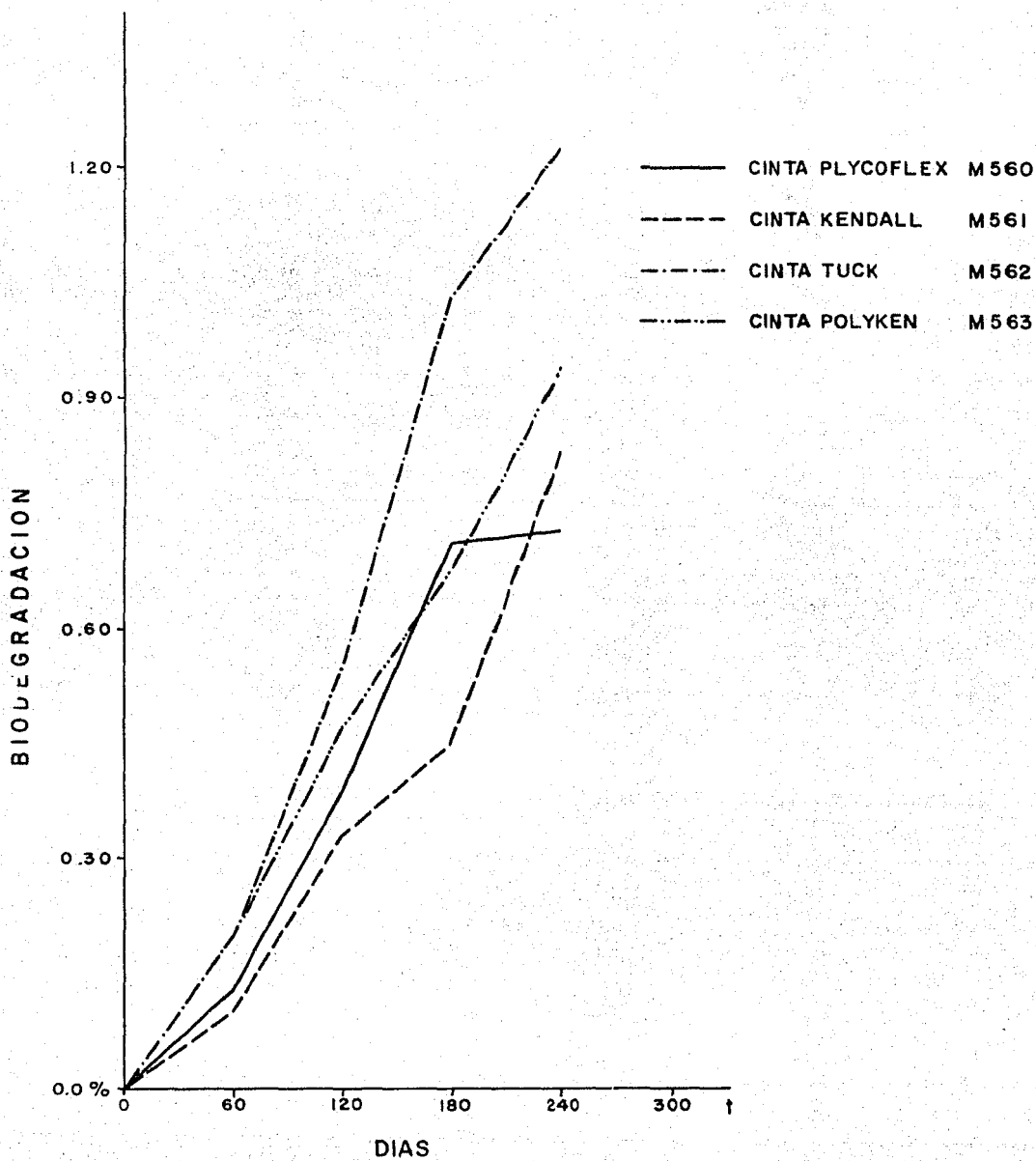


Fig. IV.-Biodegradación de cintas asfáltica y polietilénica en el sistema Ag-Bac.

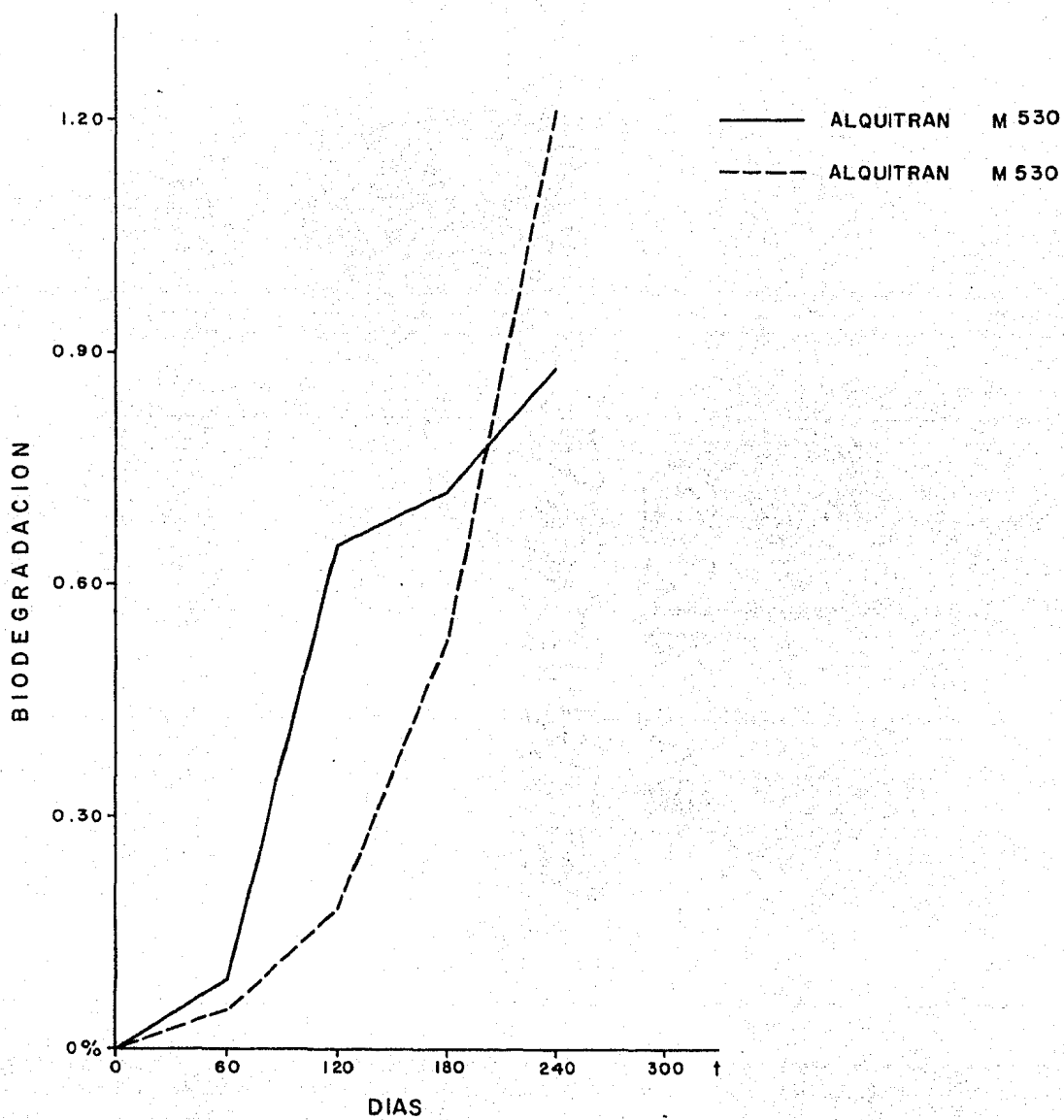


Fig. VI - Biodegradación de los alquitranes en el sistema Ag - Bac.

