



Contaminación microbiana
en turbo-combustibles de aviación
y su evaluación a través de la medición del
adenosín trifosfato (ATP)
*Microbial contamination in turbo-jet aviation fuel
and its evaluation through measurement of
Adenosine Triphosphate (ATP)*

RONALD ALEXANDER TORRES SANGUINO¹
rtorres@unimet.edu.ve

BEATRIZ CECILIA LEAL²
bleal@unimet.edu.ve

DANIELA PÁEZ³
danatt@gmail.com

*Laboratorio de Combustibles y Lubricantes,
Departamento de Estudios Ambientales,
Universidad Metropolitana, Caracas. Venezuela.*

Recibido: 08/02/2012

Aceptado: 12/11/2012

-
- ¹ Licenciado en Química, mención Tecnología de la Universidad Central de Venezuela. Magíster en Química de la USB y Diplomado en Gestión de la Calidad y Productividad de la UJAP. Actualmente se desempeña como profesor a tiempo parcial y coordinador del Laboratorio de Microbiología en Combustibles y Lubricantes de la Universidad Metropolitana.
 - ² Doctoranda (PhD) en Proyectos de Ingeniería, profesor titular e investigador de la Universidad Metropolitana en el Departamento de Estudios Ambientales de la Facultad de Ingeniería. Licenciado en Química (UCV), Especialista en Tribología (FAV), Especialista en Gestión Ambiental Empresarial (UNIMET), Especialista y Diplomado Avanzado (MSc) en Proyectos de Ingeniería (UPV, España), y en etapa de culminación del doctorado.
 - ³ Graduada de Ingeniería química de la Universidad Metropolitana. Actualmente es ingeniero de procesos en una empresa de consultoría que suministra servicios profesionales al sector petrolero energético e industrial del país, con experiencia de alrededor de dos años en simulaciones de procesos para el cumplimiento estándar (Process Safety Management) en refinerías.



Resumen

La corrosión inducida por microorganismos es un fenómeno importante en la industria de los hidrocarburos, por su presencia en toda la cadena de valor de esta industria. Uno de los sectores de esta industria que cobra particular atención es su presencia en los sistemas de manejo de combustible de aviación Jet A-1, dado su impacto en la seguridad en el transporte de pasajeros. Las bacterias presentes en el combustible de aviación pueden causar diversos problemas operacionales: como ensuciamiento, obstrucción, depósitos y corrosión en tanques de almacenamiento, filtros y líneas de las aeronaves y facilidades de tierra, deficiencias que de no atenderse adecuadamente, comprometen la seguridad, funcionamiento y mantenimiento de las operaciones aeronáuticas.

Este trabajo de investigación se realizó con la finalidad de desarrollar un protocolo que permita evaluar la contaminación microbiana en turbo-combustibles de aviación tipo Jet-A1, a través de técnicas de microbiología clásica y la medición de adenosín trifosfato (ATP) empleando la metodología de bioluminiscencia, con la finalidad de correlacionar ambos métodos. La importancia de haber desarrollado este estudio es que se logró detectar los microorganismos presentes, causantes de diversos problemas operacionales que comprometen la seguridad, el funcionamiento y el mantenimiento en las aeronaves, debido a biocorrosión. La aplicación de la metodología clásica descrita permitió su conteo en las muestras estudiadas, y la aplicación del HY-LITE® facilitó la evaluación de las muestras debido a lo eficaz, innovador, viable y preciso, ya que los consumidores directos en la industria aeronáutica pueden ejecutar las acciones de mantenimiento pertinentes.

Palabras clave: Microbiología, luminómetro Hy-Lite®, turbo-combustible, bioluminiscencia, biocorrosión.

Abstract

Corrosion induced by microorganisms is an important phenomenon in the oil industry, due to the presence of microorganisms in the entire value chain of this industry. One sector of this industry needs to pay attention to the presence of microorganisms in JET A-1 fuel handling systems, given its impact on safety in the transportation of passengers. Bacteria present in aviation fuel can cause



various operational problems as fouling, filter clogging, deposits and corrosion in storage tanks as well as in lines of aircraft and ground facilities. If they are not properly addressed, these problems can compromise safety, operation and maintenance of aircraft operations.

