

Estudio de la degradación de diésel comercial empleando *Pseudomonas spp.* aisladas de lodos facultativos provenientes de una planta productora de biogás

Loureiro, Dana^{1,2}, Olivera, Camila^{1,2}, Herrero, María Sol¹, Salvatierra, Lucas^{1,2}, Pérez, Leonardo^{1,2}

¹ Grupo de Bio&Tecnología de Materiales y Medio Ambiente (Bio&TecMA). 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.

danaloureiro@uca.edu.ar

Resumen

La descarga de hidrocarburos (HC) al ambiente es una fuente importante de contaminación de suelos y acuíferos. Las tecnologías tradicionales comúnmente utilizadas para la remediación de HC 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. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio utilizando lodos facultativos, provistos por una empresa santafesina tratadora de residuos industriales para la producción de biogás, se determinó la capacidad de estos lodos para degradar diferentes sustratos orgánicos. Luego se realizaron ensayos de presión de selección en presencia de diésel comercial mediante los cuales se aislaron tres especies predominantes de bacterias del género *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. stutzeri* y *P. mendocina*), potencialmente degradadoras de hidrocarburos. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue estudiar separadamente la eficiencia de biodegradación de los HC del diésel comercial por parte de las cepas aisladas del lodo facultativo. Asimismo, se emplearon parámetros indirectos para evaluar la capacidad de dichas cepas de producir biosurfactantes. Los resultados obtenidos mostraron que *P. aeruginosa* y *P. stutzeri* son significativamente más eficientes que *P. mendocina* en la degradación de diésel comercial. Asimismo, los resultados obtenidos para el índice de emulsificación y la hidrofobicidad superficial celular indicarían que *P. aeruginosa* y *P. stutzeri* son productoras de biosurfactantes. La biorremediación de sitios contaminados, así como también el tratamiento de efluentes con HC, requiere de microorganismos capaces de tolerar y asimilar estos compuestos. En este sentido, los resultados obtenidos indican que las cepas *P. aeruginosa* y *P. stutzeri* serían eficientes para ser aplicadas en procesos de biorremediación.

Palabras claves: biodegradación, hidrocarburos, diésel, biosurfactantes, *Pseudomonas*.

Abstract

The discharge of hydrocarbons (HC) into the environment is an important source of soil and aquifer contamination. Traditional technologies commonly used for HC remediation are expensive and often fail to completely remove these contaminants. An effective and more profitable alternative, which also has the advantage of being applied to large areas, is in situ bioremediation using microorganisms that can degrade HC. In previous studies carried out in our laboratory using facultative sludge, provided by an industrial waste treatment company, it was determined the capacity of these sludges to degrade different organic substrates. In addition, mild selection pressure experiments were performed using commercial diesel as solely carbon source to isolate potential diesel-degrading microorganisms. After the environmental pressure, three *Pseudomonas* species (*P. aeruginosa*, *P. stutzeri* and *P. mendocina*) were found to be predominant in the treated sample. The aim of this work was to study the biodegradation efficiency of commercial diesel by the *Pseudomonas* strains isolated from the facultative sludge. Likewise, indirect parameters were used to evaluate the ability of these strains to produce biosurfactants. The results showed that *P. aeruginosa* and *P. stutzeri* are significantly more efficient than *P. mendocina* in the degradation of commercial diesel. Also, the results obtained for the emulsification index and cell surface hydrophobicity would indicate that *P. aeruginosa* and *P. stutzeri* are biosurfactant producers. The bioremediation of contaminated sites, as well as hydrocarbon-rich wastewaters treatment, requires microorganisms capable of tolerating and assimilating these compounds. In this sense, the results obtained indicate that *P. aeruginosa* and *P. stutzeri* would be efficient to be applied in bioremediation processes.

Keywords: biodegradation, hydrocarbons, diesel, biosurfactants, *Pseudomonas*.

1. Introducción

Las actividades concernientes a la industria del petróleo a menudo ocasionan la liberación al medioambiente de hidrocarburos y contaminantes asociados, principalmente a causa de roturas o contingencias en los equipos de perforación, transporte y almacenamiento (bombas, válvulas, tanques, etc.), provocando infiltraciones y derrames que comprometen severamente los recursos naturales (Ekperusi & Aigbodion, 2015). Estos compuestos suelen alcanzar la capa freática afectando tanto el suelo como las corrientes de aguas subterráneas y superficiales, constituyendo un grave escenario de contaminación ambiental que puede ocasionar una disminución sustancial de la biodiversidad, afectando no sólo a las economías regionales, sino muy especialmente a la salud de la población (Adekunle y col., 2017; Logeshwaran y col., 2018; Ugochukwu y col., 2018). Por ejemplo, se ha demostrado que el diésel, un producto de la destilación fraccionada del petróleo crudo (compuesto mayoritariamente por HC de entre 10 a 22 átomos de carbono), afecta gravemente la salud debido a que muchos de sus componentes poseen propiedades carcinogénicas y mutagénicas (Hesterberg y col., 2012; D'Andrea & Reddy, 2013; Ekperusi & Aigbodion, 2015; Ramirez y col., 2017). Debido que es más pesado que la gasolina (compuesta principalmente por hidrocarburos de entre 4 a 11 átomos de carbono), la persistencia ambiental del diésel es mayor a causa de su baja tasa de evaporación.

