

BIODEGRADACIÓN DE MEZCLAS DE HIDROCARBUROS UTILIZANDO MOHOS HIDROCARBONOCLÁSTICOS AISLADOS DE AMBIENTES CONTAMINADOS

Araujo Sola, Evelyn N.

Laboratorio de Microbiología. FIQ - UNL.

Directora: Frisón, Laura N.
Codirector: Manzo, Ricardo M.

Área: Ciencias Naturales

Palabras claves: Contaminación, Micorremediación, Biodiésel.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales y continuos problemas ambientales es la contaminación del suelo producida por las actividades humanas relacionadas al manejo del petróleo y sus productos derivados. Existen esfuerzos claros para intentar reducir dicha contaminación, por ejemplo, a través del desarrollo de alternativas para la sustitución o complemento de los combustibles fósiles, como los biocombustibles. Asimismo, en las últimas décadas se han aplicado distintas tecnologías para la remediación de los suelos contaminados con la intención de corregir y reducir la concentración de hidrocarburos en los mismos. En particular, la biorremediación surge como una rama de la biotecnología que busca resolver los problemas de contaminación mediante el uso de microorganismos capaces de degradar compuestos que provocan desequilibrios en el medio ambiente y en los ecosistemas (Gibson & Sayler, 1992). Dado que los hongos son descomponedores por excelencia y productores de enzimas extracelulares y ácidos capaces de descomponer compuestos orgánicos complejos, la micorremediación se presenta como un acercamiento viable para lograr la depuración biológica de entornos contaminados con compuestos recalcitrantes.

OBJETIVOS

General

Título del proyecto: DISEÑO DE CONSORCIOS MICROBIANOS DEGRADADORES DE MEZCLAS DE DIÉSEL Y BIODIÉSEL PARA SER EMPLEADOS EN LA BIORREMEDIACIÓN EX SITU DE SUELOS CONTAMINADOS.

Instrumento: CAI+D

Año de la convocatoria: 2016

Organismo financiador: UNL

Director: Manzo, Ricardo Martín.

Evaluación tesina: 18 de diciembre de 2020. Calificación: Sobresaliente, 10 (Diez). Acta o Resol. E14992/20.

Conocer el potencial biodegradador *in vitro* de mohos aislados de suelos contaminados con biocarburentes provenientes de diversas áreas geográficas (ciudad de Santa Fe, provincia de Santa Fe y Vaca Muerta, provincia de Neuquén), con énfasis en la región Santa Fe.

Específicos

Analizar la biodiversidad cultivable de mohos presentes en los suelos contaminados con biocarburentes de las diferentes zonas geográficas y en una muestra de combustible diésel líquido comercial contaminado. Comparar si existen diferencias en cuanto al recuento y riqueza fúngica entre las diversas regiones geográficas. Evaluar *in vitro* el poder biodegradador que presentan los mohos aislados de los sistemas edáficos contaminados con hidrocarburos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron por triplicado muestras de suelo de la ciudad de Santa Fe de 2 zonas de expendio y recarga de combustible. Asimismo, se tomaron por triplicado 2 muestras de suelo de regiones petroleras con contaminaciones crónicas con hidrocarburos en Vaca Muerta, Neuquén. Además, se tomó por triplicado 1 muestra de los sedimentos de tanques de combustibles (fundamentalmente diésel) asociados a grupos electrógenos, con una aparente contaminación fúngica, ubicados en la planta piloto del INTEC, Santa Fe. Cada muestra se depositó independientemente en recipientes estériles y se transportaron al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) de la Universidad Nacional del Litoral, en Santa Fe, para su análisis.

Se aislaron e identificaron taxonómicamente hongos filamentosos de las muestras. Para ello, se utilizaron los criterios y claves taxonómicas propuestas por Pitt & Hocking (2009) y Klich & Pitt (1998); además, se usó bibliografía accesoria. Se estudió la riqueza específica, la similitud/disimilitud (índice de Jaccard) de las muestras y se determinó la frecuencia porcentual de los géneros aislados e identificados en los medios de cultivo Agar Extracto de Malta (MEA) y Papa Dextrosa Agar (PDA).

