

POTENCIAL BIORREMEDIADOR DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE AMBIENTES ANTROPOGÉNICOS SOBRE SISTEMAS SÓLIDOS CONTAMINADOS

Borra, Milagros¹

¹Cátedra de Microbiología, Departamento de Tecnología de Alimentos y Biotecnología, FIQ-UNL
Directora: Araujo Sola, Evelyn Noemí

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Biorremediación, Metales Pesados, Hidrocarburos.

INTRODUCCIÓN

La remediación de suelos multi-contaminados es un problema de elevada complejidad, donde la degradación microbiana constituye el principal proceso de descontaminación natural. Aprovechando estratégicamente los procesos de metabolización y biosorción propios de ciertos microorganismos se puede disminuir la concentración de un agente contaminante o, cuando menos, metabolizar los compuestos a estados que resulten menos nocivos para el ambiente y la salud humana.

OBJETIVOS

- Analizar la factibilidad de uso de cepas aisladas de sistemas sólidos contaminados para posibles ensayos de biodegradación.
- Caracterizar e identificar los microorganismos autóctonos inicialmente aislados.
- Construir una biblioteca representativa de bacterias autóctonas capaces de colaborar en la biorremediación de sistemas sólidos contaminados.
- Estudiar la tolerancia de las cepas bacterianas a los contaminantes de interés (diésel y Cr).

Título del proyecto: TRANSFORMACIONES BIOLÓGICAS PARA EL SANEAMIENTO Y DISPOSICIÓN DE LODOS Y BIOSÓLIDOS PROVENIENTES DE AGUAS RESIDUALES GENERADAS EN PLANTAS DE HIGIENE URBANA.

Instrumento: CAI+D-UNL Orientado código 21820210100032LI

Año convocatoria: 2021

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral

Directora: Dra. María Eugenia Lovato; co-director: Dr. Ricardo Manzo

METODOLOGÍA



Se utilizaron cepas de bacterias aisladas a partir de sistemas contaminados con hidrocarburos y metales pesados realizadas en el marco de los proyectos PICT-2015-0862, CAI+D-UNL 2020 tipo I código 50520190100072LI y CAI+D Orientado 2021 código 21820210100032LI.

A partir de muestras de efluentes líquidos, semi-sólidos y sólidos con contenidos elevados de metales pesados provenientes del complejo ambiental Santa Fe se aislaron, luego de la aplicación de un choque térmico a 80 °C por 10 min, 51 cepas de bacterias esporuladas aerobias. Se realizaron estudios de crecimiento de dichas cepas utilizando diversos medios de cultivos definidos conteniendo, según correspondiera, hidrocarburos o metales pesados, de forma de evaluar la tolerancia de las mismas a dichos compuestos.

Se analizó, primero, la tolerancia de las 51 cepas aisladas al diésel empleando el diésel identificado comercialmente como Infinia Diésel, que pertenece a la empresa YPF (Argentina) y está aditado con un 10% (v/v) de biodiésel de aceite de soja (B10). Para el ensayo, se inocularon dos placas de Petri para cada aislado con tres toques cada una conteniendo 15 mL de medio Bushnell-Haas (BH) con el agregado de un 0,1% (v/v) de una solución de micronutrientes y de 2% (v/v) de diésel comercial Infinia Mezcla B10 esterilizado y solidificado (Mahmud *et al.*, 2023). De igual forma, se inoculó una placa control utilizando Agar Soya-Trypticase (Biokar, Francia). Las colonias se incubaron durante 7 días a 37 °C, siendo retiradas únicamente para efectuar las medidas de los diámetros de las colonias en los días 3, 5 y 7.

Para la segunda parte del análisis de la tolerancia de las cepas, en este caso, el Cr^{6+} , se decidió hacer una selección previa y se trabajó con 30 cepas. De las 51 cepas provenientes del relleno sanitario, y ensayadas en el combustible comercial, se hizo una selección de las 15 que lograron el mayor crecimiento (mayor diámetro de la colonia al cabo de 7 días). Con el mismo criterio, se seleccionaron 15 cepas más, pero en este caso, aisladas de muestras de suelo con una evidente contaminación con combustibles, aceites o grasas hidrocarbonadas de distintas zonas de la ciudad de Santa Fe, provincia de Santa Fe, y muestras de suelos de regiones petroleras con contaminaciones crónicas con hidrocarburos del Yacimiento Petrolífero Vaca Muerta, provincia de Neuquén. Las mismas fueron aisladas y caracterizadas preliminarmente (Araujo Sola *et al.*, 2020; Mahmud *et al.*, 2023) en el marco de los proyectos previamente mencionados.

Para los ensayos con el Cr^{6+} , se preparó una solución madre de dicromato de potasio (150 mM) esterilizada por filtración usando jeringas y filtros estériles de 0,45 μm de diámetro de poro. Se inoculó una placa de Petri cada dos cepas con dos toques de cada una. La placa contenía 15 mL de Caldo Nutritivo (Biokar, Francia) agarizado al 1,5 % (m/v) con el agregado de la solución madre para obtener una concentración final en placa del 0,5 mM del metal. Se realizó, al igual que antes, una placa control por cepa con el medio Caldo Nutritivo (Biokar, Francia) agarizado al 1,5 % (m/v). Se utilizó el medio comercial Agar Bacteriológico Tipo A (Biokar, Francia) para agarizar. Se incubaron por 7 días a 37 °C y se realizaron las mediciones correspondientes de los radios de las colonias a los 3, 5 y 7 días.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Se trabajó con un total de 51 cepas. Las mismas, fueron aisladas del circuito del relleno sanitario de Santa Fe. Todas las cepas ensayadas fueron bacterias, en particular, bacilos esporulados aerobios. Esto tiene una lógica intrínseca dado que a las muestras de partida se les efectuó oportunamente el tratamiento térmico.