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 (Bento y col., 2003; Alvarez & Illman, 2006). 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 (Seklemova y col., 2001), y **bioaumentación**, consistente en la inoculación de un consorcio microbiano mixto enriquecido (Das & Chandran, 2011).

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio utilizando lodos facultativos 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, se avanzó en el análisis de la composición de la flora microbiana de dichos lodos.

En la figura 1 se muestra la clasificación taxonómica de una muestra del lodo, realizada por secuenciación del gen ARNr 16S, para conocer los microorganismos presentes. Entre los distintos géneros encontrados en el lodo se puede observar la presencia del orden *Pseudomonadales*. El género *Pseudomonas* es ubicuo y puede ser encontrado en numerosos ambientes: aeróbicos, anaeróbicos y facultativos (Wasi y col., 2013).

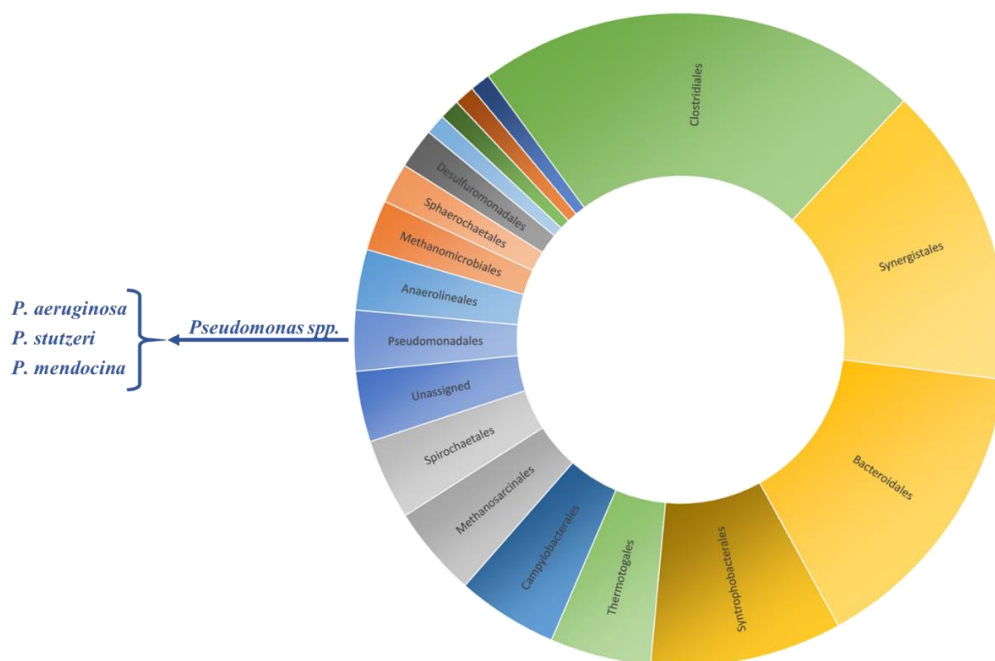


Figura 1: Composición taxonómica bacteriana de una muestra del lodo facultativo proveniente de una planta productora de biogás. La figura muestra la abundancia relativa porcentual de los órdenes bacterianos presentes en la muestra analizada.

Mediante ensayos de presión de selección con diésel comercial, se aislaron 15 bacterias del género *Pseudomonas* del lodo facultativo. Esas bacterias fueron identificadas mediante kits RapID NF Plus y por análisis de su perfil proteico con MALDI-TOF MS (del inglés *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*), como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mendocina* y *Pseudomonas stutzeri*. Diversos autores han reportado que bacterias de este género son tolerantes a los hidrocarburos y están estrechamente relacionadas a una rápida y eficiente degradación de estos compuestos, facilitando su uso en protocolos de bioaumentación tanto solas como acompañadas de otros géneros como Bacillus, Acinetobacter, Proteus, etc (Das & Chandran, 2011; Obayori y col., 2009).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad de las cepas del género *Pseudomonas*, aisladas del lodo facultativo, para degradar los HC del diésel comercial. Asimismo, se emplearon parámetros indirectos para evaluar la capacidad de dichas cepas de producir biosurfactantes. Estos estudios fueron realizados con el fin de indagar sobre la potencial aplicación de estas bacterias en procesos de biorremediación *in situ* por bioaumentación.