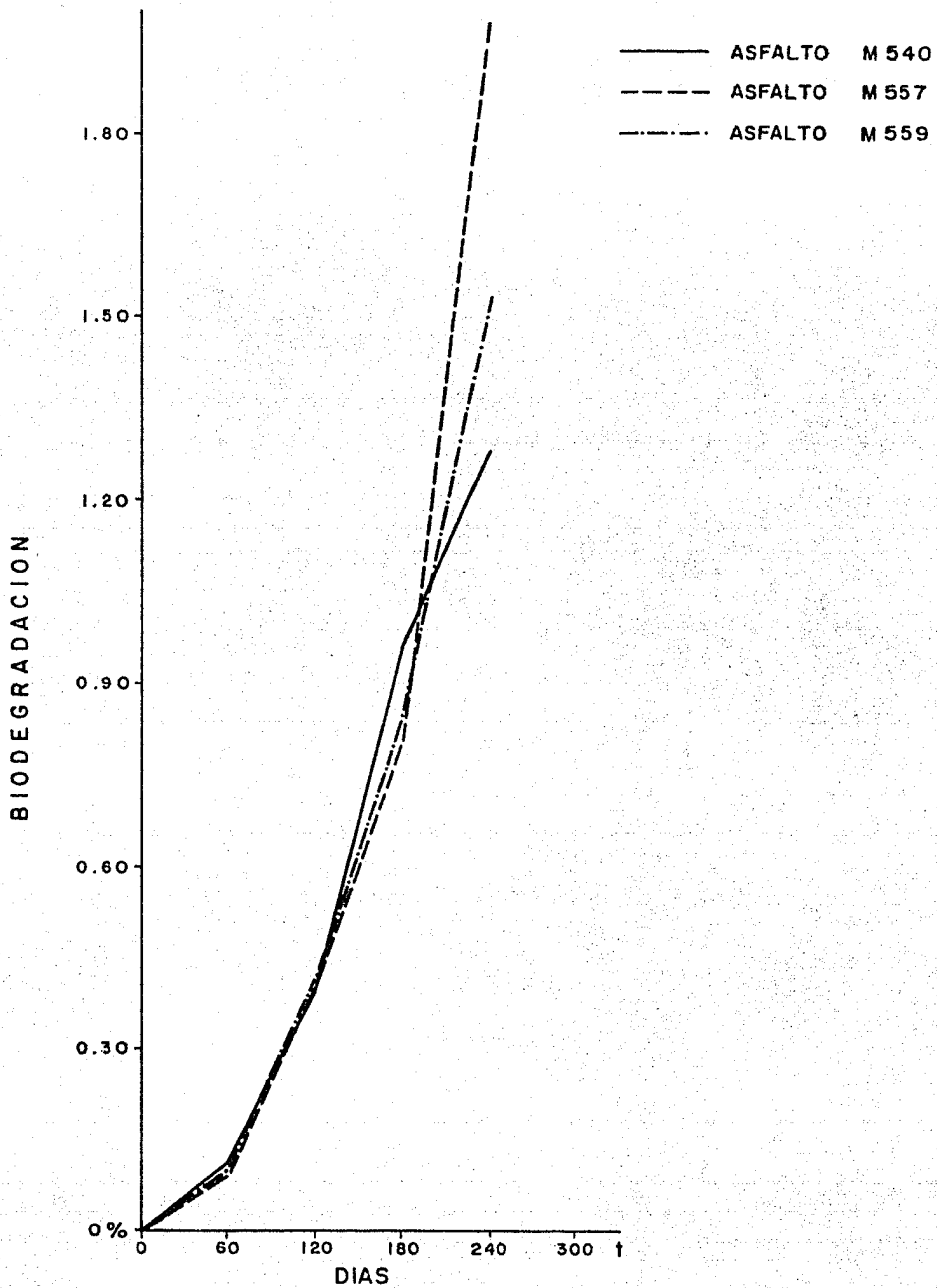


Fig. V.- Biodegradación de los asfaltos en el sistema Ag-Bac.

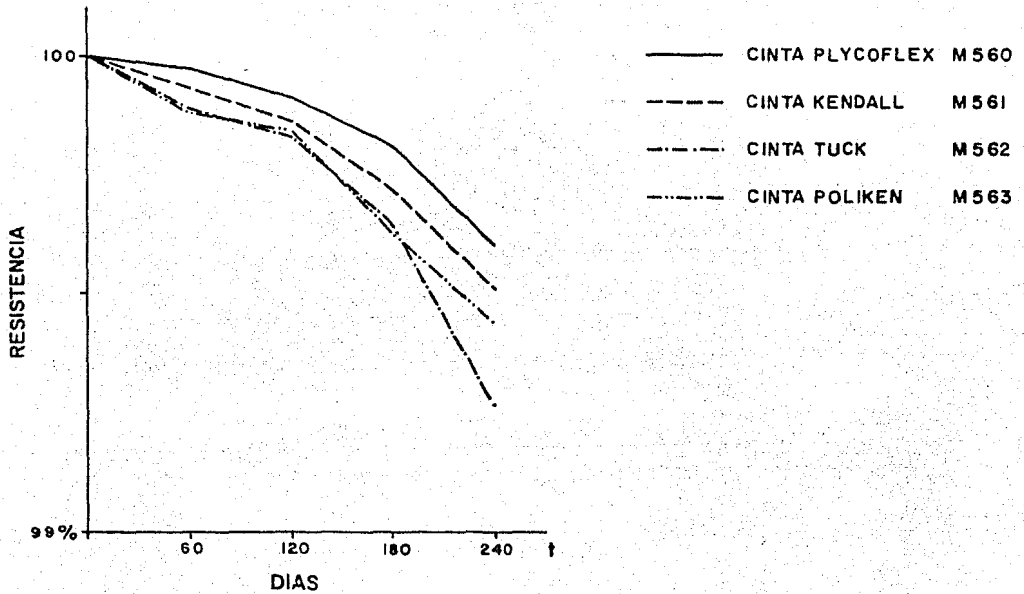


Fig. Ia.- Resistencia a la biodegradación presentada por cintas de asfalto y polietileno en el sistema Ar-Bac.

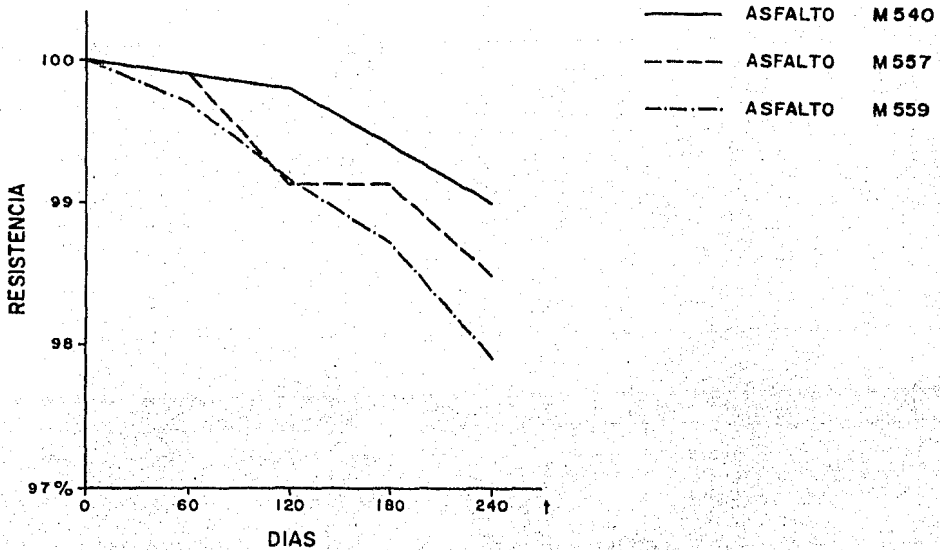


Fig. IIa.- Resistencia a la biodegradación presentada por los asfaltos en el sistema Ar-Bac.

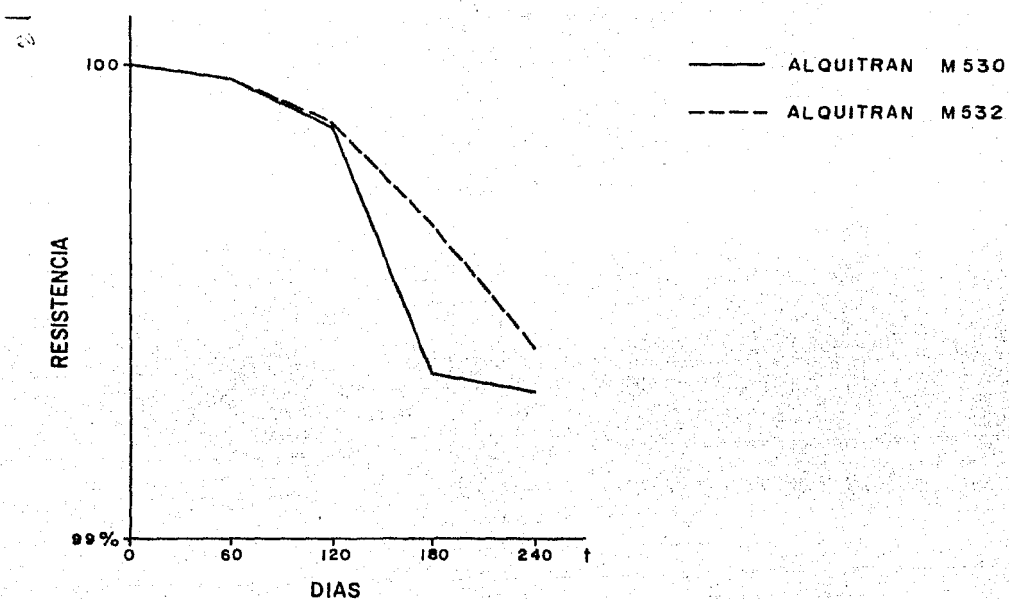


Fig. IIIa.- Resistencia a la biodegradación presentada por los alquitranes en el sistema Ar-Bac.

