

Loureiro, Dana Belén ; Olivera, Camila ; Salvatierra, Lucas M. ; Pérez, Leonardo M.

Evaluación del potencial de biodegradación de diésel empleando bacterias aisladas de lodos industriales

Energeia, Vol. 15, N° 15, 2018

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Loureiro, D. B. et al. Evaluación del potencial de biodegradación de diésel empleando bacterias aisladas de lodos industriales [en línea]. Energeia, 15(15), 2018. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/greenstone/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=Revistas&d=evaluacion-potencial-biodegradacion-diesel> [Fecha de consulta:]

Evaluación del potencial de biodegradación de diésel empleando bacterias aisladas de lodos industriales

Loureiro, Dana Belén^{1,2}, Olivera, Camila¹, Lucas M. Salvatierra^{1,3}, Leonardo M. Pérez^{1,2}

¹ Depto. de Investigación Institucional, Fac. de Química e Ingeniería del Rosario, Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA-Rosario).

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), CCT-Rosario (Santa Fe), Argentina.

³ Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Depto. de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, CONICET, La Plata, Argentina.

danaloureiro@uca.edu.ar

Resumen

*La descarga de hidrocarburos (HC) al ambiente, ya sea de forma accidental o producto de las actividades humanas, es una fuente importante de contaminación de suelos y acuíferos. Las tecnologías comúnmente utilizadas para la remediación de HC incluyen bioventilación, filtrado, incineración y diversos métodos de bombeo. Las mismas son costosas y muchas veces no consiguen remover completamente estos contaminantes. Una alternativa efectiva y más rentable, que además tiene la ventaja de poder ser aplicada a grandes áreas, es la **biorremediación in situ** empleando microorganismos que posean la capacidad de degradar HC. Existen principalmente dos estrategias de remediación in situ: la **bioestimulación**, en la cual los microorganismos indígenas son estimulados con el agregado de nutrientes y co-sustratos, y la **bioaumentación**, consistente en la inoculación de un consorcio microbiano mixto enriquecido. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio utilizando lodos activados provistos por una empresa santafesina tratadora de residuos industriales, se determinó la capacidad de estos lodos para degradar diferentes sustratos orgánicos. En vistas de estos resultados preliminares, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la presencia de microorganismos potencialmente degradadores de los HC que conforman el diésel. Utilizando técnicas microbiológicas básicas de enriquecimiento (presión selectiva) se aislaron e identificaron 6 cepas potencialmente degradadoras de HC: *Acinetobacter radioresistens*, *Citrobacter koseri*, *Ochrobactrum intermedium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas citronellolis* y *Pseudomonas stutzeri*. Adicionalmente, mediante el empleo de un método colorimétrico que permite estimar la viabilidad celular, se demostró la capacidad de *P. aeruginosa* para crecer y desarrollarse en presencia de diésel como única fuente de carbono, demostrando su capacidad para degradar y metabolizar HC.*

Palabras claves: biodegradación, hidrocarburos, diésel, aislamiento, viabilidad celular.

Abstract

*The discharge of hydrocarbons (HC) to the environment, either accidentally or because of human activities, is an important source of contamination of soils and aquifers. The technologies commonly used for the remediation of HC include bioventilation, filtering, incineration and various pumping methods. They are expensive and often fail to completely remove these contaminants. An effective and more profitable alternative, and with the advantage of being able to be applied to large areas, is **in situ bioremediation** using microorganisms to degrade the HC taking advantage of their metabolic capacities. There are mainly two strategies: **biostimulation**, in which indigenous microorganisms are stimulated with the addition of nutrients and co-substrates, and **bioaugmentation**, consisting of the inoculation of an enriched mixed microbial*

consortium. In previous studies carried out in our laboratory using activated sludge provided by a local company dedicated to the management of industrial wastewater, we demonstrated the capacity of these sludges to degrade different organic substrates. In view of these preliminary results, the aim of the present work was to evaluate the presence of microorganisms with the ability to degrade HC from diesel. Through classical enrichment culture techniques six potentially HC degrading strains were isolated: Acinetobacter radioresistens, Citrobacter koseri, Ochrobactrum intermedium, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas citronellolis and Pseudomonas stutzeri. Additionally, using a colorimetric approach to evaluate cell viability, we could demonstrate that P. aeruginosa was able to grow and survive in an ambient rich in diesel as a sole carbon and energy source, proving the capacity of this strain to degrade and metabolize HC.