2. Materiales y Métodos

2.1. Curvas de crecimiento bacteriano

Se obtuvieron las curvas de crecimiento de las 3 bacterias del orden *Pseudomonadales* aisladas del lodo industrial. Para ello se utilizaron botellas de 125 mL como biorreactores conteniendo 50 mL de medio mínimo salino Bushnell Haas (BHB) pH 7,00 y diésel comercial 1 %v/v esterilizado con filtro de 0,2 µm como única fuente de carbono. En los sistemas correspondientes se inocularon 100 µL de una suspensión bacteriana ajustada al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ CFU/mL) en solución fisiológica estéril. Luego, los reactores fueron incubados en baño termostático en agitación (130 rpm) a 37 °C por 15 días. La densidad óptica fue medida periódicamente a 600 nm (OD_{600nm}) empleando un espectrofotómetro. Los experimentos fueron realizados por triplicado ($n=3$).

2.2. Ensayos de actividad deshidrogenasa.

Se utilizó un método colorimétrico 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 las enzimas 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 la fuente de carbono suministrada. La detección de formazán se realiza espectrofotométricamente a 482 nm.

Se prepararon sistemas en lote conteniendo 50 mL de medio BHB (pH 7,00), 0,5 mg/mL de TTC, 100 µL de una suspensión de cada cepa en solución fisiológica estéril ajustada al 0,5 de la escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) y diésel comercial 1 %v/v esterilizado con filtro de 0,2 µm. Todos los sistemas fueron incubados con agitación (130 rpm) a 37 °C durante 15 días. Además, se realizó un control de sustrato conteniendo únicamente diésel al 1 %v/v. Todos los ensayos se realizaron por triplicado ($n=3$). La habilidad de los microorganismos de crecer a expensas del diésel comercial fue determinada cualitativamente mediante la observación del color rojo, tanto en la solución como en la interfase, como indicador de las bacterias viables unidas a la fase orgánica formando un *biofilm* (Brown y col., 2013). Adicionalmente, al final de la etapa de incubación, el trifenilformazán fue extraído de las células con 5 mL de acetona al 80 %. Luego de centrifugar (3000 g, 10 min) se midió la absorbancia del sobrenadante a 485 nm como describió Kumari y col. (2016).

2.3. Determinación del índice de emulsificación y de la hidrofobicidad superficial celular.

Se realizaron ensayos indirectos para evaluar la producción de biosurfactantes por parte de las tres *Pseudomonas*. Para ello, 100 µL de una suspensión bacteriana de cada cepa ajustada al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland (aprox. $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) fueron inoculados en 50 mL de BHB (pH 7,00) suplementado con diésel comercial 1 %v/v como única fuente de carbono esterilizado con filtro de 0,2 µm. Los sistemas fueron incubados a 37 °C en agitación (130 rpm) por 15 días. Finalizado el período de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 7000 g por 20 minutos para obtener un sobrenadante libre de células (SNLC). Finalmente, la capacidad de las cepas de producir biosurfactante fue evaluada mediante dos métodos indirectos: el índice de emulsificación (IE) y la hidrofobicidad superficial celular (HSC).

2.3.1. Índice de emulsificación

La obtención del índice de emulsificación se llevó a cabo mezclando SNLC y kerosene rosa en proporciones 1:1 (v/v). La mezcla fue vortereada a máxima velocidad por 3 minutos e incubada por 24 h ($IE_{24\%}$) a temperatura ambiente. Luego de la incubación el $IE_{24\%}$ fue calculado midiendo la altura de la capa emulsionada (Shahaliyan y col., 2015):

$$IE_{24}\% = 100 * \left(\frac{\text{Altura total de la capa emulsionada}}{\text{Altura total de la capa líquida}} \right)$$

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado ($n = 3$).

2.3.2. Hidrofobicidad superficial celular

Este parámetro se utiliza para determinar el grado de adherencia de las células bacterianas a los hidrocarburos del diésel. Luego de centrifugar la muestra, el *pellet* celular fue resuspendido en 3 mL de solución fisiológica estéril y ajustado a una densidad óptica inicial de 0,5 a 600 nm (OD_{600nm}). A esta suspensión bacteriana se le agregaron 400 μ L de diésel comercial esterilizado con filtro de 0,2 μ m y luego la mezcla se vortereó a máxima velocidad por 3 minutos. Luego se dejó reposar a temperatura ambiente hasta observar la separación de fases (diésel – agua). La fase acuosa fue removida cuidadosamente y se volvió a medir OD_{600nm} . La HSC en términos de adherencia bacteriana fue calculada empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Adherencia bacteriana (\%)} = 100 * \left(1 - \frac{OD_{600nm} \text{ de la suspensión vortereada}}{OD_{600nm} \text{ inicial de la suspensión antes de vorterear}} \right) \quad (2)$$

Valores de adherencia bacteriana superiores a 75% fueron considerados significativos para la producción de biosurfactante. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado ($n = 3$).