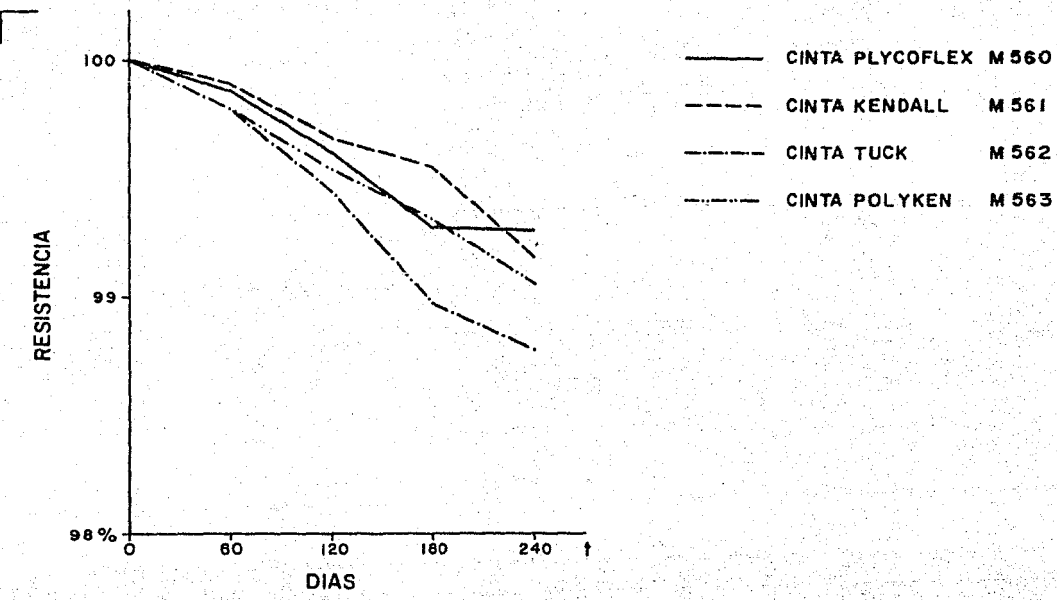


Fig. IVa.- Resistencia a la biodegradación presentada por cintas de asfalto y polietileno en el sistema Ag-Bac.

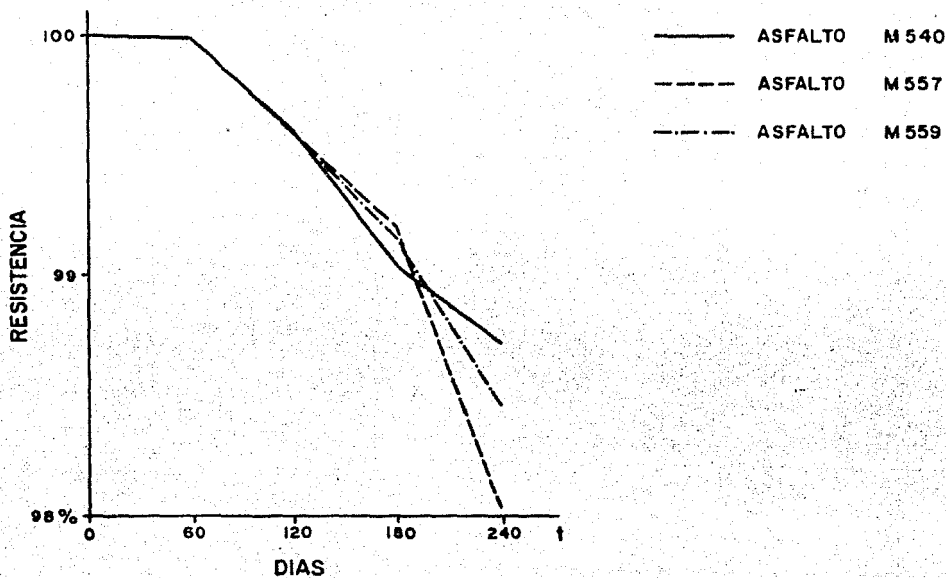


Fig. Va.- Resistencia a la biodegradación presentada por los asfaltos en el sistema Ag-Bec.

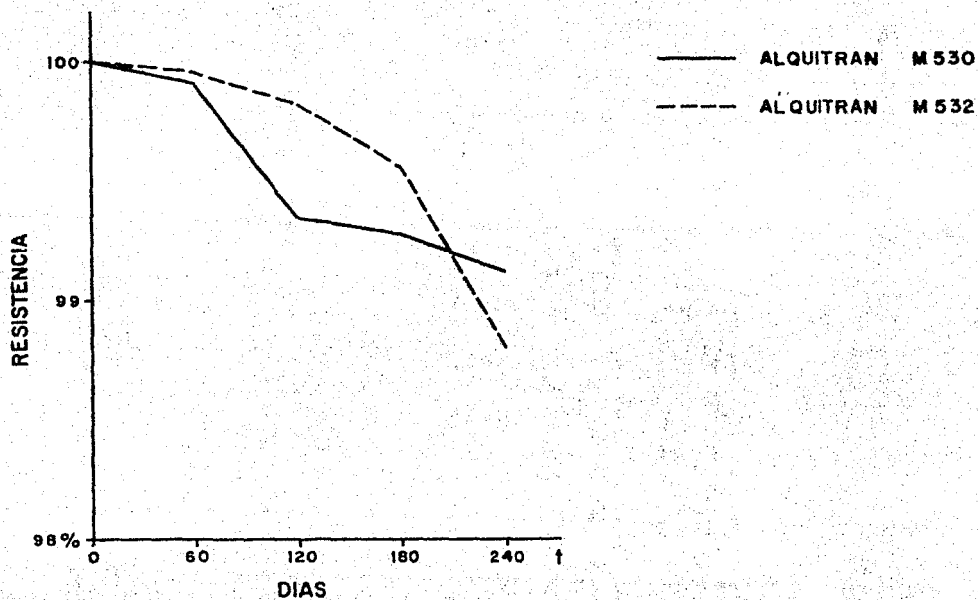


Fig. VI a.- Resistencia a la biodegradación presentada por los alquitranes en el sistema Ag-Bec.

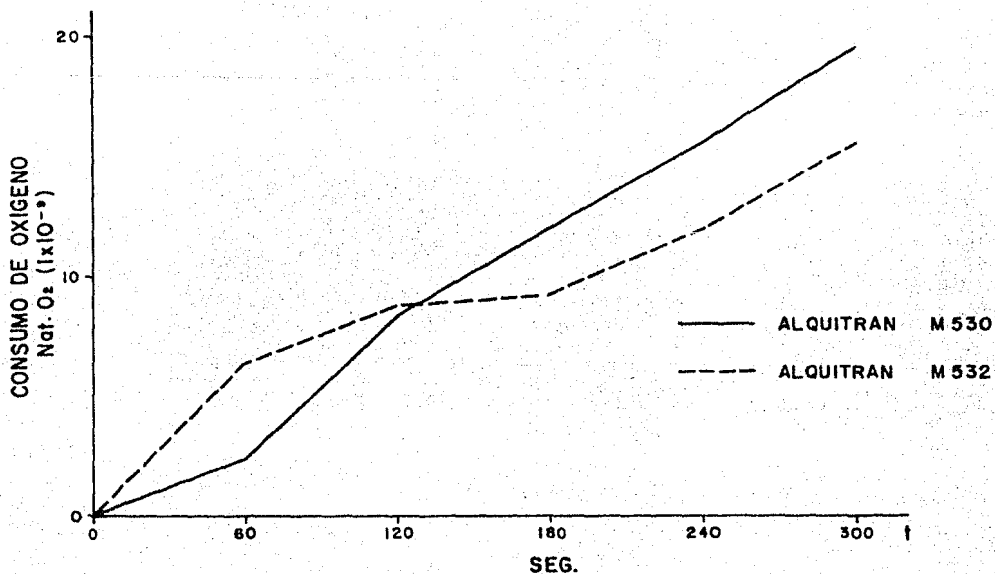


Fig. VII.- Medición del consumo de oxígeno por metabolismo microbiológico en dos muestras de alquitranes.