En cuanto al análisis de la tolerancia de las cepas al biodiesel, de las 51 cepas analizadas, 17 presentaron crecimiento nulo. En aquellas en las que sí se apreció desarrollo, se observó un rango de crecimiento desde 0,05 cm a 2,31 cm como valor máximo. Con respecto a los controles llevados a cabo, se observó un rango de crecimiento desde 0,23 cm a 8,60 cm. De dichas cepas, y como se mencionó anteriormente, se seleccionaron las 15 cepas que presentaron el mayor crecimiento (diámetro de la colonia al cabo de 7 días) para llevar a cabo los análisis de tolerancia al Cr^{6+} . Dichas cepas fueron: RG-2, RG-3, RG-4, LC-1, LC-3, L1-1, L2-5, L2-8, L3-1, L3-4, L3-8, L3-9, A-8, AN-3 y AN-5.

Además, se ensayaron otras 50 cepas que procedían, como se indicó previamente, de las muestras de suelos contaminados con hidrocarburos (Mahmud *et al.*, 2023). Se seleccionaron 15 de estas 50 cepas usando el mismo criterio: el mayor crecimiento observado (diámetro de la colonia al cabo de 7 días). Dichas cepas fueron: 3A-5, 3A-7, 3A-8, 3A-9, 3A-10, 3B-2, 3B-3, 3B-4, 4A-1, 4A-2, 4A-4, 4A-5, 4A-6, 4B-5 y 4B-9.

Con respecto al análisis de la tolerancia de las cepas al Cr^{6+} , las 30 cepas ensayadas presentaron desarrollo en el medio adicionado con el metal pesado. El rango de crecimiento registrado fue desde 1,08 cm hasta 6,97 cm. De las cepas analizadas, 3 presentaron un crecimiento nulo. Con respecto a los controles llevados a cabo (referidos en la columna llamada "AN"), se observó un rango de crecimiento desde 4,38 cm a 8,63 cm (**Tabla 1**).

Tabla 1. Diámetro (cm) alcanzado por las distintas cepas en medio Caldo Nutritivo (Biokar, Francia) agarizado al 1,5 % (m/v) con el agregado de una solución madre de dicromato de potasio (150 mM) para obtener una concentración final en placa del 0,5 mM del metal.

Cepa	Diámetro (cm)*		Cepa	Diámetro (cm)*	
	Cr	AN		Cr	AN
3B-3	6,97 ± 1,49	8,13 ± 3,95	LC-3	2,60 ± 0,35	6,00 ± 0,00
AN-3	6,83 ± 1,76	5,23 ± 1,65	L3-1	2,28 ± 0,40	6,00 ± 0,00
L3-4	6,88 ± 1,77	5,54 ± 1,29	4B-5	2,23 ± 0,46	4,38 ± 1,89
3A-10	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	L1-1	2,13 ± 0,66	6,00 ± 0,00
3B-4	6,00 ± 0,00	8,63 ± 2,71	3B-2	1,76 ± 0,59	6,67 ± 2,50

4A-5	6,00 ± 0,00	6,43 ± 1,89	RG-4	1,73 ± 1,22	5,53 ± 2,68
4A-6	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	L2-5	1,73 ± 0,74	6,00 ± 0,00
RG-3	5,07 ± 0,85	6,00 ± 0,00	L2-8	1,44 ± 0,26	5,77 ± 1,61
A-8	3,82 ± 0,16	5,89 ± 1,04	3A-8	1,13 ± 0,73	7,53 ± 2,18
3A-7	3,38 ± 2,09	6,00 ± 0,00	4A-2	1,07 ± 0,23	5,57 ± 1,24
4A-4	3,03 ± 0,68	6,00 ± 0,00	RG-2	1,00 ± 0,14	6,00 ± 0,00
3A-5	2,94 ± 0,58	6,00 ± 0,00	LC-1	1,08 ± 0,4	6,00 ± 0,00
4B-9	2,92 ± 0,31	5,88 ± 2,09	L3-8	0,00 ± 0,00	5,99 ± 1,69
4A-1	2,81 ± 0,33	8,27 ± 0,23	L3-9	0,00 ± 0,00	5,43 ± 1,81
3A-9	2,63 ± 0,97	6,00 ± 0,00	AN-5	0,00 ± 0,00	6,05 ± 1,45

*Los resultados se informaron como un promedio de las medidas tomadas con su correspondiente desviación estándar.

La columna "AN" corresponde a los diámetros tomados en la placa control.

En un futuro, se espera utilizar las cepas con mayor tolerancia y consorcios establecidos entre las mismas para ejecutar ensayos de biorremediación *in vitro* a escala de laboratorio tanto en medios líquidos como en suelos.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Araujo Sola, E. N.; Manzo, R. M; Frisón, L. N. (2020). *Biodegradación de mezclas de hidrocarburos utilizando mohos hidrocarbonoclasticos aislados de ambientes contaminados*. Tesina de Lic. en Biodiversidad, FHUC-UNL, 105 p.

Mahmud, T.; Russell-White, K.; Spontón, P. G. (2023). *Biodegradación de biodiesel empleando bacterias aisladas de suelos contaminados con combustibles*. Encuentro de Jóvenes Investigadores 2023.

Tabacchioni, S., Passato, S., Ambrosino, P., Huang, L., Caldara, M., Cantale, C., ... & Bevivino, A. (2021). *Identification of beneficial microbial consortia and bioactive compounds with potential as plant biostimulants for a sustainable agriculture*. Microorganisms, 9(2), 426.