2.4. Experimentos de biodegradación

Los experimentos de biodegradación fueron llevados a cabo en frascos de 125 mL conteniendo 50 mL de BHB (pH 7,00) suplementado con diésel comercial 1 %v/v como única fuente de carbono esterilizado con filtro de 0,2 μ m. Luego, los sistemas fueron inoculados separadamente con 1 mL de una suspensión bacteriana de cada cepa ajustada al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland (aprox. 10^8 UFC/mL) e incubados durante 15 días a 37 °C y 130 rpm.

Luego de la incubación, se adicionaron 5 mL de hexano a cada biorreactor para extraer el diésel remanente. Se agitó vigorosamente durante 1 minuto y luego se centrifugó por 10 minutos a 3500 rpm. La fase orgánica fue recolectada y filtrada con filtro de PTFE (0,45 μ m de tamaño de poro) para poder ser analizada mediante cromatografía gaseosa. Sistemas con diésel comercial estéril 1 %v/v sin inóculo bacteriano fueron utilizados como controles para evaluar cambios en la concentración de diésel producidos abióticamente. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado ($n = 3$).

2.5. Análisis cromatográfico

Las extracciones de diésel remanente con hexano fueron analizadas en un cromatógrafo gaseoso SCION 436 GC con detector FID (del inglés *flame ionization detector*) y una columna capilar de 30 m. La temperatura del inyector y del detector se fijó en 275 °C, mientras que para la columna se empleó una rampa de temperatura iniciando en 90 °C, luego aumentando a 7 °C/min hasta 300 °C y manteniendo esa temperatura por 1 min. El volumen de muestra inyectado fue de 1 μ L y la relación de split 1:20. Como gas *carrier* se utilizó nitrógeno fluyendo a 1 mL/min.

La eficiencia de biodegradación porcentual (EB) de las fracciones petroquímicas y FAME del diésel comercial fueron calculadas mediante la expresión descripta por Michaud et al. (2004):

$$EB (\%) = 100 - \frac{A_s * 100}{A_{ca}} \quad (3)$$

donde A_s es el área total de los picos seleccionados (C_{11} - C_{22} o FAME) en cada muestra después de la incubación y A_{ca} es el área total de los picos seleccionados en el control abiótico después de la incubación.

2.6. Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados con 3 muestras independientes por sistema ($n = 3$). El análisis de la variancia (ANOVA) fue llevado a cabo utilizando el programa SigmaStat 3.5. La diferencia de promedios entre grupos fue resuelta empleando el test de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

3. Resultados y Discusión

3.1. Evaluación del crecimiento de las cepas *Pseudomonas* empleando diésel comercial como única fuente de carbono.

En la figura 2 se observa la cinética de crecimiento de *P. aeruginosa*, *P. mendocina* y *P. stutzeri*, en medio mínimo salino BHB suplementado con diésel comercial al 1 %v/v como única fuente de carbono y energía. La evolución de la cinética de crecimiento fue seguida midiendo la densidad óptica a 600 nm durante 15 días a 37 °C.

P. aeruginosa y *P. stutzeri* mostraron perfiles de crecimiento similares, en ninguno se observa fase de latencia y ambas alcanzan la fase estacionaria al segundo día de incubación. Esto podría deberse a una buena y rápida asimilación de los hidrocarburos del diésel por parte de ambas cepas (Mnif y col., 2015). Mientras que para *P. mendocina* se observa una fase de latencia de 4 días, a partir de donde se observa un crecimiento progresivo hasta el final del ensayo sin alcanzar la fase estacionaria. Que esta cepa no haya alcanzado la fase estacionaria, sumado al crecimiento lento respecto de las otras bacterias, podría deberse a la falta de nutrientes o a cambios en el ambiente que puedan afectar su supervivencia (aparición de metabolitos tóxicos, cambios en el pH del medio, en la tensión de oxígeno, etc.).

