

ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN DE MEZCLAS COMERCIALES DE DIÉSEL Y BIODIÉSEL EMPLEANDO BACTERIAS DEGRADADORAS AISLADAS DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS DE LA REGIÓN SANTA FE

GUZMÁN VICTORIA¹, CERUTI ROBERTO¹, MARINO FERNANDA¹, SIMONETTA ARTURO², MANZO RICARDO¹ y MAMMARELLA ENRIQUE¹

¹ Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC)-Universidad Nacional del Litoral (UNL)-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Santa Fe, Argentina

² Cátedras de Microbiología y Biotecnología, Departamento de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Grupo: Y

Palabras clave: biodegradación, hidrocarburos, bacterias.

INTRODUCCIÓN

La biorremediación o remediación ambiental es un tema de amplio interés en los últimos años a nivel mundial y de relevancia estratégica, particularmente en la Argentina, dado el interés en desarrollar procesos ambientalmente sustentables y poco contaminantes del medioambiente. Esta tecnología ambiental es considerada segura, eficiente y económica.

En la región Santa Fe, si bien no hay grandes industrias o plantas petroquímicas, existen numerosos puestos, estaciones de servicio y centros de abastecimiento rurales o urbanos, donde el combustible es llevado y cargado.

Por otro lado, en la región Santa Fe, se están desarrollando diversos emprendimientos energéticos a partir de la producción de biocombustibles, principalmente el biodiésel. Teniendo en cuenta que, desde 2013, es obligatoria la adición de biodiésel a los combustibles de consumo interno (hasta un 12% del total desde Abril de 2016), es fundamental tener un conocimiento relacionado con el comportamiento de las mezclas de diésel y biodiésel ante un eventual derrame y contaminación de las zonas productivas. En la actualidad, Santa Fe concentra el 80 % de la capacidad argentina instalada para producir biocombustibles, representando 2,4 millones de toneladas anuales (Chidiak *et al.*, 2012; Informe del Gobierno de la Provincia de Santa Fe, 2014). Del total de lo producido, el 67% es exportado a través de los puertos de las ciudades de Santa Fe y Rosario. Esto es debido a que la economía provincial está basada en la agroindustria, donde la cosecha y transporte de granos implican una alta demanda de energía por parte de camiones, cosechadoras y tractores involucrados. De esta forma, cualquier falla en los sistemas de alimentación de combustible de las cosechadoras ocasionaría graves trastornos, dado lo limitado del parque de máquinas disponible y la acumulación y superposición de trabajo que ocurre en los períodos de siembra y de recolección.

Por lo tanto, el combustible diésel es un elemento fundamental en la agricultura actual, dado que la moviliza y tiene una gran importancia en los costos de producción (alrededor del 27 % de los costos totales de implantación y mantenimiento de los cultivos), donde su disponibilidad en el campo se ha tornado en un insumo estratégico.

Proyecto: Obtención de enzimas provenientes de bacterias aisladas de suelos productivos contaminados con hidrocarburos livianos (diésel y naftas) para su empleo como potenciales agentes biorremediadores

Director del proyecto: Enrique J. Mammarella/Ricardo M. Manzo

Director del becario/tesista: Enrique J. Mammarella/Ricardo M. Manzo

Lamentablemente, en numerosos establecimientos aún no se llevan adecuados controles y manejos del combustible, produciéndose derrames por fallas mecánicas o humanas que van afectando paulatinamente más zonas productivas, debiéndose por tanto pensar en su recupero. De esta forma, el seguimiento, análisis y tratamiento de estas zonas contaminadas también surge como una alternativa de especial interés en la región. Por lo tanto, es necesario estudiar y desarrollar el conocimiento en cuanto a las zonas productivas contaminadas con diésel, biodiésel y sus mezclas, de manera de poder aplicar procesos de saneamiento y biorremediación adecuados que permitan resolver los daños causados por las pérdidas o el mal manejo de los combustibles. Asimismo, se incrementará el conocimiento de las zonas contaminadas de modo de poder realizar el seguimiento y control de los diferentes parámetros y puntos clave de dicho proceso de modo de evitar y minimizar futuras contaminaciones.

Por lo tanto, en la presente investigación se propuso estudiar diferentes microorganismos aislados de suelos de la región Santa Fe contaminados con diferentes hidrocarburos (principalmente diésel y naftas) tanto en sus capacidades degradativas como de producción de sustancias tensoactivas de forma de seleccionar aquellas mejores a ser empleadas, individualmente o combinadas en consorcios definidos, en estudios de biorremediación *ex situ* por bioaumentación de suelos productivos contaminados en los que se suelen desarrollar actividades agrícolas.

METODOLOGÍA

Selección de los emplazamientos y toma de muestra

Se seleccionaron los emplazamientos potencialmente contaminados en la ciudad de Santa Fe. Para ello se eligieron varios sitios de expendio y descarga de combustibles y se tomaron muestras de tierra con signos evidentes de estar contaminada con naftas, aceites o grasas hidrocarbonadas. Se recolectaron muestras superficiales con espátulas y de media profundidad (hasta 20 cm) empleando un barreno extractor. De esta forma se recolectaron 6 muestras de diferentes lugares, las que se almacenaron en heladera, a 4°C.

Determinación de hidrocarburos totales del petróleo (TPH)

Se empleó un protocolo general de extracción (Método EPA 418.1, 1978; método EPA 3540C, 1996; Norma IRAM 29550, 2003) de los hidrocarburos de muestras de tierra. Para lograr esto, se disolvieron 5 gr de cada muestra de tierra en 150 ml de agua destilada y se dejaron en agitación por 24 h a 250 rpm a 30 °C y usando una solución 1 M de NaCl.