Keywords: biodegradation, hydrocarbons, diesel, isolation, cell viability.

1. INTRODUCCIÓN

Las actividades concernientes a la industria del petróleo con frecuencia ocasionan la liberación al ambiente de hidrocarburos y contaminantes asociados debido, principalmente, a roturas o contingencias en los equipos de transporte (tanques, bombas, válvulas, etc.), provocando infiltraciones y derrames que comprometen los recursos naturales [1]. La problemática asociada a la manipulación del petróleo y sus derivados existe tanto en Argentina como en otros países donde se usan o producen hidrocarburos. Estos compuestos muchas veces alcanzan la capa freática contaminando tanto el suelo como las corrientes de aguas subterráneas y superficiales [2, 3]. En efecto, la contaminación de los recursos naturales impone su inmediata remediación con el fin de asegurar sus potenciales usos. Por ejemplo, la presencia de hidrocarburos en la capa freática inhabilita su empleo como agua de bebida para humanos o ganado, al igual que para riego, y puede trasladar la contaminación hasta las zonas de descarga en aguas superficiales. Este grave escenario de contaminación resulta en una disminución sustancial de la biodiversidad, afectando no sólo a las economías regionales sino, muy especialmente, a la salud de la población [4].

Ha sido ampliamente demostrado que el diésel, un producto de la destilación fraccionada del petróleo crudo, genera graves efectos adversos. Aunque existe una amplia gama de constituyentes en el diésel, en los últimos años la investigación se ha centrado en los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) debido a sus propiedades carcinogénicas y mutagénicas [5], y a sus implicancias en el desarrollo de otras patologías tales como leucopenia, linfoma de Hodgkins, anemia aplásica, leucemia aguda y síndrome mielodisplásico [1, 6, 7]. Estos considerables efectos sobre la salud han estimulado a los gobernantes, las industrias y los científicos a encontrar nuevos enfoques que permitan restaurar ambientes contaminados con hidrocarburos (HC).

Las tecnologías comúnmente utilizadas para la remediación de HC incluyen bioventilación, filtrado, incineración y diversos métodos de bombeo. Las mismas son costosas y muchas veces no consiguen remover completamente estos contaminantes. Una alternativa efectiva y más rentable, que posee la ventaja adicional de poder ser aplicada en grandes áreas, es la biorremediación *in situ* utilizando microorganismos capaces de degradar HC [8, 9]. Existen principalmente dos formas de llevar adelante una estrategia de remediación *in situ*: **bioestimulación**, en la cual los microorganismos indígenas son estimulados con el agregado de nutrientes y co-sustratos [10], y **bioaumentación**, consistente en la inoculación de un consorcio microbiano mixto enriquecido [11].

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio utilizando lodos activados provistos por una empresa local dedicada al tratamiento de residuos industriales, se determinó la capacidad de estos lodos para degradar diferentes sustratos orgánicos. En vistas de estos resultados preliminares, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la presencia de microorganismos potencialmente degradadores de HC en dichos lodos, con el fin de indagar sobre su potencial aplicación en procesos de biorremediación *in situ* por bioaumentación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Aislamiento e identificación de bacterias potencialmente degradadoras de hidrocarburos.