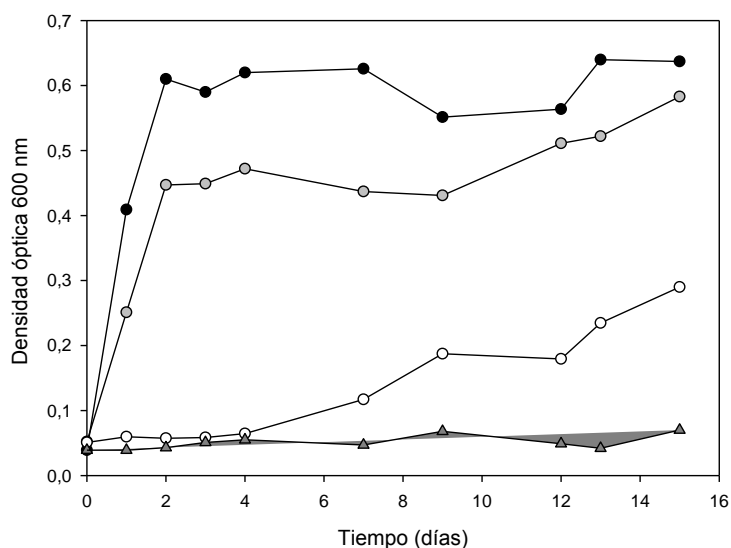


Figura 2: Curvas de crecimiento de (●) *P. aeruginosa*, (◐) *P. stutzeri*, (○) *P. mendocina*, (▲) control diésel, en medio BHB (pH 7,00) con diésel comercial 1 %v/v como única fuente de carbono durante 15 días a 37 °C y 130 rpm.

3.2. Estudio de la producción de biosurfactante y actividad deshidrogenasa.

El crecimiento de ciertos organismos a expensas de compuestos orgánicos puede ser limitado por varios factores, tales como su estructura química, su baja solubilidad, las condiciones del medio, etc. (Mnif y col., 2015). Es sabido que los hidrocarburos tienen baja solubilidad en sistemas acuosos, por lo cual para que las bacterias puedan hacer uso de ellos, deben estar biodisponibles en el medio. Algunas bacterias degradadoras de hidrocarburos son capaces de sintetizar agentes emulsificantes naturales llamados *biosurfactantes*. Estos son compuestos extracelulares con propiedades anfipáticas que favorecen la incorporación de los compuestos orgánicos por parte de las bacterias (Preethy & Das, 2010). En este sentido, el índice de emulsificación (IE₂₄%) es considerado un método confiable para ensayar la capacidad de los microorganismos de producir biosurfactantes (Mendes Lopes y col., 2014; Shahaliyan y col., 2015). En la tabla 1 puede observarse que el máximo IE₂₄% (48,8 ± 1,9) fue obtenido para *P. stutzeri* y el menor para *P. mendocina* (15,0 ± 3,5).

Otro factor importante es la Hidrofobicidad Superficial Celular (HSC) que indica la capacidad de las bacterias gramnegativas de modificar la estructura de su pared celular aumentando su hidrofobicidad en presencia de sustratos orgánicos (Ali Khan y col., 2017). En este sentido, *P. aeruginosa* y *P. stutzeri* mostraron valores significativos de HSC (> 80%) en las condiciones ensayadas.

TABLA 1: Producción de biosurfactante luego de 15 días de incubación (37 °C, 130 rpm) en medio BHB con diésel comercial 1 %v/v como única fuente de carbono.

	IE ₂₄ (%)	HSC (%)
<i>P. aeruginosa</i>	39.5 ± 2.5 ^b	81.3 ± 2.6 ^b
<i>P. mendocina</i>	15.0 ± 3.5 ^a	33.8 ± 1.2 ^a
<i>P. stutzeri</i>	48.8 ± 1.9 ^c	82.9 ± 0.7 ^b

Los datos corresponden a los valores promedio \pm la desviación estándar de 3 réplicas independientes ($n=3$).

Los valores con letras diferentes en cada columna muestran indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Estos resultados también pueden explicar la adherencia de las células metabólicamente activas de *P. aeruginosa* y *P. stutzeri* (de color rojo debido al formazán intracelular) a la fase orgánica del diésel (Figura 3).

Por otra parte, *P. mendocina* mostró una menor capacidad para producir biosurfactante y esto se correlaciona con el bajo valor de HSC obtenido (Tabla 1). Esto también podría explicar la fase estacionaria de 4 días observada en la curva de crecimiento de la Figura 2, así como también la falta de desarrollo de formazán en el experimento de actividad deshidrogenasa (Figura 3).

Varios autores han reportado la producción de biosurfactantes por parte de bacterias del género *Pseudomonas*, llamados ramnolípido (Mnif y col., 2015). Estos tienen ventajas sobre los surfactantes sintéticos, tales como baja toxicidad, alta biodegradabilidad, selectividad y actividad específica a temperaturas, pHs y salinidad extremos (Preethy & Das, 2010). Por este motivo, entender cuáles son los procesos microbianos involucrados en la incorporación y la metabolización de los compuestos orgánicos resulta fundamental para desarrollar estrategias de biorremediación de sitios/efluentes contaminados con hidrocarburos.