Luego de la incubación, las muestras fueron dejadas reposar por 24 h, procediéndose luego a la extracción líquido-líquido con una mezcla 1:1 de n-hexano-diclorometano (1:1, 100 ml). Luego, la fase orgánica fue recuperada mediante filtración en papel, secada con sulfato de sodio para secar y trasvasada a un Erlenmeyer previamente tarado. El mismo fue colocado en estufa a 50°C por 48 h para eliminar los solventes de extracción.

Asimismo, una muestra no evaporada (5 ml) se almacenó en tubos estériles para el análisis de concentración e identificación de compuestos por GC-MS.

A continuación, se colocó el matraz de Erlenmeyer en un desecador hasta lograr la temperatura ambiente y luego se pesó. La masa de hidrocarburos extraídos por gramo de suelo se calculó en forma gravimétrica empleando la **Eq 1**:

$$\text{Hidrocarburos recuperados con } n\text{-hexano} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g suelo}} \right) = \frac{MR}{MS} \quad (1)$$

MR: Masa residual de hidrocarburos obtenidos del suelo luego de la extracción (en mg)

MS: masa de suelo utilizada (en g)

Aislamiento de cepas bacterianas aerófilas

Para el aislamiento de las bacterias degradadoras se empleó el método de enriquecimiento por cultivos sucesivos en fase líquida, de acuerdo a lo propuesto por Bento *et al.* (2005), con algunas modificaciones. Se utilizó el medio BH suplementado con diferentes concentraciones de diésel comercial, 2% (*m/v*) de NaCl y 0.1% (*v/v*) de la solución de micronutrientes compuesta por: EDTA (2.5), ZnSO₄ 7H₂O (10.95), FeSO₄ 7H₂O (5), MnSO₄ H₂O (1.54), CuSO₄ 5H₂O (0.39), Co(NO₃)₂ 6H₂O (0.25) y Na₂B₄O₇ 10H₂O (0.17).

Los cultivos iniciales se prepararon adicionando 10 g de cada muestra de suelo a 250 ml de medio BH suplementado con diésel al 1% (*v/v*), e incubando durante 7 días a 30°C con agitación ocasional. A partir de los mismos se realizó una resiembra al 3% (*v/v*) en matraces de Erlenmeyer en iguales condiciones de cultivo, empleando 300 ml de medio BH e incubando durante una semana, procediendo luego a efectuar los primeros aislamientos en placas de Petri con Agar Nutritivo. Seguidamente se efectuó un enriquecimiento adicional a partir de los cultivos enriquecidos anteriores, empleando una concentración final de hidrocarburo del 2% (*v/v*). Este procedimiento fue repetido hasta lograr llegar a una concentración del 5% (*v/v*), de modo de adaptar a los microorganismos a cantidades crecientes del hidrocarburo en estudio (Simonetto Colla *et al.*, 2013).

Luego de efectuar el segundo enriquecimiento en medio BH adicionado con la fuente de carbono, se procedió a aislar las bacterias a partir de la totalidad de los cultivos realizados. Para ello se emplearon dos medios agarizados diferentes: Agar Nutritivo y un medio ecológico [BH agarizado con agregado de NaCl a una concentración de 2% (*m/v*) y diésel]. El diésel se colocó sólo en la superficie de la placa de Petri, empleando un volumen de 0,5 ml y esparciéndolo homogéneamente por toda la superficie con ayuda de una espátula de Digraslky estéril, y dejando luego descansar la placa hasta lograr una relativa absorción. En todos los aislamientos se aplicó el método de diluciones sucesivas y siembra en placas de Petri.

La composición del medio BH, en g L⁻¹, se indica a continuación: KH₂PO₄ (1.0 g), K₂HPO₄ (1.0 g), NH₄NO₃ (1.0 g), MgSO₄ 7H₂O (0.2 g), FeCl₃ (0.05 g), CaCl₂ 2H₂O (0.02 g); llevado a pH 7.0.

Conservación de las cepas bacterianas

Los microorganismos aislados como colonias libres de contaminantes controlados mediante microscopía óptica por contrastes de fases y tinción de Gram, fueron conservados en placas de Petri y en crioviales con el medio distribuido en picos de flauta, a 4°C y a -80°C, empleando la técnica descripta por Manzo *et al.* (2013).

Identificación bioquímica y genética de los aislados bacterianos

La identificación inicial de los aislados se realizó mediante pruebas bioquímicas, siguiendo la metodología aconsejada por MacFaddin (2003). Luego, los resultados obtenidos en esos ensayos bioquímicos se utilizaron para aplicar las claves taxonómicas propuestas por el volumen 3 y 5 del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (De Vos *et al.*, 2009; Whitman *et al.*, 2012).

Para la identificación preliminar de todas las bacterias aisladas se efectuaron las siguientes pruebas bioquímicas: observación macroscópica de las colonias aisladas en Caldo Nutritivo (Biokar) y en medio ecológico; análisis microscópico empleando un microscopio de contraste de fases; tinción simple y Gram; prueba de la oxidasa; prueba de la catalasa; prueba O/F con D-glucosa, D-sacarosa, con y sin peptona bacteriológica (Difco), a 25 y 37°C por 24-96 h; crecimiento a 0.5, 5, 10, 15, 18 y 20% NaCl por 24-96 h a 30°C; crecimiento en medios selectivos (Agar Cetrimida, Caldo Lauril Sulfato).

La identificación de los géneros bacterianos a los que pertenecen los aislados con mayor capacidad degradadora de hidrocarburos, se realizó en forma genética, utilizando la técnica del secuenciamiento parcial de las regiones variables del gen 16S rRNA, particularmente la región V1.