Se emplearon botellas de vidrio de 125 mL de capacidad como biorreactores, dentro de las cuales

se colocaron 30 mL de medio Bushnell Haas (BH) regulado a pH 7,0, 1 mL del lodo biológico y diésel al 1 %v/v como única fuente de carbono. Los sistemas se incubaron durante 15 días a 37 °C en un baño termostatzado con agitación constante (130 rpm). Al cabo de ese período, se tomaron alícuotas de cada sistema las cuales fueron convenientemente diluidas con solución fisiológica. Se sembraron 10 µL de cada dilución en placas de Petri conteniendo medio PCA (del inglés *Plate Count Agar*), y las mismas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. De las distintas colonias identificadas se realizaron repiques en medio Bushnell Haas-agar suplementado con diésel al 1%v/v con el fin de mantener la presión de selección para el desarrollo de bacterias degradadoras de HC. Las placas se incubaron a 37 °C durante 7 días. Las colonias aisladas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas y a través del análisis del perfil proteico por MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionization-time of flight*).

2.2. Ensayos de viabilidad celular en presencia de distintas concentraciones de diésel.

Se utilizó un método colorimétrico desarrollado por el grupo de I+D basado en la reducción enzimática del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC), utilizado comúnmente para indicar la respiración celular. Este indicador redox es reducido a 1,3,5-trifenilformazán (formazán), de color rojo, en presencia de microorganismos metabólicamente activos debido a la acción de varias deshidrogenasas. Por lo tanto, la cantidad de formazán generado es proporcional a la biomasa bacteriana e indica que los microorganismos presentes en el medio son capaces de metabolizar las fuentes de carbono suministradas. La detección de formazán se realiza espectrofotométricamente midiendo su absorbancia en la región visible del espectro electromagnético, a una longitud de onda de 482 nm. Se prepararon sistemas en lote conteniendo 50 mL de medio BH, 0,5 mg/mL de TTC, y 100 µL de una suspensión de *P. aeruginosa* en solución fisiológica ajustada al 0,5 de la escala de Mc Farland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/ml), en ausencia y presencia de distintas concentraciones de diésel: 1 y 5 %v/v. Todos los sistemas fueron incubados con agitación (130 rpm) a 37 °C durante 11 días. Como control positivo del ensayo se utilizó glucosa al 1 %v/v como fuente de carbono fácilmente asimilable. Además, se realizó un control de sustrato conteniendo únicamente diésel al 5 %v/v. Todos los ensayos se realizaron por triplicado ($n=3$). Cada 24 h se tomaron alícuotas de los distintos sistemas y se las sometió a un tratamiento de lisis celular con acetona al 70 %v/v para liberar el colorante acumulado intracelularmente. Luego de una etapa de centrifugación a máxima velocidad para descartar los restos celulares, se midió la absorbancia del sobrenadante a 482 nm y se graficó este valor en función del tiempo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de hidrocarburos.




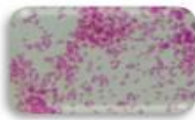








Se aislaron 6 cepas bacterianas potencialmente degradadoras de HC, las cuales fueron enviadas a la cátedra de Bacteriología Clínica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario (UNR) para su identificación. Mediante diversas pruebas bioquímicas de rutina y análisis del perfil proteico por MALDI-TOF, se identificaron las cepas aisladas como *Acinetobacter radioresistens*, *Citrobacter koseri*, *Ochrobactrum intermedium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas citronellolis* y *Pseudomonas stutzeri*. Resulta interesante destacar que la mayoría de las cepas identificadas corresponden al género *Pseudomonas*, del cual se han reportado numerosas especies con capacidad para degradar HC [12-16]. Adicionalmente, se pudo observar que todas las cepas aisladas con potencial para degradar HC demostraron ser bacterias *gram-negativas* (Tabla I). Se ha reportado que este tipo de microorganismos posee ciertas ventajas respecto a las bacterias *gram-positivas* para llevar adelante procesos degradativos debido a la presencia de lipopolisacárido (LPS) en su membrana externa, ya que este componente facilita la formación y estabilización de emulsiones que contribuye a incrementar el contacto con contaminantes de tipo lipídico, tales como los hidrocarburos [17].