This research work was conducted in order to develop a protocol for assessing microbial contamination in turbo-jet-A1 aviation fuel through classical microbiology techniques and measurement of Adenosine Triphosphate (ATP) using a bioluminescence methodology, with the aim of correlating both methods. The importance of having developed this study is that it was possible to detect microorganisms in aviation fuel samples that cause various operational problems that compromise the security and maintenance of aircraft because of bio-corrosion. The application of classical microbiological analysis made possible counting colonies microorganisms in Jet A-1 fuel samples, and the application of HY-LITE[®] made the evaluation of the aviation fuel samples easier due to its effectiveness, innovation, viability and accuracy, enabling direct consumers in the airline industry perform relevant maintenance actions.

Key words: Microbiology, Hy-Lite[®] Luminometer, Jet Fuel, Bioluminescence, Microbiologically-influenced corrosion.

Introducción

Las bacterias y hongos son microorganismos que crecen y pueden crear un ambiente propicio para la corrosión en los depósitos donde se encuentran contenidos, ya que sus subproductos metabólicos son ácidos orgánicos y ácido sulfhídrico, los cuales ejercen un efecto negativo en piezas metálicas (Mardigan, 2004). La presencia de estos microorganismos en los combustibles de aviación y en los sistemas de conducción del combustible causa grandes problemas de biodeterioro o efectos adversos sobre los materiales, que se traduce en pérdidas económicas para la industria aeronáutica, según lo menciona Passman (2003).

El combustible Jet A-1 es el más utilizado por las líneas aéreas del mundo y se caracteriza por su alto poder calórico, bajas temperaturas



(bajo punto de congelación) y de combustión que le permiten un adecuado funcionamiento en ese intervalo de temperaturas, satisfaciendo los requisitos de la norma venezolana Covenin 1023 (2000). Sin embargo es susceptible a la humedad, que permite el desarrollo de hongos y bacterias que corroen los materiales donde se encuentran almacenadas, que pueden acarrear grandes consecuencias, según explica PDVSA (2005).

Actualmente los combustibles Jet A-1 están confrontando problemas de biodeterioro, lo que ha causado muchos accidentes aéreos así como también grandes pérdidas económicas, como consecuencia de la falta de aplicación de medidas preventivas para estos combustibles, según explican Goncalves y Sirit (2005). No obstante, este problema puede ser solventado si se llevan a cabo los respectivos análisis microbiológicos con los que se detecta el crecimiento de bacterias u hongos; y también se pudiera emplear otro método como la bioluminiscencia, con el cual se detectan los microorganismos por medio del adenosín trifosfato (ATP), Estos análisis permiten establecer las condiciones en que llegan los combustibles y que, una vez analizados, pueda efectuarse el mantenimiento respectivo a los tanques de almacenamiento de los combustibles empleados en la aviación, debido a que en estas áreas es donde se localiza la mayoría de las bacterias presentes en los combustibles debido a la acumulación de agua, lodo y sedimentos que, dadas ciertas condiciones permiten el desarrollo microbiano de las bacterias y hongos. El uso de las reacciones de luciferasa para analizar el ATP, presente en muestras donde estén contenidos microorganismos, es un medio fácil para enumerar los microorganismos, presentes. La pequeña cantidad de luz producida es proporcional a la ATP, y por lo tanto el número de microorganismos. Una bacteria promedio contiene alrededor de 1×10^{-15} g de ATP por célula. La extracción adecuada de ATP a partir de los microorganismos es una parte esencial de cualquier protocolo, como es la eliminación de la no-microbiana ATP a partir de, por ejemplo, las células somáticas también presentes en las muestras. El ensayo ATP da una medida global del número de microorganismos presentes, es decir, no es específica a las especies presentes según lo explica Stanley (1989).



Esta investigación tiene sus bases en estudios previos como los de Goncalves y Sirit (2005), Silva (2009), Racioppo (2009) y Valera (2010). Se presentan las bacterias sulfato-reductoras, al igual que el hongo *Hormoconis resinae*, como la mayor causa de que los tanques de almacenaje de lubricantes y combustibles presenten biocorrosión. Al igual que los estudios ya mencionados, se emplearon metodologías ya desarrolladas para la detección de bacterias y hongos aerobios mesófilos, *Pseudomonas aeruginosa* y bacterias sulfato-reductoras con el objetivo de establecer la contaminación microbiana presente en los combustibles de aviación empleando técnicas de microbiología convencional y la medición de adenosín trifosfato (ATP) con la metodología de bioluminiscencia, con la finalidad de correlacionar ambos métodos.

Materiales y métodos

Selección de muestras de combustibles de aviación

Las catorce muestras seleccionadas para realizar la evaluación de contaminación microbiana en combustible de aviación fueron del tipo Jet A-1, suministradas por una aerolínea comercial venezolana, las cuales provienen de los tanques izquierdos y derechos de diferentes aviones, y una muestra de un tanque cisterna. Adicionalmente se prepararon cinco muestras de combustibles que fueron contaminadas con kits microbiológicos en el laboratorio, para un total de 20 muestras analizadas.