Evaluación de la eficiencia extractiva de hidrocarburos con diferentes solventes

Para analizar qué solvente o mezcla de ellos es más eficiente en cuanto a su capacidad extractiva del diésel y mezclas, el Eurodiésel comercial se sometió a extracciones líquido-líquido con el mismo volumen inicial (100 ml) de diversos solventes. Seguidamente, se utilizó la misma técnica informada previamente para el estudio de la capacidad degradativa, aunque las preparaciones [240 ml de agua destilada y 4% (v/v) de diésel] no fueron inoculadas con microorganismos.

Los solventes utilizados fueron: n-hexano, diclorometano, cloroformo:acetona (50:50), cloroformo:acetato de etilo (50:50), cloroformo:éter sulfúrico (50:50), éter sulfúrico, metanol:acetona (50:50), metanol, cloroformo.

La eficiencia de extracción se calculó mediante la **Eq 2**:

$$EF\% = \frac{MR}{MT} \times 100 \quad (2)$$

MR: Masa residual de diésel luego de la extracción

MT: Masa total de diésel introducida

Además, se tomó una muestra (5 ml) para cada extracción líquido-líquido realizada y se almacenó en tubos estériles para el análisis de concentración e identificación de compuestos por GC-MS.

Biodegradación *in vitro* de hidrocarburos

Para efectuar las biodegradaciones, se inoculó cada aislado bacteriano en matraces de Erlenmeyer con 240 ml de medio BH salino suplementado con micronutrientes. A cada matraz se le agregó un 4% (v/v) de diésel y un 3% (v/v) de inóculo bacteriano (volumen final: 250 ml). Los mismos se incubaron a 28-30°C durante 14 días, con agitación orbital a 200 rpm.

A continuación, empleando el protocolo descrito por Ben Ayed *et al.* (2015), la extracción del diésel se realizó de la siguiente manera: se colocó el sobrenadante libre de células en una ampolla de decantación y se efectuaron tres extracciones líquido-líquido discontinuas con n-hexano (Cicarrelli, BA, Argentina), empleando un volumen

de 50 ml cada vez (100-150 ml). Seguidamente se recolectó la fase acuosa y se almacenó en un frasco limpio antes de ser llevada a -20°C para el análisis de sus propiedades tensoactivas. Paralelamente, se recolectó la fase orgánica y la interfase formada por producto de la emulsión entre el diésel y el biosurfactante producido. Dicha fase orgánica se secó (eliminación del agua residual) agregando suficiente cantidad de sulfato de sodio anhidro (Cicarelli, BA, Argentina) y trasvasándola luego a un Erlenmeyer limpio y previamente tarado. Las sales de secado también se almacenaron para estudiar la presencia de biosurfactantes en la interfase formada durante la biodegradación *in vitro* del diésel/biodiésel. En forma simultánea, una alícuota de 5 ml de cada extracto hexánico se almacenó en un tubo estéril para su posterior análisis por GC-FID y GC-MS. El extracto remanente se cubrió con un film al que se le efectuaron varios orificios y se lo colocó en estufa a $45-50^{\circ}\text{C}$ durante 72 h, de manera de evaporar totalmente el n-hexano empleado y recuperar el aceite de diésel/biodiésel remanente y parcialmente degradado (se debe tener en cuenta que el punto de inflamación del Eurodiésel 500 es de 60°C).

Finalmente, luego de pesar los extractos remanentes evaporados, se llevó a cabo la esterilización de los mismos con filtros para jeringas Minisart (Sartorius, Gotinga, Alemania) de $0.45\ \mu\text{m}$ y se almacenaron en tubos estériles hasta su posterior análisis por GC-FID y GC-MS.

Todos los ensayos de biodegradación fueron realizados por duplicado para cada aislado bacteriano utilizando un control no inoculado en cada tanda de experiencias.

Determinación de la biodegradación del diésel comercial por métodos gravimétricos

El nivel de degradación de Eurodiésel 500 provocado por cada microorganismo en estudio se determinó utilizando el método de análisis gravimétrico propuesto por Ben Ayed *et al.* (2015). El porcentaje de biodegradación de hidrocarburos ($DH\%$) se calculó mediante la **Eq 3**:

$$DH\% = \frac{MC - MM}{MC} \times 100 \quad (3)$$

MM: Masa de diésel residual en la muestra ensayo

MC: Masa de diésel residual en el control abiótico

Biodegradación de los hidrocarburos e identificación de los componentes principales del combustible mediante GC-FID Y GC-MS

El biodiésel de aceite de soja, el diésel fósil, sus mezclas correspondientes y las muestras degradadas, se analizaron empleando un cromatógrafo de gases (modelo Clarus 600, Perkin Elmer) acoplado a un detector de espectrometría de masas, con una ionización por impacto electrónico y analizador de masas tipo cuadrupolo con trampa de iones (modelo Clarus 600T, Perkin Elmer).

Cada muestra fue corrida en el cromatógrafo por duplicado y a su vez, se obtuvieron y analizaron dos muestras por ensayo de degradación. El resultado logrado es el promedio intermuestra de dichas medidas.

Producción, extracción y caracterización de los biosurfactantes

Los primeros ensayos se realizaron con el sobrenadante salino obtenido de las extracciones con n-hexano, ya que se intuía que los biosurfactantes se encontraban

disueltos en el mismo. Sin embargo, al obtener resultados bajos o negativos se llegó a la conclusión de que los mismos se encontraban en la interfase (la cual era observable a simple vista) manteniéndose muy unidos (emulsión fuerte) al diésel, por lo que se recolectaban en la fase orgánica (n-hexánica) durante la extracción. El proceso de secado con sal separó dicha interfase, permitiendo recolectar el biosurfactante producido mediante redisolución de la sal de secado en 100 ml de agua destilada estéril.