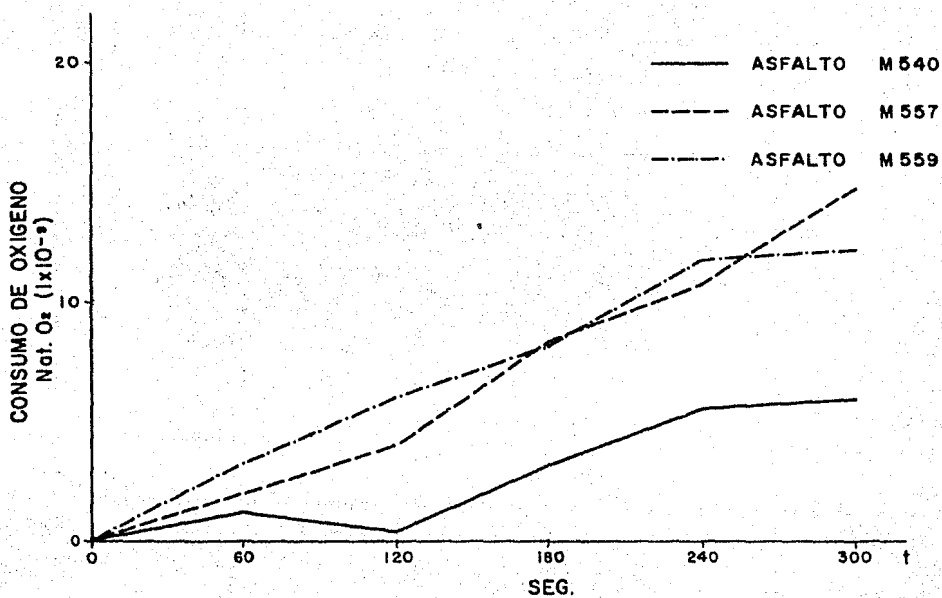


Fig. VIII.- Medición del consumo de oxígeno por metabolismo microbiológico en tres muestras de asfaltos.

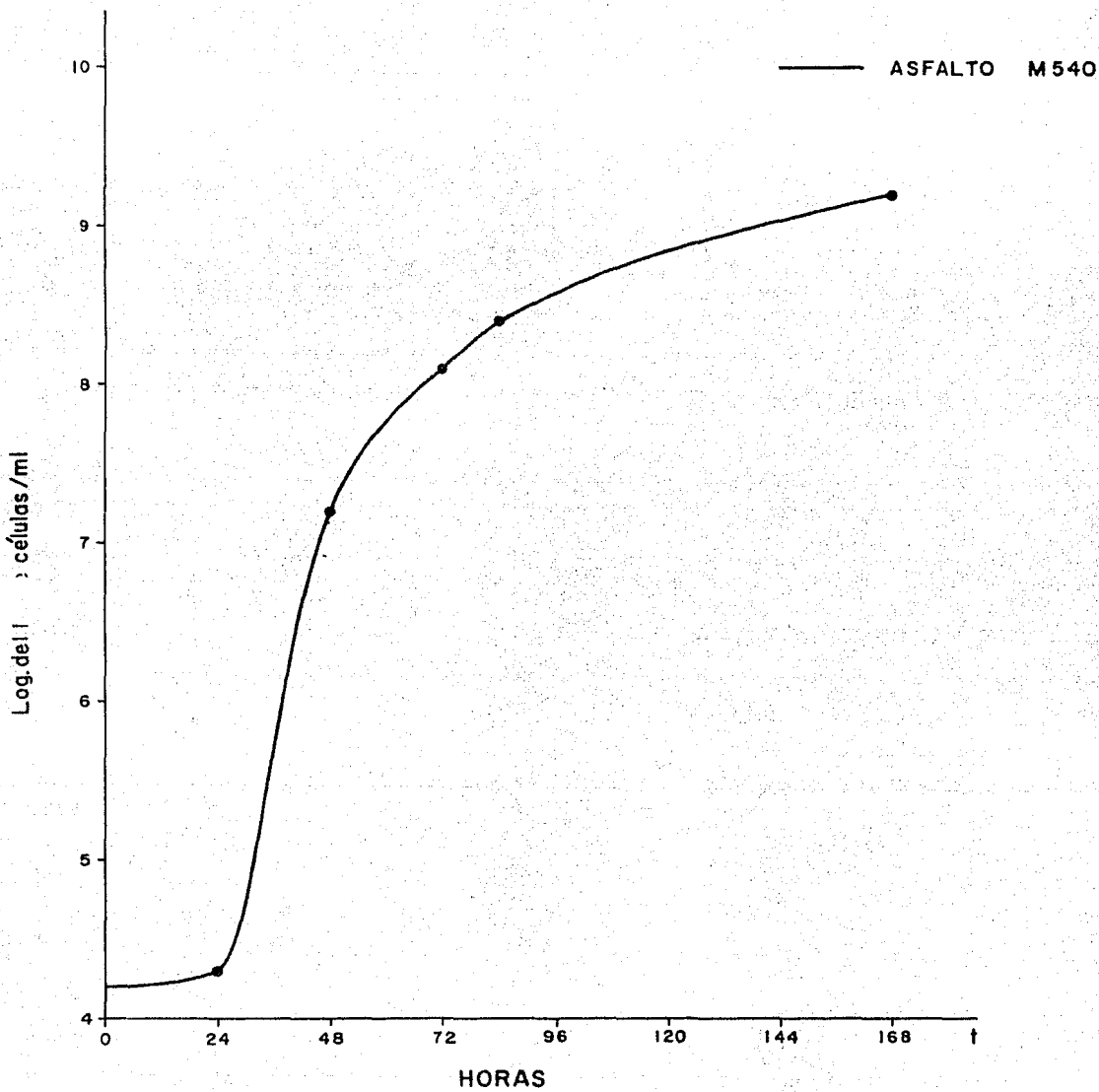


Fig. X.- Curva de crecimiento de los micro-organismos en un medio asfáltico.