Metodología empleada

La sistemática utilizada será la metodología descrita por Passman, (2003) ASTM "Fuel and Fuel Systems Microbiology-Fundamentals, Diagnosis, and Contamination Control", que incluye las normas ASTM D-6469 "Standard Guide for Microbial Contamination in Fuels and Fuel Systems" y ASTM D-4412 "Standard Test Methods for Sulfate-Reducing Bacteria in Water and Water-Formed Deposits". El *Manual de métodos generales*

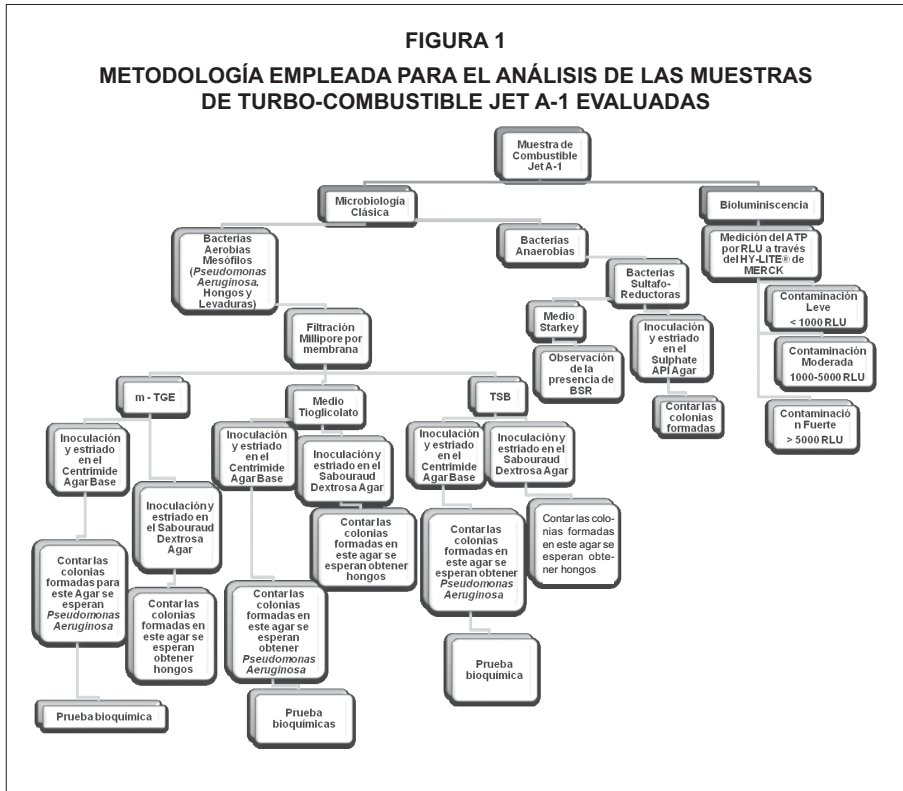


de microbiología de la Universidad Central de Venezuela, de los autores Clavell y Pedrique, así como nuevas metodologías de trabajo como la ASTM D-7436-08 “Standard Test Method for Adenosine Triphosphate (ATP) Content of Microorganisms in Fuel, Fuel/Water Mixtures and Fuel Associated Water”, con el fin de realizar los análisis a las diversas muestras de combustible de diferentes procedencias.

Para la cuantificación de los microorganismos presentes se analizaron las muestras de combustible de aviación a través de la preparación de medios de cultivos líquidos y sólidos para luego determinar la presencia o ausencia de bacterias aerobias mesófilas, hongos y levaduras, *Pseudomonas aeruginosa* y bacterias sulfato-reductoras (BSR) en los combustibles de aviación Jet A-1; y se evaluó la metodología de detección de la presencia de ATP a través del luminómetro Hy-Lite® patentado por Merck (2010). Para cuantificar las bacterias presentes en los medios de cultivos sólidos, como lo es el recuento total de unidades formadoras de colonias (UFC), se empleó un equipo contador de colonias que está disponible en el laboratorio.