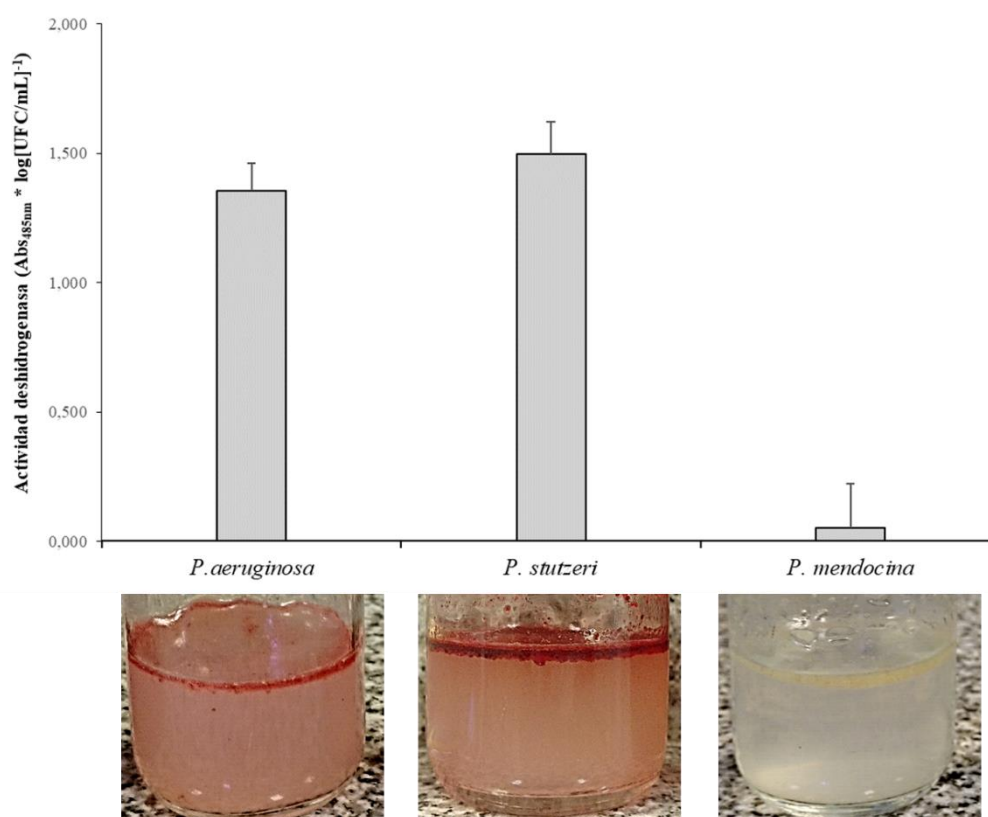


Figura 3: Actividad deshidrogenasa de las cepas *Pseudomonas* luego de 15 días de incubación (37 °C, 130 rpm) en BHB suplementado con diésel comercial 1 % v/v como única fuente de carbono. El color rojo en los sistemas con las bacterias *P. aeruginosa* y *P. stutzeri* muestra la producción de formazán, indicando su capacidad para metabolizar el diésel comercial.

3.3. Experimentos de biodegradación

El diésel comercial utilizado en este trabajo contiene 10 % de biodiésel (B10). El biodiésel es una mezcla de ácidos de ésteres metílicos (del inglés FAME) que resultan más fácilmente degradables por microorganismos que la fracción petroquímica (alcanos C₁₁-C₂₂). Por este motivo, en la figura 4 se muestra separadamente la eficiencia de biodegradación (EB) de ambas fracciones del diésel comercial por parte de las tres *Pseudomonas*. Puede observarse que las cepas más eficientes fueron *P. stutzeri* y *P. aeruginosa* alcanzando EB de $53 \pm 2\%$ y $42 \pm 5\%$ para la fracción petroquímica respectivamente y más del 75 % para la fracción FAME. Las EB alcanzadas por ambas cepas para la fracción petroquímica podría relacionarse con su capacidad de producir biosurfactantes bajo las condiciones ensayadas (Tabla 1). Mientras que *P. mendocina* mostró una EB menor al 10 % para ambas fracciones. Dado que la biodegradación de los compuestos orgánicos está estrechamente relacionada con su biodisponibilidad, estos resultados

concuerdan con los resultados de IE₂₄% y de HSC alcanzados por esta cepa.

Esto indicaría que *P. mendocina* sería menos eficiente que *P. aeruginosa* y *P. stutzeri* para la degradación del diésel comercial bajo las condiciones ensayadas.

Varios autores sugieren que la presencia de biodiésel podría favorecer la biodegradación de los hidrocarburos (Derrossi Meyer y col., 2014; Soares Junio y col., 2009). De hecho, los compuestos FAME constituyen un sustrato fácilmente asimilable que estimularía la biomasa bacteriana e incrementaría la biodegradación de los n-alcanos vía co-metabolismo (Brücker y col., 2011). Además, los compuestos FAME actuarían como surfactantes no iónicos, favoreciendo la biodisponibilidad de los hidrocarburos y aumentando, en consecuencia, su potencial biodegradación (Obbard y col., 2004; Yassine y col., 2013). Este comportamiento se observó para *P. aeruginosa* y *P. stutzeri* que mostraron altas EB de la fracción FAME acompañadas de EB significativas de la fracción de hidrocarburos C₁₁-C₂₂.