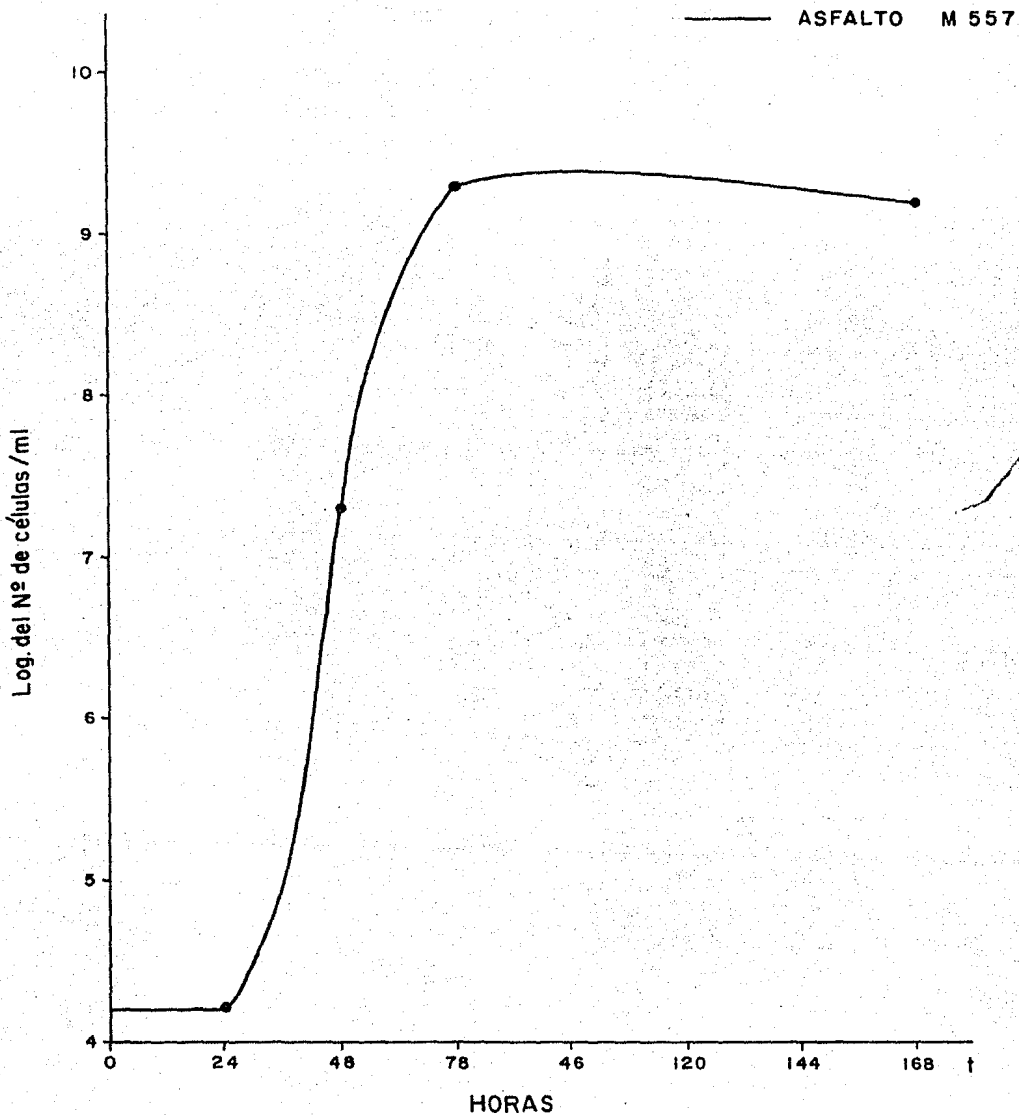


Fig. XI.- Curva de crecimiento de los micro-organismos en un medio asfáltico.

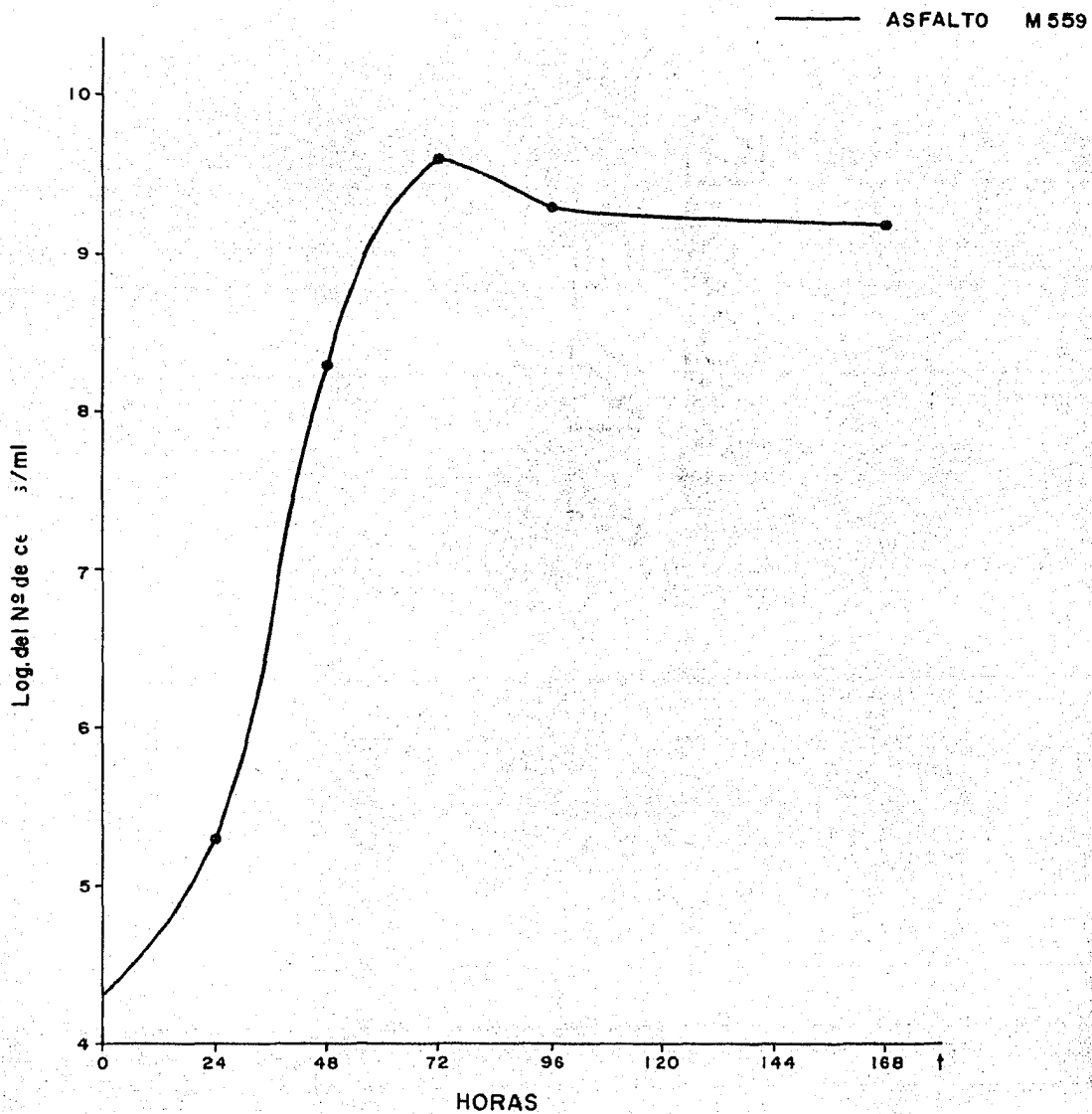


Fig. XII.- Curva de crecimiento de los micro-organismos en un medio asfáltico.

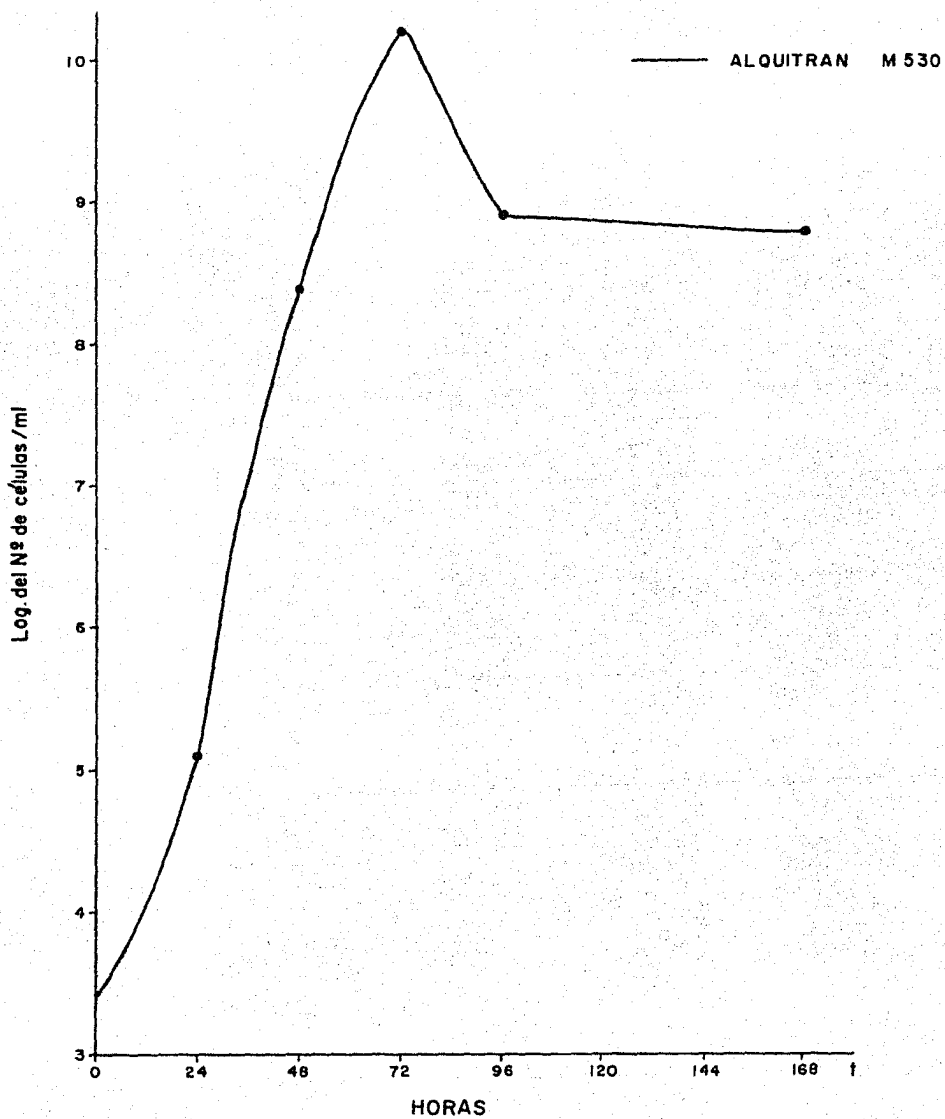


Fig. XIII.- Curva de crecimiento de los micro-organismos en el medio alquitrónico.