3.2. Viabilidad celular en ausencia y presencia de distintas concentraciones de diésel.

En la Figura 1 se pueden observar las variaciones en la viabilidad celular de *P. aeruginosa* en presencia de diésel como única fuente de carbono, en función del tiempo. Estas curvas indican que esta cepa, aislada del lodo industrial, es capaz de utilizar HC constituyentes del diésel para sus actividades metabólicas. Adicionalmente, un aumento en la concentración de diésel produjo un aumento en la viabilidad celular a partir del día 5. Sin embargo, a partir del octavo día se pudo evidenciar una merma en la biomasa bacteriana que podría deberse a una disminución en la cantidad de sustrato. Está ampliamente reportado que gran cantidad de bacterias del género *Pseudomonas*, especialmente *P. aeruginosa*, pueden habitar en sitios contaminados con HC y son

capaces de utilizar HC aromáticos y alifáticos como fuente de carbono favoreciendo a la biodegradación de diversos contaminantes de tipo orgánico [18]. Esto se debe a que producen biosurfactantes denominados "*Rhamnolipids*", los cuales juegan un rol muy importante en los procesos degradativos ya que estos compuestos modifican las propiedades físico-químicas de los HC e incrementan su solubilidad, aumentando así su biodisponibilidad [19].

Tabla I: Identificación macro y microscópica de las cepas aisladas en el presente trabajo.

Identificación	Morfología de colonia	Tinción de gram
<i>Acinetobacter radioresistens</i>		
<i>Citrobacter koseri</i>		
<i>Ochrobactrum intermedium</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Pseudomonas citronellolis</i>		
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		

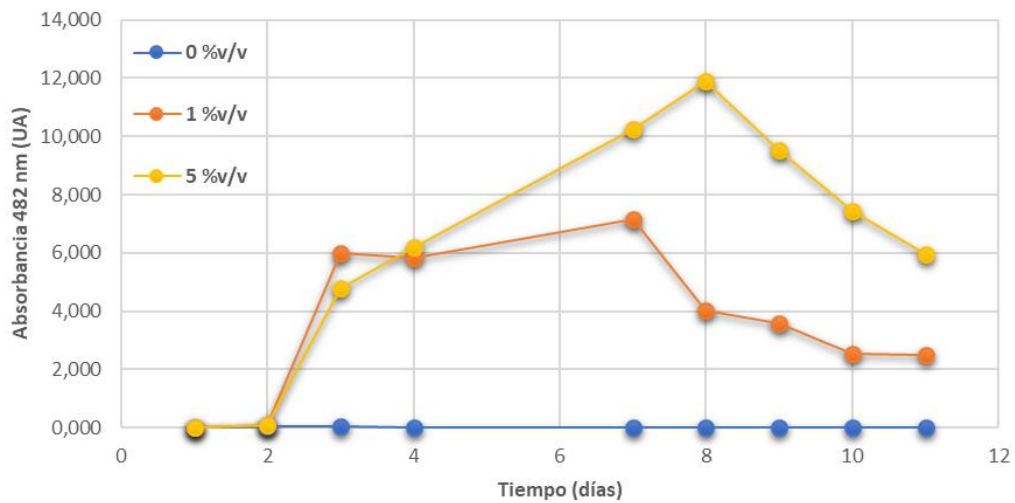


Figura 1: Viabilidad celular de *P. aeruginosa* en ausencia y presencia de diésel al 1 y 5 %v/v.