Estandarización de las metodologías que permitan determinar e identificar la presencia de microorganismos en las muestras de turbo-combustible Jet A-1

Para determinar la presencia de microorganismos aerobios mesófilos, *Pseudomonas aeruginosa* y bacterias sulfato-reductoras en las muestras de turbo-combustible Jet A-1, se emplearon los procedimientos que se describen brevemente en la Figura 1:



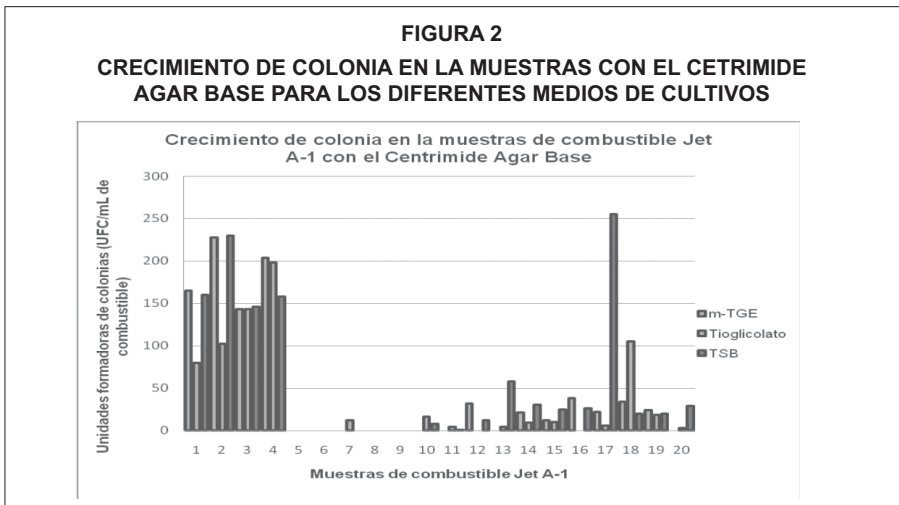
Resultados y discusión

Se obtuvieron como resultado en todas las muestras, luego de la filtración por membrana e inoculación en los medios de cultivos m-TGE, TSB y Tioglicolato, la presencia de turbidez con formación de un precipitado blanco y olor desagradable al transcurrir cuatro días de incubación, lo que indica la presencia de contaminación microbiana aerobia mesófila en dichas muestras.

Se infiere que en las 20 muestras analizadas del combustible de aviación Jet A-1 hubo un crecimiento de microorganismos aerobios mesófilos, debido a los cambios del aspecto físico de las muestras que se

reflejo en el enturbiamiento y precipitado blanco en los tres medios de cultivos utilizados, percibiéndose en ellos hasta un olor desagradable. Es necesario acotar que con el método de filtración por membranas a través del cultivo de medios líquidos no se logra identificar con exactitud los microorganismos aerobios que contaminan el combustible de aviación y por ello se recomienda realizar el cultivo con medios sólidos (agares selectivos), que permitan identificar los tipos de microorganismos presentes.

Como se puede observar en la Figura 2, los medios de cultivo m-TGE y Tioglicolato son los más propensos para evidenciar la presencia de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* en las muestras del turbo-combustible Jet A-1 evaluadas.



En la mayoría de las muestras evaluadas se evidenció la ausencia de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, debido a que no hubo presencia del color verdoso, ni formación de colonias sobre las líneas de inoculación, las cuales son representativas de este microorganismo. Dada las razones mencionadas, se notó que en la mayoría de las muestras evaluadas del turbo-combustible Jet A-1 no están presentes estas bacterias; por ende, no están sujetas a esta contaminación microbiana.



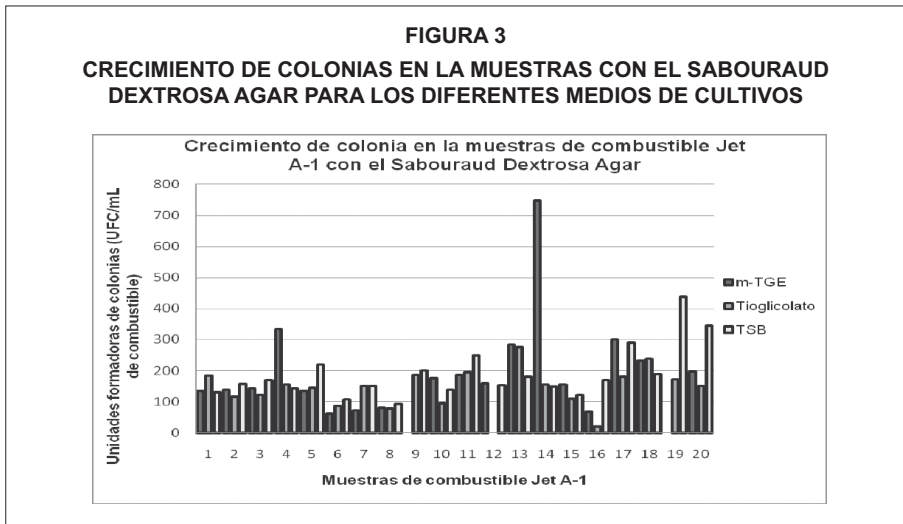
Las muestras #17-m-TGE, #17-Tioglicolato, #17-TSB y #20-TSB presentaron un cambio en el aspecto físico del agar, en el que se observó un color verdoso al igual que un olor a frutas, lo cual es muy característico de este tipo de bacteria. Es posible que estas muestras presenten contaminación microbiana con la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, es por ello que para confirmar su presencia o ausencia se debe realizar una serie de pruebas bioquímicas.