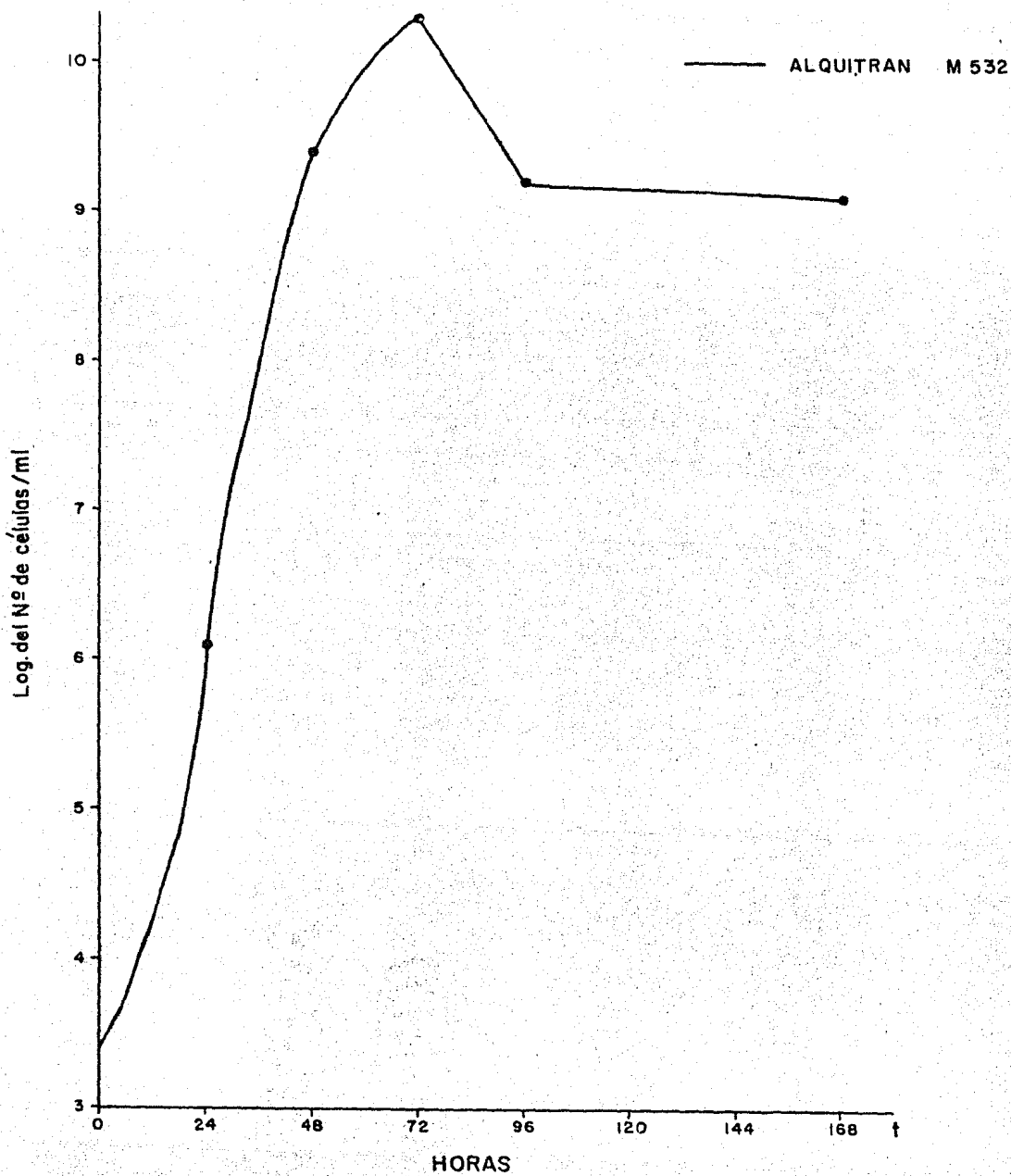


Fig. XIV.-Curva de crecimiento de los micro-organismos en el medio alquitránico.

TABLA 1.

REGISTRO DE LA PERDIDA DE PESO (mg), BIODEGRADACION (%) Y RESISTENCIA -
EN LAS CINTAS ASFALINICAS (M560/M561) Y POLIETILENICAS (M 562/M 563).

SISTEMA DE BIODEGRADACION AG - BAC

MUESTRAS DE CINTAS	JULIO - AGOSTO			SEPTIEMBRE - OCTUBRE			NOVIEMBRE - DICIEMBRE			ENERO - FEBRERO		
	Perdida de peso (mg)	Biode- grada- ción. (%)	Resis- tencia (%)	Perdida de peso (mg)	Biode- grada- ción. (%)	Resis- tencia (%)	Perdida de peso (mg)	Biode- grada- ción. (%)	Resis- tencia (%)	Perdida de peso (mg)	Biode- grada- ción. (%)	Resis- tencia (%)
M-560	44.0	0.13	99.87	79.0	0.39	99.61	132.0	0.71	99.29	234.0	0.73	99.27
M-561	30.0	0.10	99.90	97.0	0.33	99.67	143.0	0.45	99.55	265.0	0.83	99.17
M-562	39.0	0.20	99.80	106.0	0.55	99.45	196.0	1.03	98.97	248.0	1.22	98.78
M-563	49.0	0.20	99.80	116.0	0.47	99.53	164.0	0.68	99.32	232.0	0.94	99.06

SISTEMA DE BIODEGRADACION AR - BAC

MUESTRAS DE CINTAS	Pérdida de peso (mg)	Biode- grada- ción. (%)	Resis- tencia (%)	Pérdida de peso (mg)	Biode- grada- ción. (%)	Resis- tencia (%)	Pérdida de peso (mg)	Biode- grada- ción. (%)	Resis- tencia (%)	Pérdida de peso (mg)	Biode- grada- ción. (%)	Resis- tencia (%)
M-560	10	0.03	99.97	30	0.08	99.92	70	0.18	99.82	137	0.40	99.60
M-561	20	0.067	99.93	42	0.14	99.86	82	0.28	99.72	150	0.49	99.51
M-562	20	0.10	99.89	32	0.16	99.84	67	0.35	99.65	120	0.64	99.26
M-563	28	0.12	99.88	38	0.15	99.85	89	0.36	99.64	140	0.56	99.44

TABLA 2 REGISTRO DE LA PERDIDA DE PESO (mg), BIODEGRADACION (%), Y RESISTENCIA EN LAS

MUESTRAS DE ASFALTO (M-540/M-557 Y M-559)

SISTEMA DE BIODEGRADACION AG - BAC

MUESTRAS DE ASFALTO	JULIO - AGOSTO			SEPTIEMBRE - OCTUBRE			NOVIEMBRE - DICIEMBRE			ENERO - FEBRERO		
	Pérdida de peso (mg)	Biode- grada- ción. (%)	Resis- tencia (%)	Pérdida de peso (mg)	Biode- grada- ción. (%)	Resis- tencia (%)	Pérdida de peso (mg)	Biode- grada- ción. (%)	Resis- tencia (%)	Pérdida de peso (mg)	Biode- grada- ción. (%)	Resis- tencia (%)
M-540	106.0	0.11	99.89	461	0.39	99.61	1064.0	0.96	99.04	1966.0	1.28	98.72
M-557	96.0	0.10	99.90	398	0.41	99.59	1817.0	0.80	99.20	1917.0	1.98	98.02
M-559	112.0	0.09	99.91	398	0.40	99.60	1073.0	0.84	99.16	2014.0	1.53	98.47

SISTEMA DE BIODEGRADACION AR - BAC

MUESTRAS DE ASFALTO	Pérdida de peso (mg)	Biode- grada- ción. (%)	Resis- tencia (%)	Pérdida de peso (mg)	Biode- grada- ción. (%)	Resis- tencia (%)	Pérdida de peso (mg)	Biode- grada- ción. (%)	Resis- tencia (%)	Pérdida de peso (mg)	Biode- grada- ción. (%)	Resis- tencia (%)
	M-540	106.0	0.11	99.89	304.0	0.19	99.81	656.0	0.60	99.40	1279.0	1.01
M-557	123.0	0.11	99.89	454.0	0.86	99.14	739.0	0.87	99.13	1291.0	1.51	98.49
M-559	256.0	0.29	99.71	648.0	0.82	99.18	1092.0	1.27	98.73	1901.0	2.08	97.92

TABLA 3 REGISTRO DE LA PERDIDA DE PESO (mg), BIODEGRADACION (%) Y RESISTENCIA EN LAS

MUESTRAS DE ALQUITRAN (M-530 Y M-532).