Con este procedimiento fue posible recuperar la interfase de la preparación compuesta principalmente por el biosurfactante. Dicha recuperación se realizó tanto en forma mecánica, empleando pipeta automática, como por flotación. A los biosurfactantes recuperados se les determinaron luego sus propiedades emulsificantes y tensoactivas.

Determinación del índice de emulsificación (E24)

El protocolo de trabajo se llevó a cabo según la técnica descrita por Álvarez *et al.* (2015), con modificaciones. En tubos de ensayo se depositaron 800 µl de agua destilada, 1 ml de diésel y 200 µl de la suspensión del biosurfactante. Luego se agitaron en vórtex a su máxima velocidad durante 2 minutos, dejándolos reposar por 24 h en la heladera.

El índice de emulsificación se calculó mediante la **Eq 4**:

$$E24 = \frac{HE}{HT} \times 100 \quad (4)$$

HE: Altura de emulsión (cm)

HT: Altura total de la mezcla (cm)

Los controles de surfactantes comerciales (Tween 80, Tritón-X-100, SDS, Bromuro de cetiltrimetilamonio y detergente comercial) se ensayaron en una concentración de 5 mg/ml.

Test de desplazamiento del aceite

El protocolo de trabajo se llevó a cabo según la técnica descrita por Ben Ayed *et al.* (2015). En una placa de Petri de 15 cm de diámetro se colocaron 50 ml de agua destilada y 20 µl de diésel comercial, el cual formó una fina capa sobre la superficie. Seguidamente, se colocaron 10 µl de la suspensión del biosurfactante y se midió el diámetro del halo producido. Los resultados se informaron como área de diésel desplazado, lo que se relaciona con la actividad superficial de cada biosurfactante, es decir, la capacidad de disminución de la tensión superficial producida en la interfase agua-diésel por el biosurfactante (Onur *et al.*, 2015).

Los controles de surfactantes comerciales (Tween 80, Tritón-X-100, SDS, Bromuro cetiltrimetilamonio y detergente comercial) se ensayaron en una concentración de 5 mg/ml.

Todas las pruebas realizadas con los biosurfactantes producidos por los aislados bacterianos se hicieron por triplicado y los resultados informados son el promedio de los mismos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se tomaron 6 muestras de diferentes emplazamientos contaminados con combustibles, a los cuales se les extrajo y se le determinó en forma gravimétrica y cromatográfica los hidrocarburos contenidos en ella. En la Tabla 1 se aprecia las masas obtenidas de los hidrocarburos totales del petróleo, así como el número de aislados bacterianos aeróbicos por muestra. Se aprecia claramente que aquellas muestras que se encontraban más contaminadas, también fueron aquellas donde el

porcentaje de aislamiento de bacterias fue mayor. Se observó también que la relación carbono/nitrógeno/fósforo se encuentra alterada en todas las muestras de suelo, lo que dificulta también la recuperación del mismo (resultados no mostrados).

Muestra de tierra	Masa de hidrocarburos (mg/gr)	Cepas aisladas	% de aislamiento
Muestra 1a	4,62	7/8/13/17/24/28	17,1
Muestra 1b	2,16	18/23/29	8,6
Muestra 2a	33,26	14/15/16/19/20/22	17,1
Muestra 2b	24,2	21/25/31/32	11,4
Muestra 3a	50,88	1/4/5/6/9/10/27	20
Muestra 3b	68,76	2/3/11/12/26/30/33/34/35	25,8

Tabla 1: Cantidad de cepas bacterianas aisladas por cada muestra de suelo.

De las 35 cepas bacterianas identificadas a partir de las muestras de suelo, se puede observar que en las muestras 1a, 1b y 2b los aislamientos corresponden al género *Pseudomonas*; en la 2a se identificaron cepas pertenecientes al género *Acinetobacter*, mientras que en la muestra 2b y 3b se aislaron diferentes géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, respectivamente.

En base a esto, podría evidenciarse una relación entre la concentración de hidrocarburos en las muestras y la capacidad de degradación de las cepas aisladas a partir de las mismas, dentro de las cuales se identificaron los mayores porcentajes de degradación (95,82% por *Pseudomonas* y 91,83% por *Bacillus*).

Los resultados obtenidos en este trabajo presentan una coincidencia con el marco teórico (Laura Dias 2011), el cual informa que a mayor contenido de hidrocarburos en suelos, pueden aislarse microorganismos con elevadas capacidades de degradación, lo que puede deberse a la necesidad de los mismos de utilizar estos contaminantes como fuente de carbono y energía, aunque probablemente la diversidad microbiana sea también reducida.

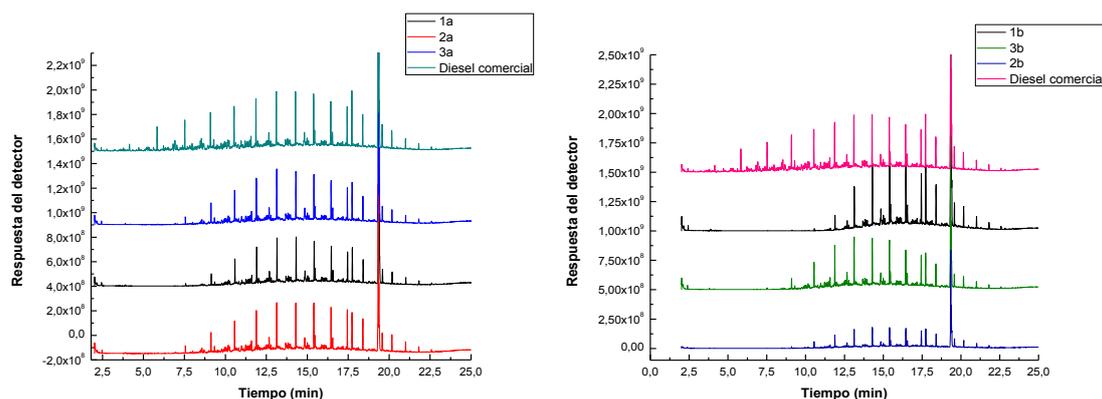


Figura 1: Análisis por GC-MS de los hidrocarburos extraídos de los suelos contaminados. Los cromatogramas presentan un offset (corrimiento) entre ellos de manera tal de hacer más interactiva su comprensión.