Al realizar el aislamiento en placas de Petri utilizando como medio de cultivo sólido el Sabouraud Dextrosa Agar (SAD), se pudo observar en todas las muestras evaluadas la formación de colonias que presentaron características de mohos filamentosos, sobre las líneas de inoculación en el SAD.

A través de la micrografía se logró identificar la forma característica de la estructura del hongo *Hormoconis resiniae* mediante un lente de 40x y 100x para la muestra #1-Tioglicolato del turbo-combustible Jet A-1. De igual manera se identificaron en las muestras #12 m- TGE, #12- Tioglicolato, #12 -TSB y #14 -TSB, la presencia de hongos aerobios del mismo grupo filo que no pertenecen a la familia *Hormoconis resiniae*. Es por ello que se recomienda realizar las pruebas bioquímicas pertinentes para identificarlos, ya que por micrografía se puede inferir que es el hongo de la especie *Acremonium* o *Fusarium* y con las pruebas bioquímicas se confirmaría su especie.

Se encontró, después de realizar las pruebas para determinar la presencia de las bacterias anaerobias en las muestras de combustible, empleando el medio de cultivo sólido Sulpahte API Agar, la ausencia de colonias. Por lo que se concluye que en la mayoría de las muestras de turbo-combustible Jet A-1 evaluadas no hay presencia de BSR. Vale mencionar que se exceptúa la muestra #5 de las demás analizadas, debido a que en ésta se determinó la presencia de un hongo filamentosos anaerobio. Este hongo no ha sido identificado, sin embargo, por micrografía se podría tratar del *Aureobasidium pullulans* o *Helminthosporium*, pero para confirmar su especie se recomienda realizar las pruebas bioquímicas correspondientes que permitan identificarlo.

Como se puede observar en la Figura 3, los medios de cultivo m-TGE y TSB son los medios más adecuados para evidenciar la presencia de mohos y levaduras en las muestras de turbo-combustible Jet A-1 evaluadas, ya que proporcionan las fuentes de carbono y energía necesarias que favorecen la proliferación de hongos.

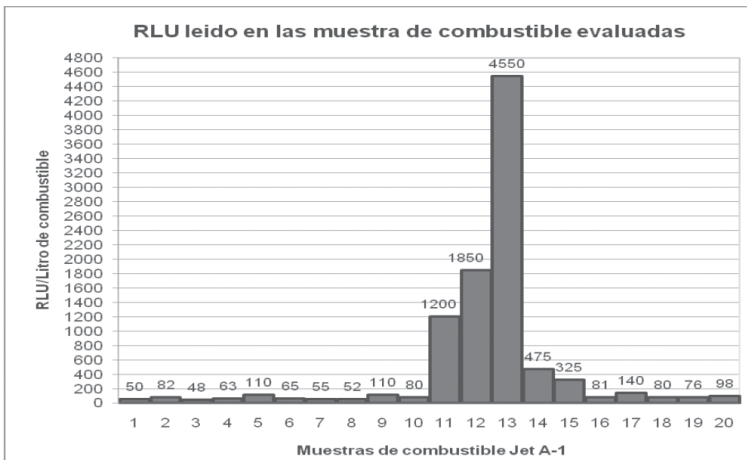


Mediante la metodología de aislamiento en placas Petri utilizando como medio de cultivo sólido el Sulphate API Agar se evidenció la ausencia de las bacterias sulfato-reductoras, debido a que no hubo crecimiento de colonias ni presencia de sulfuro de hierro, que se caracteriza por una pigmentación de color negro sobre las líneas de inoculación. Sin embargo, en la muestra #5 se detectó la presencia de un hongo anaerobio, que se podría tratar de la especie *Aureobasidium pullulans* o *Helminthosporium* sp.