SISTEMA DE BIODEGRADACION AG - BAC.

MUESTRAS DE ALQUITRAN.	JULIO - AGOSTO			SEPTIEMBRE - OCTUBRE			NOVIEMBRE - DICIEMBRE			ENERO - FEBRERO		
	Pérdida de peso (mg)	Biodegradación (%)	Resistencia (%)	Pérdida de peso (mg)	Biodegradación (%)	Resistencia (%)	Pérdida de peso (mg)	Biodegradación (%)	Resistencia (%)	Pérdida de peso (mg)	Biodegradación (%)	Resistencia (%)
M-530	93.0	0.09	99.91	347.0	0.65	99.35	815.0	0.72	99.28	1366.0	0.88	99.12
M-532	102.0	0.05	99.95	394.0	0.18	99.82	853.0	0.53	99.56	1406.0	1.21	98.79

SISTEMA DE BIODEGRADACION AR - BAC

MUESTRAS DE ALQUITRAN.	Pérdida de peso (mg)	Biodegradación (%)	Resistencia (%)	Pérdida de peso (mg)	Biodegradación (%)	Resistencia (%)	Pérdida de peso (mg)	Biodegradación (%)	Resistencia (%)	Pérdida de peso (mg)	Biodegradación (%)	Resistencia (%)
	M-530	37	0.03	99.97	154	0.13	99.87	430	0.45	99.35	1040.0	0.69
M-532	51	0.03	99.97	206	0.12	99.88	541	0.34	99.66	1026.0	0.60	99.40

TABLA 4.

MEDICION DEL CONSUMO DE OXIGENO POR METABOLISMO MICROBIOLÓGICO EN MUESTRAS DE ALQUITRANES Y ASFALTOS.

t (seg)	M 530	M 532	M 540	M 557	M 559
60	2.4	6.4	1.2	2.0	3.2
120	8.4	8.8	0.4	4.0	6.0
180	12.0	9.2	3.2	8.4	8.2
240	15.6	12.0	5.6	10.8	11.8
300	19.6	15.6	6.0	14.8	12.2

TABLA 5.

CRECIMIENTO MICROBIANO EN UN MEDIO MINERAL ADICIONADO CON MUESTRAS ASFÁLTICAS Y ALQUITRANICAS

t (horas)	M 530	M 532	M 540	M 557	M 559
0	4×10^{-3}	4×10^{-3}	2×10^{-4}	2×10^{-4}	3×10^{-4}
24	1×10^{-5}	1×10^{-6}	3×10^{-4}	2×10^{-4}	3×10^{-5}
48	4×10^{-8}	4×10^{-9}	2×10^{-7}	3×10^{-7}	3×10^{-8}
72	2×10^{-10}	3×10^{-10}	1×10^{-8}	3×10^{-9}	6×10^{-9}
96	9×10^{-8}	2×10^{-9}	4×10^{-8}	4×10^{-9}	3×10^{-9}
168	8×10^{-8}	1×10^{-9}	2×10^{-9}	2×10^{-9}	2×10^{-9}

Resultado de la tipificación

Conforme a los resultados obtenidos de la tipificación de las colonias, aisladas de los medios alquitránico y asfáltico en el sistema API 2OE y de acuerdo a la lectura en el Manual Bergey's , se obtuvieron los siguientes géneros :

Pseudomonas sp.

Serratia marcescens y

Micrococcus paraffinae

III.1 OBSERVACIONES

i. El medio de cultivo mineral que se empleó para este propósito y que se describe en el Cuadro 1, inciso 1, la , contiene los elementos mínimos necesarios para el desarrollo microbiológico , con la excepción de la fuente de Carbono proporcionada únicamente por las muestras bituminosas .

ii. En el inciso 1.2d se describió el sistema Ter-Bac, cuyos resultados son omitidos en el informe, debido al deterioro sufrido por las condiciones ambientales en las etiquetas de identificación , lo cual hizo imposible la identificación de las muestras .

iii. Los cortes de los paneles de las muestras bituminosas no fueron uniformes, teniendo diferencias en los pesos; por este hecho no fué tomada en cuenta la pérdida de peso de los paneles como un índice directo de la biodegradación; aunque sí como un dato indirecto para obtener el porcentaje de biodegradación, uniformizando los pesos iniciales a un 100%, correspondiente al material no degradado.

iv. Conforme a los resultados de biodegradación, en la fig. IV se observa un mayor porcentaje de biodegradación en las cintas polietilénicas en comparación con las cintas asfálénicas; lo anterior es posible que se deba a que las cintas polietilénicas sometidas a la biodegradación fueron adquiriendo rigidez y perdiendo adhesividad, lo que causó que estas cintas presentaran una mayor área de exposición a la acción de los microorganismos.

v. Los paneles de las distintas muestras que se sometieron cada dos meses al sistema Ar-Bac, es posible que debido a la fricción con la arena hayan perdido parte del material.

vi. Tanto en la medición del consumo de oxígeno como en el comportamiento de la población microbiana, no se trabajó

con el grupo de las cintas por la dificultad para su proceso de pulve-
rización.

vii. Las muestras que se fueron retirando de los dos sistemas Ar-Bac y Ag-Bac, se examinaron al microscopio estereoscópico, observando que los paneles de asfalto y alquitrán estaban cubiertos por una película densa de color blanquecino y posiblemente eran productos de la degradación.

viii. Algunos de los paneles de asfalto mostraron además erupciones, cuya periferia mostraba materia orgánica de aspecto líquido y color negro metálico. Estas mismas alteraciones se presentaron en algunos paneles de alquitrán de hulla.

ix. Con respecto a la Figura X, la muestra de asfalto M540 presenta el caso en que no es posible discernir si el máximo de crecimiento está a las 168 horas, debido a que este fue el tiempo final del marco de observación; por lo cual se recomienda en trabajos posteriores tomar un marco de observación mas amplio.

x. La composición de los asfaltos y alquitranes es muy variada, ya que depende del origen de sus yacimientos y de las tem-

peraturas y presiones a que son sometidos ; sin embargo, se sabe que el porcentaje de hidrocarburos de cadena recta es mayor en los asfaltos que en los alquitranes , en donde predominan los hidrocarburos cíclicos y aromáticos ; por lo tanto, el porcentaje que se da dentro de discusiones es un porcentaje relativo que se menciona solo como una referencia .

xi. Como continuación de este estudio se sugiere que en trabajos posteriores se realice un estudio mas a fondo con el fin de determinar qué rutas metabólicas son las que siguen estos tipos de microorganismos que utilizan los materiales bituminosos, así como los materiales polimerizados como fuente de carbono y un estudio in situ para determinar la variabilidad de los estados de biodegradación, bajo la acción del medio ambiente natural.

IV: DISCUSION Y CONCLUSIONES

La diferente susceptibilidad presentada por los paneles de las muestras bituminosas en la prueba de biodegradación puede ser debida a :

- i) La distinta composición de los materiales bituminosos.
- ii) La selectividad de los microorganismos ante las distintas muestras bituminosas.
- iii) La acción de los diferentes medios en que estuvieron sometidas las distintas cepas favoreciendo o inhibiendo su crecimiento.

La mayor susceptibilidad a la biodegradación presentada por los paneles de asfalto y alquitrán , posiblemente se deba a su alto contenido de compuestos parafínicos y nafténicos (Asfalto-hidrocarburos saturados 35% , (11)), que son mas rápidamente degradados por los microorganismos que los compuestos aromáticos (Asfalto-hidrocarburos aromáticos 50% , compuestos heterocíclicos oxigenados, nitrogenados y sulfurados 15% /Alquitrán-compuestos heterocíclicos

clicos oxigenados, nitrogenados y sulfurados 62%, aceite de creosota 21% , fenoles, piridina y sus homólogos 15% , benceno y sus homólogos 2% (11)) los cuales comúnmente no son degradados por una gran variedad de microorganismos , aunque una cuarta parte de los microorganismos que utilizan los derivados del petróleo los emplean. La selectividad presentada por los microorganismos puede ser un factor importante en la susceptibilidad de los materiales; así , se observa que los asfaltos que tienen un mayor contenido de hidrocarburos alifáticos son mas susceptibles al ataque microbiano que los alquitranes que tienen una cantidad menor de hidrocarburos alifáticos .