En la Figura 1 puede observarse el perfil de componentes obtenido de la extracción de los hidrocarburos de los suelos contaminados y de los cuales se efectuó el aislamiento de las bacterias degradadoras. Puede apreciarse que los suelos están contaminados

con combustibles tanto de origen vegetal como animal siendo los perfiles muy similares al combustible de origen comercial aunque con pequeñas diferencias. Las muestras 2a y 3b presentan una elevada concentración de hidrocarburos, tratándose de suelos productivos contaminados de la región Santa Fe.

En la Tabla 2 y 3, se aprecian todas las pruebas bioquímicas y genéticas que fueron realizadas a los aislados bacterianos provenientes de los suelos, de forma de poder conocer sus características morfológicas, bioquímicas, su resistencia a los contaminantes y en definitiva, su identidad. Los resultados observados fueron logrados empleando medios estándares (como Agar Nutritivo) y un medio ecológico (ME) con un 5% de diésel.

Cepa	Forma y agrupación	Gram	% de diésel
1	Bacilos medianos, poco móviles, aislados o en pares	-	5
2	Bacilos tipo <i>Pseudomonas</i>	-	5
3	Bacilos medianos, movilidad reducida, aislados o en pares	-	5
4-6	Cocos-baciloides	Variable	5
7-11	Bacilos tipo <i>Pseudomonas</i> , mayormente aislados y algunos en pares	-	5
12	Bacilos medianos, movilidad reducida, aislados o en pares	-	5
13	Bacilos muy móviles, aislados (<i>Pseudomonas</i>)	-	5
14	Cocos-baciloides	Variable	5
15	Cocos	+	5
16	Cocos	+	ME
17	Bacilos medianos, móviles, mayormente aislados y algunos en pares	-	ME
18	Bacilos cortos, móviles, aislados o en pares	-	5
19	Cocos en pares y en cadenas (4 o 6)	+	5
20	Cocos aislados, en pares y en cadenas (4 o 6)	+	ME
21	Bacilos cortos, móviles, aislados (<i>Pseudomonas</i> posiblemente)	-	ME
22	Cocos aislados y en grupos de 2, 4 ó 6	+	ME*
23-32	Bacilos medianos, móviles, aislados (<i>Pseudomonas</i>)	-	ME
33-34	Bacilos grandes, largos. En cadena con tendencia a formar ramificaciones. Presentan esporos en los extremos del microorganismo y puede verse hasta 2 esporos/microorganismo; no móviles	+	ME
35	Bacilos pequeños, móviles, aislados (<i>Pseudomonas</i>)	-	ME

* ME: medio ecológico

Tabla 2: Estudios microscópicos de las bacterias degradadoras aisladas.

Cepa	C	Catalasa	Oxidasa	L-S: Gas-Crec.	O-F	NaCl	Género ⁺
1	+	+	++	- / +	+	+ (20%)	<i>Pseudomonas</i>
2	+	+	+	- / +	+		<i>Pseudomonas</i>
3	+	+	++	- / +	+		<i>Pseudomonas</i>
4	-	+	+	- / -	-	+ (5%)	<i>Acinetobacter</i>
5	-	+	+	- / -	-	+ (20%)	<i>Acinetobacter</i>
6	-	+	-	- / -	-	+ (20%)	<i>Acinetobacter</i>
7-8	+	+	++	- / +	+	+ (20%)	<i>Pseudomonas</i>
9-13	+	+	++	- / +	+		<i>Pseudomonas</i>
14	-	+	+	- / -	-	+ (20%)	<i>Acinetobacter</i>
15	-	+	-	- / -	-	+ (20%)	<i>Acinetobacter</i>
16	-	+	+	- / -	-	+ (20%)	<i>Acinetobacter</i>

17	-	+	-	- / +	+	+	(20%)	<i>Pseudomonas</i>
18	-	+	-	- / +	+	+	(20%)	<i>Pseudomonas</i>
19	-	+	+	- / -	-	+	(20%)	<i>Acinetobacter</i>
20	-	+	-	- / -	-	+	(20%)	<i>Acinetobacter</i>
21	+	+	++	- / +	+			<i>Pseudomonas</i>
22	-	+	-	- / -	-	+	(20%)	<i>Acinetobacter</i>
23	+	+	++	- / +	+			<i>Pseudomonas</i>
24	+	+	+	- / +	+			<i>Pseudomonas</i>
25-26	+	+	++	- / +	+			<i>Pseudomonas</i>
27	+	+	+	- / +	+			<i>Pseudomonas</i>
28-30	+	+	++	- / +	+			<i>Pseudomonas</i>
31	+	+	++	- / +	+	+	(10%)	<i>Pseudomonas</i>
32	+	+	++	- / +	+	+	(20%)	<i>Pseudomonas</i>
33-34	- / +	+	+	- / -	-	+	(10%)	<i>Bacillus</i>
35	+	+	++	- / +	+	+	(15%)	<i>Pseudomonas</i>

* C corresponde al crecimiento en Agar Cetrimida

+ Estos resultados pertenecen a las pruebas de identificación genética realizadas

Tabla 3: Resultados de las pruebas bioquímicas y genéticas efectuadas sobre las bacterias degradadoras aisladas.