En la Figura 4 se observa un gráfico de barra el cual representa la contaminación microbiana en el combustible de aviación Jet A-1, a través de la medición de ATP con la metodología de bioluminiscencia para cada una de las muestras evaluadas.

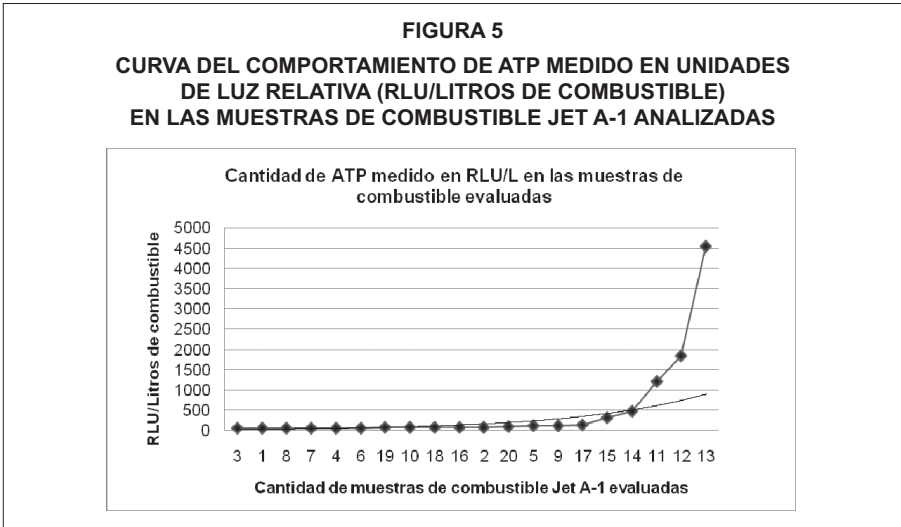


FIGURA 4
REPRESENTACIÓN DEL ATP LEÍDO EN EL HY-LITE® EN UNIDADES DE LUZ RELATIVA (RLU/LITROS DE COMBUSTIBLE) PARA CADA MUESTRA DE JET A-1 EVALUADA

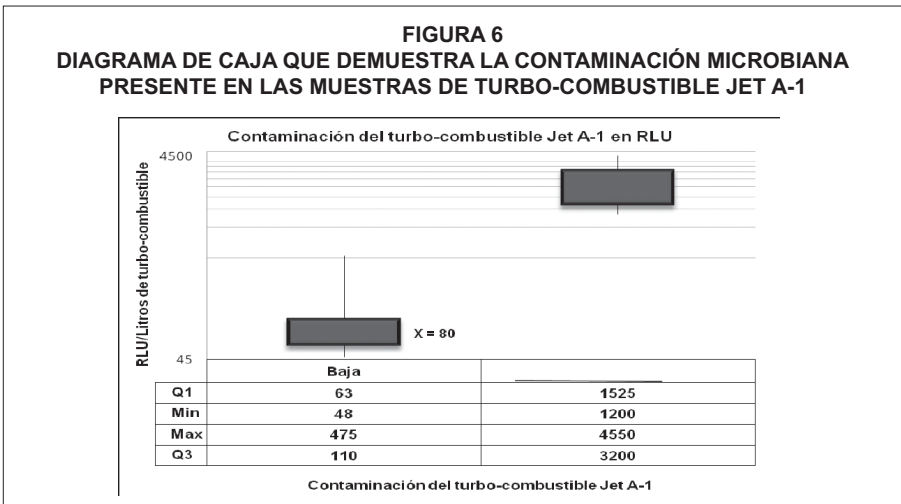


Aquí se puede apreciar que las muestras #11, #12 y #13 se pueden clasificar como de contaminación media, ya que se encuentran en el rango de 1000 y 5000 RLU (unidades de luz relativa) mientras que para las muestras restantes la contaminación es baja debido a que están por debajo de los 1000 RLU. La muestra #13, la cual fue contaminada en el laboratorio resultó con la mayor contaminación microbiana mientras que la muestra #3, que pertenece al tanque derecho de un Boeing 737-300, resultó ser la menos contaminada.

La Figura 5 corresponde a un gráfico de dispersión, en el cual se observa una curva exponencial representando el comportamiento y el grado de contaminación microbiana en las muestras de turbo-combustible analizadas. El grado de contaminación se hace evidente en la medida que incrementa la cantidad de ATP reportada en RLU/litros de combustible, lo cual implica mayor nivel de contaminación.