A los hongos filamentosos identificados se les realizaron estudios de crecimiento en un medio Agar Mineral Inorgánico (AMI) con agregado de un 2% (v/v) de diésel comercial Infinia Mezcla B10. Este estudio se utilizó para la selección de las cepas que se utilizaron para la biodegradación *in vitro*.

Se seleccionaron 4 especies (*Byssochlamys spectabilis*, *Fusarium falciforme*, *Fusarium sporotrichioides* y *Mucor hiemalis*) para llevar a cabo los estudios de biodegradación *in vitro*. Se estudiaron los porcentajes de biodegradación utilizando técnicas gravimétricas y cromatográficas (GC-FID).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificaron 13 géneros de hongos filamentosos en el medio de cultivo Agar Extracto de Malta (MEA) y 8 géneros en el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Para la identificación hasta el nivel taxonómico de especie solo se utilizaron los aislados obtenidos del medio MEA, ya que el mismo, a diferencia del medio PDA, cuenta con extracto de malta y peptona de caseína, componentes que proporcionan una mayor fuente de nutrientes para lograr el crecimiento de una mayor variabilidad de hongos. Se aislaron 12 especies: *Aureobasidium pullulans*, *Byssochlamys spectabilis*, *Cladosporium cladosporioides*,

Didymella glomerata, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium falciforme*, *Fusarium sporotrichioides*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium aethiopicum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium polonicum*, *Talaromyces pinophilus* y micelio estéril sin esporular. Las especies encontradas en nuestro trabajo se aprecian también con las encontradas por Pernia *et al.* (2012). Estos autores pudieron aislar las especies *A. pullulans*, *B. spectabilis*, *C. cladosporioides*, *D. glomerata*, *F. avenaceum*, *P. glabrum* y *T. pinophilus* de diferentes sustratos contaminados con hidrocarburos y sus derivados.

La riqueza específica (S) es en la muestra 2a S=5, en la muestra 2b S=6, en la muestra 3a S=2 y en la muestra 3b S=2. Como se puede observar, hubo una mayor riqueza de especies en las muestras que corresponden a la ciudad de Santa Fe (2a y 2b) que aquellas que corresponden a la zona de Vaca Muerta, Neuquén (3a y 3b). Asimismo, no hay especies compartidas entre las muestras pertenecientes a cada provincia ($I_j = 0$).

Los géneros que mayor frecuencia porcentual presentaron en el medio MEA fueron *Penicillium* y *Aureobasidium* (ambos con una frecuencia de 60%); *Chrysosporium*, *Fusarium* y *Scytalidium* (todos con una frecuencia del 40%) y, por último, los géneros *Alternaria*, *Byssoschlamys*, *Cladosporium*, *Didymella*, *Mucor*, *Phoma*, *Talaromyces* y *Trichocladium*, todos con una frecuencia del 20%. Además, en medio PDA, el género que mayor frecuencia porcentual presentó fue *Aureobasidium* (60%); seguido por *Chrysosporium*, y *Penicillium* (40%) y por último, con una frecuencia del 20%, los géneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Mucor*, *Phoma* y *Scytalidium*.

Todas las especies en estudio, a excepción de *A. pullulans*, crecieron en medio AMI (Agar Mineral Inorgánico) con el agregado de un 2% (v/v) de diésel comercial Infinia Mezcla B10. Así, podemos considerar todas estas especies como hidrocarbonoclasticas, ya que utilizan el contaminante como fuente de carbono y energía (Pernia *et al.*, 2012).

Las 4 cepas que se seleccionaron debido a que presentaron mayor crecimiento en medio AMI con el agregado de 2% (v/v) de diésel comercial Infinia Mezcla B10 (radio máximo de la colonia) fueron: *B. spectabilis*, *F. falciforme*, *F. sporotrichioides* y *M. hiemalis*.

En la **Tabla 1** se observa el porcentaje de degradación del combustible provocado por cada microorganismo en estudio determinado empleando por técnica gravimétrica y análisis de los productos de degradación por cromatografía gaseosa (GC-FID).

Tabla 1. Porcentaje de biodegradación de la mezcla comercial de hidrocarburos (%)*

	GC-FID		Gravimetría	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
<i>B. spectabilis</i>	23,69 ^a	6,88	23,58 ^a	2,97
<i>F. falciforme</i>	32,48 ^c	1,45	38,46 ^c	4,20
<i>F. sporotrichioides</i>	31,04 ^{ab}	4,95	30,26 ^{ab}	3,37
<i>M. hiemalis</i>	31,63 ^{ab}	1,00	33,66 ^{ab}	5,44

*No hay diferencia estadísticamente significativa del porcentaje de biodegradación de hidrocarburos obtenidos por cada técnica empleada ($p = 0,64$).