Todos los microorganismos aislados resultaron ser aeróbicos (dado que se prefirió aislar estos microorganismos con respiración oxidativa), con una elevada tasa de crecimiento, catalasa positivos y relativamente resistentes a la presencia de elevadas concentraciones de NaCl. Asimismo, ningún microorganismo produjo gas a partir de la fermentación de la D-glucosa. La presencia de peptonas en el medio O/F modificó el pH del medio de reacción semi-sólido y la capacidad de fermentar tanto la D-glucosa como la D-sacarosa.

Los géneros identificados resultaron ser *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, las cuales son capaces de procesar, integrar y reaccionar a una amplia variedad de condiciones cambiantes en el medio ambiente mostrando una alta capacidad de reacción a señales físico-químicas y biológicas. Esto provoca que estos géneros de bacterias presenten una elevada versatilidad metabólica pudiendo utilizar como nutrientes un elevado de fuentes de carbono diferentes e imposibles de metabolizar por la mayoría de los géneros bacterianos, como son los hidrocarburos de origen fósil y derivados.

Por otro lado, los mejores solventes que resultaron recuperar la mayor cantidad de masa (y componentes) de la mezcla de combustible en estudio, se observan en la **Tabla 4**.

Puede apreciarse una coincidencia entre los valores logrados por gravimetría y los obtenidos por cromatografía gaseosa.

Numero de muestra	Solvente de extracción	% Extracción de diésel por GC-MS	% Extracción de diésel por gravimetría
1	Cloroformo-Acetato de Etilo (50:50)	69,37	74,9
2	Cloroformo-Acetona (50:50)	85,34	81,6
3	Cloroformo-Éter sulfúrico (50:50)	76,89	83,1
4	Cloroformo	77,28	79,6
5	Metanol	42,97	43,8
6	Metanol-Acetona (50:50)	80,90	82,1
7	Hexano	91,91	88,9
8	Diclorometano	68,73	66,5

9	Éter Sulfúrico	59,87	58,7
---	----------------	-------	------

Tabla 4: Evaluación de la capacidad extractiva del B10 utilizando diferentes mezclas elutrópicas.

De la **Tabla 5** se desprenden los resultados de biodegradación de las mezclas de diésel y biodiésel por los diferentes aislados bacterianos luego de los ensayos fermentativos y posterior recuperación del aceite remanente. Se observó una relación directa entre los estudios gravimétricos y los cromatográficos.

Cepa	% Degradación de diésel por GC-MS	% Degradación de diésel por gravimetría	E24	Área de desplazamiento
1	54,41	54,70	25	11,34
2	71,58	72,76	35,7	50,26
3	81,23	77,65	39,3	23,76
4	60,09	56,44	46,4	16,62
5	38,18	26,54	0	7,07
6	54,71	50,02	42,8	11,34
7	84,44	87,27	0	33,18
8	79,86	79,87	42,8	9,62
9	95,82	93,10	14,3	56,74
10	73,02	73,52	42,8	41,85
11	78,45	77,64	7,1	34,21
12	80,95	80,59	42,8	38,48
13	70,11	68,21	0	50,26
14	65,91	52,30	64,3	19,63
15	69,60	69,96	42,8	19,63
16	41,49	38,42	39,3	47,78
17	57,85	59,63	10,7	4,15
18	61,95	59,59	0	21,24
19	65,78	57,82	0	0,78
20	68,97	66,01	14,3	19,63
21	72,70	71,98	28,6	12,57
22	61,07	57,37	50	12,57
23	81,22	81,61	35,7	15,90
24	86,70	93,52	39,3	18,09
25	79,12	78,52	35,7	19,63
26	91,24	91,81	64,3	33,18
27	89,79	93,01	46,4	7,07
28	90,52	93,65	78,6	9,08
29	83,99	91,44	21,4	3,14
30	90,71	97,65	82,1	8,55
31	82,14	82,61	14,3	15,9
32	53,68	50,73	0	7,07
33	91,83	90,34	7,1	15,2
34	77,27	74,14	71,4	9,62
35	68,99	62,58	0	15,9

Tabla 5: Resultados de los ensayos de biodegradación de la mezcla de diésel:biodiésel (B10) por las cepas bacterianas aisladas y de los ensayos realizados con los biosurfactantes extraídos.