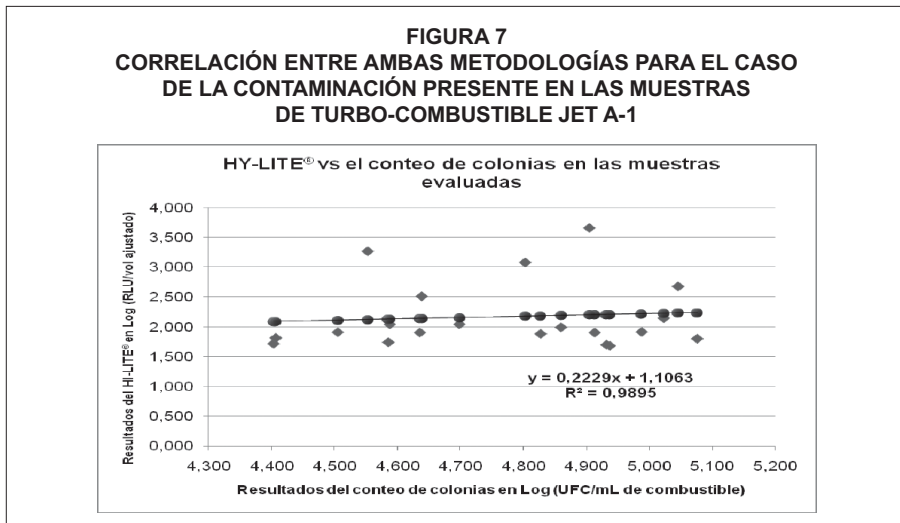
En la Figura 6 se observa un diagrama de caja el cual representa la contaminación en las muestras de turbo-combustible Jet A-1 evaluadas, en el cual se puede comparar la cantidad de ATP reportada y se evidencia la contaminación encontrada. La finalidad de este gráfico es mostrar la





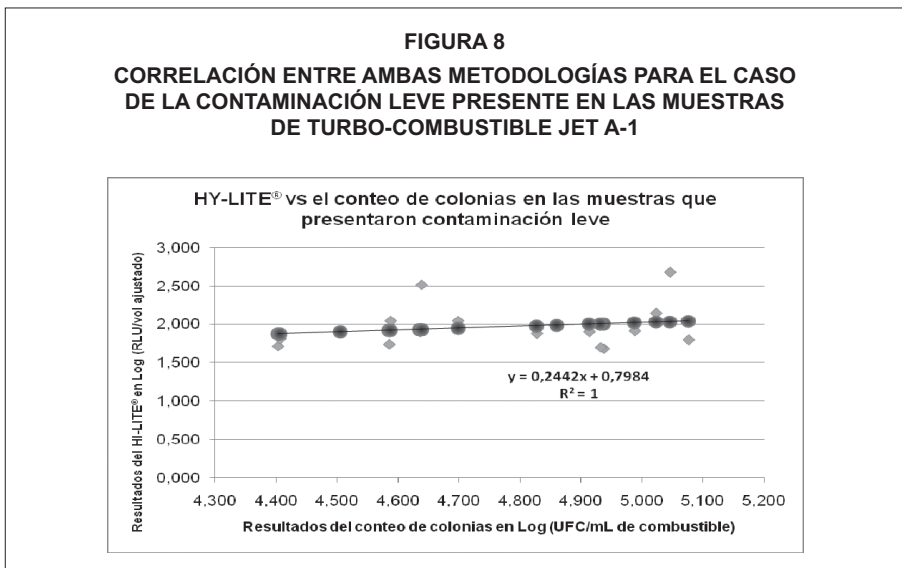
diferencia porcentual presente entre la contaminación leve y moderada, ya que el mayor valor reportado en RLU de la contaminación leve se encuentra muy por debajo del menor valor de la muestra que presenta contaminación moderada. El 25% de las muestras que presentan contaminación baja están en el orden de los 63 RLU, mientras que el 75% restante se encuentra por encima de los 82 RLU y por debajo de los 110 RLU.