4. CONCLUSIONES

En este estudio se logró el aislamiento y clasificación de 6 cepas bacterianas potencialmente degradadoras de hidrocarburos a partir de lodos activados generados como subproducto en el tratamiento anaeróbico de residuos industriales. Adicionalmente, se demostró que la cepa identificada como *P. aeruginosa* fue capaz de utilizar diésel como fuente de energía para sus actividades metabólicas, hecho que indica que este microorganismo podría ser empleado en protocolos de biorremediación de sitios contaminados con HC. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en la literatura acerca de la capacidad del género *Pseudomonas* para degradar diversos contaminantes ambientales de tipo orgánico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen muy especialmente a las Dras. Cecilia Casabonne y Virginia Aquili de la cátedra de Bacteriología Clínica (FCByF - UNR) por su colaboración con la identificación de las cepas bacterianas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ekperusi, O.A. and I.F. Aigbodion, *Bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons in diesel contaminated soil with the earthworm: Eudrilus eugeniae*. SpringerPlus, 2015. **4**(1): p. 540.
2. Azadpour-Keeley A, K.J., Russell HH, Sewell GW., *Monitored natural attenuation of contaminants in the subsurface: Applications*. Ground Water Monitoring and Remediation, 2001b. **21**: p. 136-143.
3. Azadpour-Keeley A, K.J., Russell HH, Sewell GW., *Monitored natural attenuation of contaminants in the subsurface: Processes*. Ground Water Monitoring and Remediation, 2001a. **21**: p. 97-107.
4. Alvim-Ferraz MCM, A.J., Delerue-Matos C., *Soil remediation time to achieve clean-up goals II: Influence of natural organic matter and water contents*. Chemosphere, 2006. **64**: p. 817-825.
5. Hesterberg, T.W., et al., *Health effects research and regulation of diesel exhaust: an historical overview focused on lung cancer risk*. Inhal Toxicol, 2012. **24 Suppl 1**: p. 1-45.
6. A., L.W.A., *Haddad and Winchester's clinical management of poisoning and drug overdose*. , in *Petroleum distillates and plant hydrocarbons*, B.S. Shannon MW, Burns MJ, Editor. 2007, Saunders Elsevier: Philadelphia.
7. Smith, M.T., *Advances in understanding benzene health effects and susceptibility*. Annu Rev Public Health, 2010. **31**: p. 133-48 2 p following 148.
8. Bento, F.M., et al., *Bioremediation of soil contaminated by diesel oil*. Brazilian Journal of Microbiology, 2003. **34**: p. 65-68.
9. WA., A.P.I., *Bioremediation and natural attenuation - Process fundamentals and mathematical models*. 2006, Hoboken, NJ, USA.
10. Seklemova, E., A. Pavlova, and K. Kovacheva, *Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration*. Biodegradation, 2001. **12**(5): p. 311-6.
11. Barathi, S. and N. Vasudevan, *Utilization of petroleum hydrocarbons by Pseudomonas fluorescens isolated from a petroleum-contaminated soil*. Environ Int, 2001. **26**(5-6): p. 413-6.
12. Chebbi, A., et al., *Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated Pseudomonas sp. strain from used motor oil-contaminated soil*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2017. **122**: p. 128-140.
13. Khodaei, K., et al., *BTEX biodegradation in contaminated groundwater using a novel strain (Pseudomonas sp. BTEX-30)*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2017. **116**: p. 234-242.
14. Varjani, S.J. and V.N. Upasani, *Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of Pseudomonas aeruginosa NCIM 5514*. Bioresource Technology, 2016. **222**: p. 195-201.
15. Barman, S.R., et al., *Biodegradation of acenaphthene and naphthalene by Pseudomonas mendocina: Process optimization, and toxicity evaluation*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2017. **5**(5): p. 4803-4812.
16. Kaczorek, E., et al., *Biodegradation of alkyl derivatives of aromatic hydrocarbons and cell*

surface properties of a strain of Pseudomonas stutzeri. Chemosphere, 2013. **90**(2): p. 471-478.

17.Echeverri Jaramillo, G.E.M.P., Ganiveth; Cabrera Ospino, Melody, *Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia*. NOVA - Publicación científica en ciencias biomédicas, 2010. **8**(13): p. 76 - 86.

18.Das, N. and P. Chandran, *Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview*. Biotechnology Research International, 2011. **2011**.

19.Kaskatepe, B. and S. Yildiz, *Rhamnolipid Biosurfactants Produced by Pseudomonas Species*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2016. **59**.