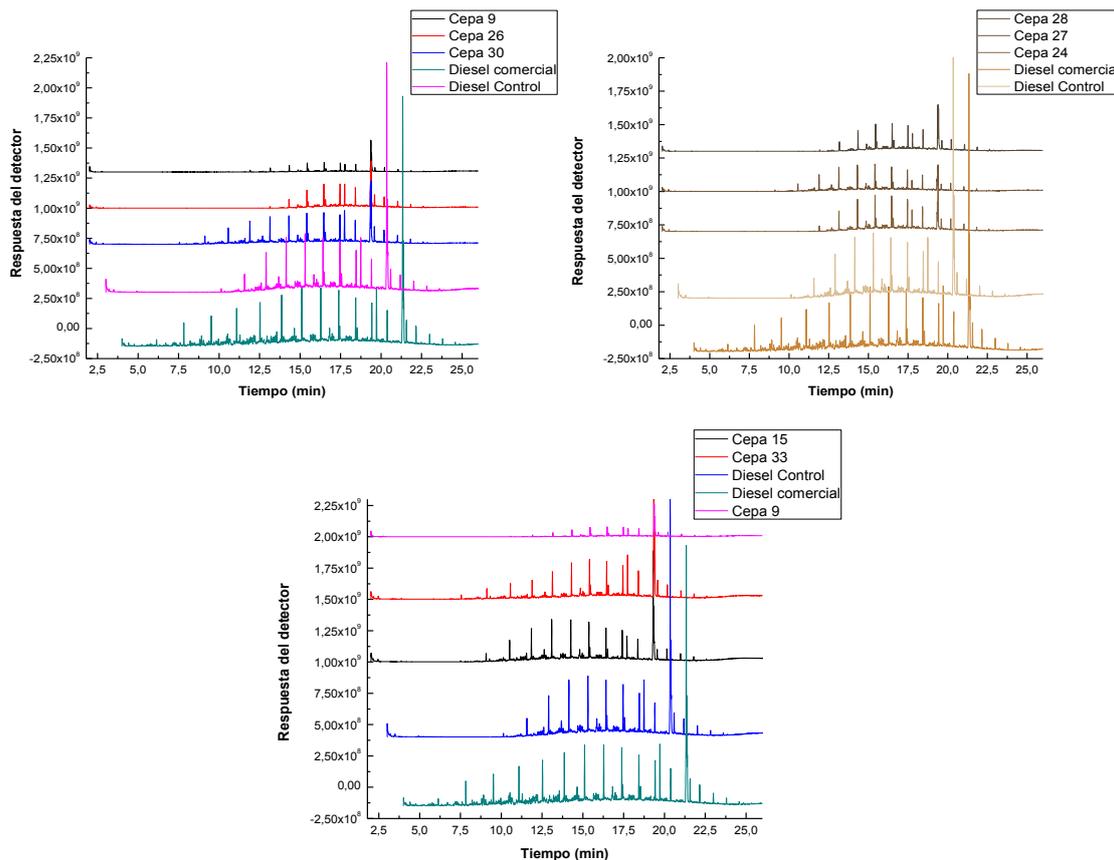


Figura 2. Perfiles de GC-MS del B10 recuperado luego de la biodegradación de la mezcla con las mejores cepas bacterianas. Los cromatogramas presentan un offset (corrimiento) entre ellos de manera tal de hacer más interactiva su comprensión

Al analizar la Figura 2, puede observarse que, luego de 14 días, numerosas cepas bacterianas prácticamente destruyeron la matriz hidrocarbonada. Del total de los aislados, 6 resultaron tener un índice de degradación mayor al 85%, siendo 5 de ellas pseudomonas y un bacilo. En la parte inferior de la Figura 2, se muestra también la mejor pseudomona, el mejor bacilo y la mejor acinetobacteria en comparación con el control. Se aprecian perfiles cromatográficos ligeramente diferentes, especialmente en la composición y abundancia tanto de las fracciones de bajo peso molecular como de aquellas de elevado peso molecular. La fracción media se comporta de forma parecida entre todos, con excepción de los compuestos cercanos al C18 donde se aprecian algunos picos aledaños más pequeños en la cepa 33 que no están presentes en el resto de los cromatogramas de degradación. Es importante aclarar que los hidrocarburos suelen degradarse a CO_2 y H_2O de acuerdo al estudio de los mecanismos de degradación y de los análisis de actividad respiratoria realizados por otros grupos de investigación (Abbasian *et al.*, 2015). En la actualidad, se están ensayando degradaciones *in vitro* tanto a un mayor tiempo como a través del uso de combinaciones de microorganismos que posean perfiles de degradación diferentes (consorcios) esperando lograr un efecto sinérgico en el consumo de la matriz carbonada de combustibles.

Por otro lado, de acuerdo a los estudios de cromatografía gaseosa acoplada a un detector de espectrometría de masas y posterior identificación de los picos utilizando la base de datos de espectro de masas NIST, así como su abundancia relativa, es posible decir que se ha comprobado la presencia de más de 100 compuestos

hidrocarbonados de la mezcla comercial B10 de diésel y biodiésel, los cuales la mayoría son hidrocarburos alifáticos (60% aproximadamente) seguido por los componentes del biodiésel agregado (20%) y un 15% restante de hidrocarburos aromáticos policíclicos (los resultados no se muestran debido a la gran cantidad de datos que presentan las tablas).

Con respecto a los análisis de los biosurfactantes, se apreció que todos los aislados bacterianos produjeron los mismos. Sin embargo, tanto la concentración como la composición química de dichos detergentes fueron diferentes (no en todos los casos). Esto se evidenció en las propiedades fisicoquímicas de los surfactantes (disminución de la tensión superficial, capacidad espumante y emulsificante) y estas influyendo en el comportamiento extractivo de dichos detergentes de los sobrenadantes de cultivo. De hecho, la precipitación ácida (pH 3) de ciertos surfactantes tuvo un resultado positivo, mientras que para otros esta técnica no resultó siendo necesario recurrir a técnicas extractivas con solventes o a la separación por tamaño empleando técnicas de centrifugación (no mostrado). De esta manera, y en líneas generales, se evidenció que hay una relación directa entre la capacidad de producción de biosurfactantes y la posibilidad de utilizar como fuente de carbono a los hidrocarburos. Lo que aún no se ha comprobado es si la influencia de la concentración y el tipo de biosurfactantes determina la capacidad degradadora final de cada microorganismo o si solo opera como estimuladora de la biodisponibilidad del mismo y la diferencia sustancial reside en las actividades enzimáticas presentes en cada uno de ellos. En general, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Bacillus* se encontrarían involucrados en la producción de biosurfactantes de bajo peso molecular que, de acuerdo a la bibliografía consultada (Bodour y Maier, 2003; Mulligan 2005; Nitschke y Costa, 2007), son sustancias eficaces en la disminución de la tensión superficial e interfacial (Rosenberg y Ron, 2002). Sin embargo, en la práctica se puede ver que cada especie produce distintos tipos de biosurfactantes, los cuales varían en sus propiedades emulsificantes y tensoactivas. Esto podría relacionarse con las estrategias de cada microorganismo para incrementar la biodisponibilidad de la fuente de carbono según el tipo y concentración de contaminante o las condiciones de incubación como temperatura, salinidad y pH del medio de cultivo.