La menor susceptibilidad a la biodegradación observada en las cintas de tipo asfálénico y polietilénico se debe posiblemente al arreglo de la estructura molecular de estos polímeros , siendo difícil para el microorganismo romper la estabilidad de los enlaces .

El metabolismo microbiano medido por el consumo de oxígeno determina y apoya la susceptibilidad de los asfaltos y alquitranes, ya que el microorganismo requiere del oxígeno como un aceptor final de electrones en el proceso de óxido-reducción de la sustancia empleada como fuente de alimento y energía .

El mayor consumo de oxígeno registrado en los alquitranes implica una mayor actividad metabólica en este tipo de material con respecto al material asfáltico; esto es posible que se deba a una fácil "disposición" del sustrato en el material alquitránico; el mismo caso se presenta en las gráficas de crecimiento poblacional durante las fases lag y logarítmica . Sin embargo, esta "disponibilidad" del sustrato es solo temporal si tomamos en cuenta que la rápida actividad metabólica y el crecimiento poblacional se presentaron durante un tiempo relativamente corto (de 5 min a 168 horas) con respecto al tiempo de duración de la prueba de biodegradación (de 240 días) .

En las gráficas de crecimiento poblacional se observó una corta duración en la fase de adaptación en los medios asfálticos y una ausencia de esta en los medios alquitránicos ; lo anterior es posible que se deba a la presencia de distintos géneros y especies bacterianas en el mismo inóculo y no a una sola especie con la cual se obtendría una fase lag definida. El crecimiento poblacional observado en la fase logarítmica fué mayor en el medio alquitránico que en el medio asfáltico , debido posiblemente a lo anteriormente expuesto con respecto a la "disponibilidad" del sustrato , alcanzando en el medio alquitránico un crecimiento máximo a las 72 horas ; en el

medio asfáltico no hay un máximo de crecimiento común para las distintas muestras M540 (168 horas) ; M557 (96 horas) y M559 (72 horas) ; lo cual puede deberse a los incisos i), ii) y iii) ya mencionados . Posterior a esta fase se inicia una fase de inhibición en el crecimiento (con la excepción de la muestra asfáltica M540; esta fase puede deberse a los siguientes factores :

- La escasez de alimentos que por una parte conduciría a la competencia entre las distintas cepas, actuando como un factor de selección por sustrato ; y , por otro lado, como un límite de energía para la reproducción bacteriana .

- Producción de sustancias metabólicas tóxicas para los microorganismos .

- Desnaturalización de las enzimas por factores tales como el pH y la posible presencia de metales pesados .

Lo anterior nos lleva a las siguientes conclusiones :

Los paneles de las diferentes muestras comerciales sometidas a la acción de los microorganismos presentaron una pérdida de peso manifestada en el porcentaje de biodegradación , que se tomó como un índice indirecto de la acción microbiana .

Los paneles fueron atacados superficialmente así como en su estructura interna.

En los dos sistemas Ar-Bac y Ag-Bac , las cintas fueron menos susceptibles a la biodegradación ; en particular, las cintas asfálticas M560 y M561 siendo los mas susceptibles a la biodegradación los asfaltos .

Las pruebas de consumo de Oxígeno, así como las de crecimiento poblacional , determinaron y apoyaron la susceptibilidad presentada por los asfaltos y alquitranes durante la prueba de biodegradación, comprobando que el material bituminoso es empleado por los géneros Pseudomonas sp. , Serratia marcescens y Micrococcus paraffinae que se obtuvieron en la tipificación .

V. BIBLIOGRAFIA

1. "American Society for Testing Material" (ASTM). (1916) Designation 6-21-70, Race St. Philadelphia, USA., p.767-771.
2. Arriola, T. A., et al (1979). "Introducción a los recubrimientos anticorrosivos" ., IMP., Subdirección de Tecnología de la Explotación, publicación No. 79, p. 1-24 .
3. Atlas, R.M.(1975). Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation. Appl. Microbiol. 30: 396-403 .
4. Bailey, N.J.L., A.M. Jobson and M.A. Rogers (1973). Bacterial degradation of crude oil: Comparison of field and experimental data. Chem. Geol. 11: 203-221
5. Buchanan, R. E. & N.E. Gibbons (1974). "Bergey's Manual of determinative bacteriology". 8 th Edition, The Williams & Wilkins Co. p.217-243, 326, 478-483 .
6. Burns R.M. & Bradley (1959) . "Protective coatings for metals". 2nd. Edition, Reinhold Publishing Corporation. New York. p.1-21 , 596-609 .
7. Connan, J.(1981). Un exemple de biodégradation préférentielle des hydrocarbures aromatiques dans des asphaltes du bassin sud-aquitain (France). Bull. Cent. Rech., Explor. Prod. Elf-Aquitaine, 5 : 151-171 .
8. Crolet, J.L. (1979). Présentation des phénomènes de corrosion et des différents moyens de lutte disponibles. Revue de l'Institut Français du Pétrole. 34 : 929-946

9. Durand, Y. & Alain, S., (1979). Inspection of buried pipelines by submersibles-pipe-logging instrumentation. Petrole Informations Technology. Intersub- Development at the 10th Annual OTC in Houston, Tex., May 8-11, (1978). 48-63.
10. García, E.R., (1981). "Estudio microbiológico del agua de los sistemas de enfriamiento del complejo petroquímico de Pajaritos, Ver y evaluación de biocidas". (tesis). Instituto Politécnico Nacional, México., p.1-54 .
11. Hampel C.A. & C.C. Hawley., (1973). "The Encyclopedia of chemistry." 3rd Edition., Van Nostrand Reinhold Co., London. p.111, 277.
12. Harris, J.O., R.M. Kline & Carl F.C., (1956). A study of the presence of hydrocarbon utilizing bacteria at the soil-asphalt. Interface of Kansas Highways. Transactions of the Kansas Academy of Science, 59: 495-499.
13. Harris, J.O. (1960). Soil microorganisms in relation to cathodically protected pipe. Natl. Assoc. of Corros. Eng., 16 : 441t-448t .
14. Harris, J.O., (1964). Bacterial-environmental interactions in corrosion on pipelines: Ecological analysis. Natl. Assoc. of Corros. Eng., 20 : 335-341
15. Instituto Mexicano del Petróleo. (1980) . "Evaluación de recubrimientos". Subdirección de Tecnología de Explotación . División de Corrosión (inédito) p.1-13.
16. Jones, T.K., (1965). Effect of bacteria and fungi on asphalt. Mater. Protect. 4: 39-43 .
17. Munger, C.G., (1978). Sulfides-their effects on coatings and substrates. Natl. Assoc. Corros. Eng., Mater. Performance., 20:20-23.

18. Oudot, J., (1979) . Le bilan du carbone dans une experience de biodegradation bacterienne de un petrole brut. Environ-Pollut. Applied Science Publishers Ltd, England., 20:177-187.
19. Quayle, J.R., (1968). "Biochemistry of hydrocarbons". Inst. Petrol., London. p.21-34 .
20. Smith, J.E., (1976). Microbial spoilage of engineering materials. Part.II, Tribol.Int. 9:225-230.
21. Stahl, W.J., (1979), Compositional changes and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ fractionations during the degradation of hydrocarbons by bacteria. Geochim et Cosmochim. Acta. 44: 1903-1907 .
22. Townsley, Ph., (1975) . Material for biological degradation of petroleum. Unites States Patent. 3, 883, 397 .
23. Traxler, R.W., (1966). Bitumen attack by microorganisms Asphalt Symposium 7, 58:59-64 .;
24. Traxler, R.W., J.A. Robinson, D.E. Wetmore & R.N. Traxler (1966). Action of microorganisms on bituminous materials II. Composition of low molecular weight asphaltic fractions determined by microbial action and infra-red analyses., Jour. Appl. Chem. 16 : 266-271 .
25. Traxler, R.W., (1968). Attaque microbienne des bitumes pétroliers. Revue de l'Institut Français du Pétrole. 23 :140-154
26. Uhlig, H.H., (1971). "Corrosion and corrosion control". 2nd. Edition, John Willey & Sons Inc., London., p.213-256.
27. Walker, J.D., R.R. Colwell & L. Petrakis., (1976) . Biodegradation rates of components of petroleum. Can. Jour. Microbiol. 22: 1209-1213

28. Wyndham, R.C. & J.W. Costerton., (1981). In vitro microbial degradation of bituminous hidrocarbons and in situ colonization of bitumen surfaces within the Athabasca oil sands deposits. Applied and Enviromental Microbiology . 41: 791-800.



Tesis por computadora

Medicina 25 Local 2
Tel. 6587022
6587100

Frente a la Facultad de Medicina
Ciudad Universitaria