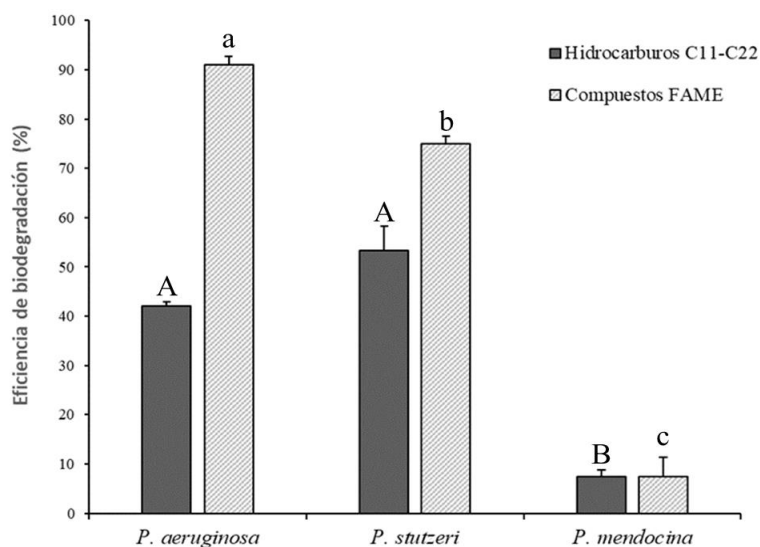


Figura 4: Eficiencia de biodegradación (%) de compuestos petroquímicos (C₁₁-C₂₂) y de la fracción FAME del diésel comercial (1 %v/v) por parte de las *Pseudomonas* incubadas en BHB durante 15 días (37 °C, 130 rpm). Letras minúsculas diferentes muestran diferencias significativas en la degradación de la fracción FAME y letras mayúsculas diferentes muestran diferencias significativas en la degradación de los n-alcanos de cadena media ($p < 0.05$).

4. Conclusiones

En este trabajo se estudiaron algunos mecanismos indirectos que podrían estar involucrados en la degradación del diésel comercial por parte de tres cepas del género *Pseudomonas*.

Los resultados obtenidos de IE₂₄% e HSC para *P. stutzeri* y *P. aeruginosa* indicarían que estas cepas serían productoras de biosurfactantes. Mientras que los valores de estos parámetros obtenidos para *P. mendocina* indicarían que esta cepa no es capaz de producir biosurfactantes bajo las condiciones ensayadas. Estos resultados están en concordancia con las eficiencias de biodegradación obtenidas para la fracción petroquímica del diésel comercial por parte de las tres cepas: 53 ± 2%, 42 ± 5% y 7,5 ± 2%, respectivamente. A su vez las cepas *P. aeruginosa* y *P. stutzeri* mostraron actividad deshidrogenasa mediante el método colorimétrico empleado, mientras que para *P. mendocina* no se obtuvieron resultados positivos.

La biorremediación de sitios contaminados, así como también el tratamiento de efluentes con hidrocarburos, requiere de microorganismos capaces de tolerar y asimilar estos compuestos. En este sentido, los resultados obtenidos indican que las cepas *P. aeruginosa* y *P. stutzeri* serían eficientes para ser aplicadas en procesos de biorremediación.

Agradecimientos

Los autores agradecen muy especialmente a la empresa SOLAMB S.R.L. por la provisión de muestras de lodos microbiológicos. También 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. Este proyecto es financiado con el soporte de la Pontificia Universidad Católica Argentina, el CONICET, la ANPCyT y el MinCTIP de la Provincia de Santa Fe.