CONCLUSIONES

La realización de este trabajo ha permitido aislar 35 cepas bacterianas capaces de degradar los hidrocarburos estudiados. La mayoría de los aislados resultaron pertenecer a los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Bacillus* de acuerdo a estudios de identificación genéticas por secuenciación del gen del 16S rDNA oportunamente efectuados. De ellas, 6 aislados resultaron ser altamente metabolizantes del diésel y sus mezclas. Asimismo, luego de analizar los cromatogramas obtenidos por GC-MS, se observó una degradación diferencial de los hidrocarburos por parte de las bacterias, por lo que una combinación de 2 o más bacterias en un solo ensayo de biodegradación será objeto de estudio para lograr depurar los suelos contaminados en menor tiempo y con mayor eficiencia. Además, se logró identificar más de 100 compuestos y su abundancia relativa en las mezclas comerciales de hidrocarburos ensayadas. Por otro lado, se apreció que la mayoría de los aislados resultaron ser productores de diversos biosurfactantes, luego de haber efectuado algunos ensayos de extracción de los mismos, apreciándose que poseyeron diferentes propiedades tensoactivas y espumantes de acuerdo a las pruebas de emulsificación y de desplazamiento efectuadas. Asimismo, a un nivel general, se evidenció una relación directa entre la capacidad degradadora de los hidrocarburos y la posibilidad de producir biosurfactantes, confirmando la necesidad que tienen las

bacterias de biodisponibilizar los hidrocarburos de forma tal de poder emplearlos como fuente de carbono y energía. Finalmente, y como continuidad en los trabajos de investigación, con las mejores cepas bacterianas se están elaborando consorcios microbianos para ser ensayados *in vitro* y en tratamientos de biorremediación *ex situ* de suelos contaminados. Por otro lado, a nivel genético y además empleando ensayos electroforéticos, se está estudiando la presencia y concentración de ciertos tipos de enzimas metabolizadoras de los hidrocarburos de forma de relacionar el poder degradador de los combustibles de las mejores bacterias con la actividad catalítica de ciertas enzimas junto con el poder de producción de sustancias biosurfactantes (caracterización e identificación de los mismos).

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasian F., Lockington R., Mallavarapu M., Naidu R.**, 2015. A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 176, pp. 670-699.
- Álvarez V. M., Jurelevicius D., Marques J. M., De Souza P. M., Vieira de Araújo L., Goncalves Barros T., De Souza R., Freire D. M. G., Seldin L.**, 2015. *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol.136, pp.14–21.
- Ben Ayed H., Jemil N., Maalej H., Bayouh A., Hmidet N., Nasri M.**, 2015. Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. International Biodeterioration and Biodegradation, Vol.99, pp.8-14.
- Bento F. M., Camargo F. A. O., Okeke B. C., Frankenberger W. T.**, 2005. Comparative Bioremediation of Soils Contaminated with Diesel Oil by Natural Attenuation, Biostimulation And Bioaugmentation. Bioresource Technology, Vol.96, pp.1049-1055.
- Bodour A. A., Drees K. P., Maier R. M.**, 2003. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 69, pp.3280-3287.
- Chidiak M., Rozemberg R., Filipello C., Gutman V., Rozenwurcel G., Affranchino M.**, 2012. Informe Final Sostenibilidad de Biocombustibles e Indicadores GBEP: Un análisis de su relevancia y aplicabilidad en Argentina. Buenos Aires, Centro de IDEAS, UNSAM.
- De Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman W. B.**, 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volumen Three: The Firmicutes. Nueva York. Springer-Verlag.
- Dias, R. L.**, 2012. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en clima frío y templado. Tesis Doctoral. Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas.
- Informe del Gobierno de la Provincia de Santa Fe**, 2014; <http://biodiesel.com.ar/tag/santa-fe-biodiesel>. Accedido el 24-06-2014.
- Macfaddin J. F.**, 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires, Ed. Médica Panamericana.
- Manzo R. M., Simonetta A. C., Rubiolo A. C., Mammarella E. J.**, 2013. Screening and selection of wild strains for L-arabinose isomerase production. Brazilian Journal of Chemical Engineering, Vol.30, pp.711-720.
- Método EPA 3540C**, 1996. Soxhlet Extraction, 8 p.
- Método EPA 4181.1**, 1978. Petroleum Hydrocarbons, 3 p.
- Mulligan C. N.**, 2005. Environmental applications for biosurfactantes. Environmental pollution, Vol.133, pp.183-198.
- Nitschke M., Costa S. O.**, 2007. Biosurfactants in food industry. Trends in Food Science and Technology, Vol.18, pp.252-259.
- Norma IRAM 29550**, 2003. Calidad ambiental - Calidad del suelo. Estudio de hidrocarburos de origen mineral en suelos, 65 p.
- Onur G., Yilmaz F., Içgen B.**, 2015. Diesel Oil Degradation Potential of a Bacterium Inhabiting Petroleum Hydrocarbon Contaminated Surface Waters and Characterization of Its Emulsification Ability. Journal of Surfactants and Detergents, Vol.18, pp.707-717.

- Ron E. Z., Rosenberg, E.**, 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. Current opinion in biotechnology, Vol.13, pp 249-252.
- Simonetto Colla T., Andrezza R., Bucker F., Moreira de Souza M., Tramontini L., Rodrigues Prado G., Guedes Frazzon A., Camargo F., Menezes Bento F.**, 2014. Environmental Science and Pollution Research, Vol. 21, pp.2592-2602.
- Whitman W., Goodfellow M., Kampfer P., Busse H. J., Trujillo M., Ludwig W., Suzuki K. I.**, 2012. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Five: The Actinobacteria. Nueva York. Springer-Verlag.