^{a-c} Letras diferentes indican diferencias significativas entre especies ($p < 0,05$).

En la **Figura 1** se muestra una serie de cromatogramas que revela la biodegradación del biodiésel B10 que permite observar la comparación entre las cuatro especies utilizadas y el control. En dicha figura ha sido posible observar que las cuatro especies utilizadas usaron de

diferente manera el mismo combustible como fuente de carbono y energía; obteniéndose, en promedio, un porcentaje de degradación de alrededor del 30%. Sería esperable que si se utilizara un consorcio de 2 o más de estas cepas, se podría lograr tal vez una degradación mayor, tal como ya lo indicó Nápoles-Álvarez *et al.* (2015) en sus estudios.

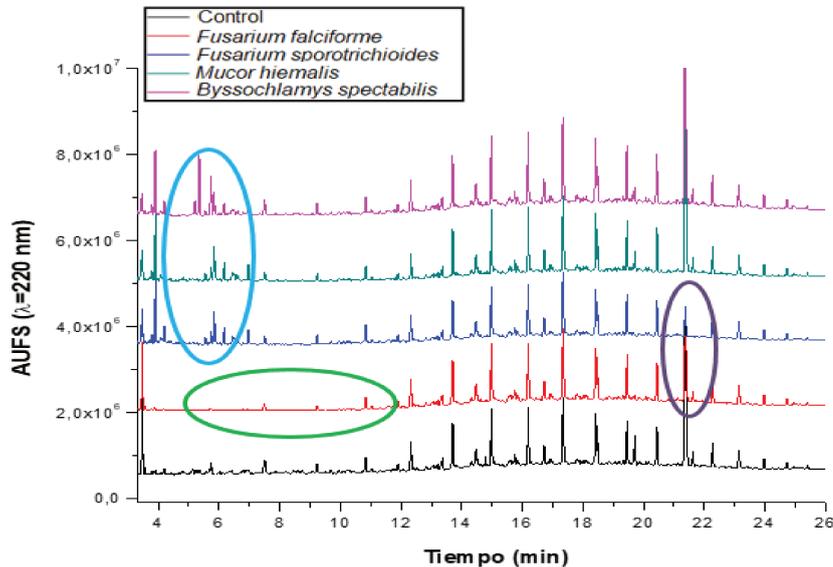


Figura 1. Análisis de los productos de degradación por GC-FID de mezclas comerciales de diésel/biodiésel (B10) utilizando las especies *F. falciforme*, *F. sporotrichioides*, *M. hiemalis*, *B. spectabilis* y el respectivo control

CONCLUSIONES

La especie que presentó el mayor porcentaje de degradación fue *F. falciforme* seguido por *M. hiemalis*, *F. sporotrichioides* y, por último, *B. spectabilis*. De los resultados es posible concluir que cada especie fúngica posee una forma única de degradar los hidrocarburos debido a la capacidad metabólica intrínseca que posee cada moho, dando lugar a perfiles cromatográficos y productos de degradación diferenciales.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Gibson, D. T., & Sayler, G. S. 1992. Scientific Foundations of Bioremediation: Current Status and Future Needs. American Academy of Microbiology. Washington, D.C., Estados Unidos.

Klich, M., & Pitt, J. 1988. A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs. CSIRO Division of Food Processing, Australia, 116.

Nápoles-Álvarez, J., Rodríguez-Pérez, S., Santiago-Blásquez, L., & Ábalos-Rodríguez, A. 2015. Disminución del extracto orgánico total en suelos contaminados con hidrocarburos. Tecnología Química, 35(3), 342-355.

Pernía, B., Demey, J. R., Inojosa, Y., & Naranjo, L. 2012. Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclastico de hongos aislados de crudo y sus derivados: Un meta-análisis. Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal, 3(1), 1-40.

Pitt, J., & Hocking, A. 2009. Fungi and Food Spoilage. 3^o Ed. Springer. New York. EEUU, 524.