En la Figura 7, se puede observar un grafico de dispersión con la finalidad de correlacionar los resultados obtenidos por el método de la microbiología clásica versus los obtenidos por el método de bioluminiscencia, de modo que se establezca una tendencia que permita ajustar la mejor recta. Se logró la recta aplicando los principios básicos de las estadística para el muestreo de poblaciones, con una confianza de 95%, y por el método de regresión lineal se llegó a la expresión matemática $\text{Log (HY-LITE}^{\text{®}}) = 0,2229 \cdot \text{Log(UFC}_{\text{totales}}) + 1,1063$



En la Figura 8 se puede observar un grafico de dispersión para el caso de la contaminación leve, con la finalidad de correlacionar los resultados obtenidos por el método de la microbiología clásica versus los

obtenidos por el método de bioluminiscencia, de modo que se establezca una tendencia que permita ajustar la mejor recta. Se logró la recta aplicando los principios básicos de la estadística para el muestreo de poblaciones, con una confianza del 95%, y por el método de regresión lineal se llegó a la expresión matemática $\text{Log}(\text{HY-LITE}^{\text{®}}) = 0,2442^* \text{Log}(\text{UFC}_{\text{totales}}) + 0,7984$.



Es importante mencionar que no se dispone de estudios de otros investigadores que hayan o estén trabajando con el equipo portátil de Merck en el área de bioluminiscencia, por lo que este estudio inicial es uno de los precursores en este tema.

Conclusiones y recomendaciones

– El análisis de las muestras de turbo-combustibles Jet A-1 empleando la microbiología clásica permitió determinar la presencia de microorganismos aerobios mesófilos en todas las muestras de combustible de aviación evaluadas.



- Mediante el empleo del agar cetrimida y las pruebas bioquímicas se concluye la ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* en las muestras de combustible estudiadas.
- Los medios de cultivos m-TGE y TSB son los medios más apropiados para evidenciar la presencia de mohos en las muestras de turbo-combustible Jet A-1 evaluadas, ya que proporcionan las fuentes de carbono y energía necesarias que favorecen la proliferación de este tipo de organismo.
- Mediante la metodología de aislamiento de placas Petri utilizando como medio de cultivo sólido el Sulphate API Agar, se evidenció la ausencia de las bacterias sulfato-reductoras, debido a que no hubo crecimiento de colonias ni presencia de sulfuro de hierro, que se caracteriza por una pigmentación de color negro sobre las líneas de inoculación.
- Con la metodología de bioluminiscencia, con la medición de ATP se logró clasificar las muestras de turbo-combustible Jet A-1 analizadas en parámetros de contaminación baja y media, ya que no se presentó contaminación alta en las muestras evaluadas.
- Las expresiones matemáticas que permiten establecer la correlación entre ambas metodologías varían según la cantidad de muestras tomadas, ya que éstas son las que definen el ajuste de la mejor curva.
- Es necesaria la continuación de esta investigación, debido a que para la evaluación y validación de la correlación entre la metodología de la microbiología clásica y los resultados obtenidos por el método de bioluminiscencia, se empleó el mínimo de muestras necesarias que engloban estadísticamente los rangos de contaminación microbiana en los valores de las muestras analizadas.



Referencias

- CLAVELL, L. y PEDRIQUE, M. (1983). *Microbiología Manual de métodos generales*, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN 1023) (2000). (5ª revisión). *Productos derivados del petróleo. Turbocombustibles*. Editorial Fondonorma, Caracas, Venezuela.
- GONCALVES, C. y SIRIT, E. (2005). *Análisis microbiológico en combustibles turbo kerosina y en fluidos de corte*. Trabajo de grado, Universidad Metropolitana, Caracas, Venezuela.
- MERCK (2010). *HY-LITE® Jet A-1* [en línea]. Recuperado el 18 de noviembre del 2010 de: <http://www.merck-chemicals.com.ve/>
- PASSMAN, F. (2003). *Fuel and fuel system microbiology: fundamentals, diagnosis, and contamination control*. Mayfield, USA. ASTM Stock Number: MNL47.
- PETRÓLEOS DE VENEZUELA, S.A - PDVSA (2005). *Certificado de Calidad de turbo-combustibles*. Caracas, Venezuela.
- RACIOPPO, M. (2009). *Desarrollo de metodologías de trabajo para la cuantificación de bacterias sulfato reductoras en muestras de combustibles de aviación*. Trabajo de grado, Universidad Metropolitana, Caracas, Venezuela.
- SILVA, B. (2009). *Establecimiento de protocolos para la cuantificación de hongos Hormoconis resinae en turbocombustibles de aviación*. Trabajo de grado, Universidad Metropolitana, Caracas, Venezuela.
- STANLEY, P. (1989). "A review of bioluminescent ATP techniques in rapid microbiology". *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*. Volume 4, Issue 1, pages 375-380.
- VALERA, A. (2010). *Evaluar el uso de biocidas para el control de bacterias sulfato reductoras (BSR) presentes en muestras de combustibles de aviación*. Trabajo de grado, Universidad Metropolitana, Caracas, Venezuela.