Referencias bibliográficas

- Adekunle AS, Oyekunle J, Adekunle O, Ojo OS, Maxakato NW, Olutona GO, Obisesan OR. (2017). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon levels of groundwater in Ife north local government area of Osun state, Nigeria. *Toxicology Reports*, 4: 39-48.
- Ali Khan, A.H., Tanveer, S., Alia, S., Anees, M., Sultan, A., Iqbal, M., Yousaf, S. (2017). Role of nutrients in bacterial biosurfactant production and effect of biosurfactant production on petroleum hydrocarbon biodegradation. *Ecological Engineering*, 104, Part A, 158-164.
- Alvarez PJJ & Illman WA. (2006). Bioremediation and natural attenuation - Process fundamentals and mathematical models. Hoboken, NJ, USA. ISBN 978-0-471-65043-0.
- Bento FM, Oliveira Camargo FA, Okeke B, Frankenberger-Júnior WT. (2003). Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34(Suppl.1): 65-68.
- Brown, H.L., van Vliet, A.H., Betts, R.P., Reuter, M. (2013). Tetrazolium reduction allows assessment of biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in a food matrix model. *Journal of Applied Microbiology*, 115(5), 1212-1221.
- Bücker, F., Santestevan, N.A., Roesch, L.F., Jacques, R.J.S., Peralba, M. do C.R., Camargo, F.A. de O., Bento, F.M. (2011). Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 172-178.
- D'Andrea MA & Reddy GK. (2013). Health consequences among subjects involved in gulf oil spill clean-up activities. *The American Journal of medicine*, 126(11): 966-974.
- Das, Nilanjana & Chandran, Preethy (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*.
- Derrossi Meyer, D., Beker, S., Bücker, F., Peralba, M.d.C., Frazzon, A., Flávio Osti, J., Andreazza, R., Camargo, F., Bento, F. (2014). Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95, 1-8.
- Ekperusi O.A. & Aigbodion I.F. (2015). Bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons in diesel contaminated soil with the earthworm. *Eudrilus eugeniae. SpringerPlus*, 4: 540.
- Hesterberg TW, Long CM, Bunn WB, Lapin CA, McClellan RO, Valberg PA. (2012). Health effects research and regulation of diesel exhaust: an historical overview focused on lung cancer risk. *Inhalation Toxicology*, 24(1): 1-45.
- Kumari, B., Singh, S.N., Singh, D.P. (2016). Induced degradation of crude oil mediated by microbial augmentation and bulking agents. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13: 1029-1042.
- Logeshwaran P, Megharaj M, Chadalavada S, Bowman M, Naidu R. (2018) Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environmental Technology & Innovation*, 10: 175-193.
- Mendes Lopes, É., Castellane, T.C., Moretto, C., Lemos, E., De Souza, J.A. (2014). Emulsification properties of bioemulsifiers produced by wild-type and mutant *Bradyrhizobium elkanii* strains. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 5(6), 245.
- Michaud, L., Lo Giudice, A., Saitta, M., De Domenico, M., Bruni, V., 2004. The biodegradation efficiency on diesel oil by two psychrotrophic Antarctic marine bacteria during a two-month-long experiment. *Marine Pollution Bulletin*, 49(5-6), 405-409.
- Mnif, I., Mnif, S., Sahnoun, R., Maktouf, S., Ayedi, Y., Ellouze-Chaabouni, S., Ghribi, D. (2015). Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(19), 14852-14861.
- Obayori, O.S., Adebuseye, S.A., Adewale, A.O., Oyetibo, G.O., Oluyemi, O.O., Amokun, R.A., Ilori, M.O. (2009). Differential degradation of crude oil (Bonny Light) by four *Pseudomonas* strains. *J Environ Sci (China)*, 21(2): 243-8.
- Obbard, J.P., Ng, K.L., XU, R. (2004). Bioremediation of petroleum contaminated beach sediments: use of crude palm oil and fatty acids to enhance indigenous biodegradation. *Water, Air, and Soil Pollution*, 157(1-4), 149-161.
- Preethy, C., Das, N. (2010). Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. *International Journal of Engineering Science and Technology* 2(12), 6942-6953.
- Ramirez MI, Arevalo AP, Sotomayor S, Bailon-Moscoso N. (2017). Contamination by oil crude extraction – Refinement and their effects on human health. *Environmental Pollution*, 231: 415-425.

- Seklemova, E., A. Pavlova, y K. Kovacheva (2001). Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodegradation*, 12(5): 311-6.
- Shahaliyan, F., Safahieh, A., Abyar, H. (2015). Evaluation of Emulsification Index in Marine Bacteria *Pseudomonas sp.* and *Bacillus sp.* *Arabian Journal for Science and Engineering*, 40(7): 1849-1854.
- Soares Junior, J., Mariano, A., De, D., De Angelis, F., 2009. Biodegradation of biodiesel/diesel blends by *Candida viswanathii*. *African Journal of Biotechnology*, 8(12), 2774-2778.
- Ugochukwu UC, Ochonogor A, Jidere CM, Agu C, Nkoloagu F, Ewoh J, Okwu-Delunzu VU. (2018). Exposure risks to polycyclic aromatic hydrocarbons by humans and livestock (cattle) due to hydrocarbon spill from petroleum products in Niger-delta wetland. *Environment International*, 115: 38.
- Wasi, S., Tabrez, S., Ahmad, M. (2013). Use of *Pseudomonas spp.* for the bioremediation of environmental pollutants: a review. *Environ Monit Assess*, 185(10): 8147-55.
- Yassine, M.H., Wu, S., Suidan, M.T., Venosa, A.D. (2013). Aerobic biodegradation kinetics and mineralization of six petrodiesel/soybean-biodiesel blends. *Environmental Science & Technology*, 47(9), 4619-4627.