



Encuentro
de JÓVENES
INVESTIGADORES

BIODEGRADACIÓN DE BIODIESEL EMPLEANDO BACTERIAS AISLADAS DE SUELOS CONTAMINADOS CON COMBUSTIBLES

Mahmud, Tomás

Universidad Nacional del Litoral - Facultad de Ingeniería Química - Departamento de Principios de Biotecnología - Cátedra de Microbiología y Biotecnología.

Directora: Mg. Russell-White Karen

Codirector: Dr. Spontón Pablo Gabriel

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: aislamiento de microorganismos, biorremediación, biotecnología.

INTRODUCCIÓN

El biodiésel surgió como una opción interesante al uso de combustible fósil dado que es capaz de aprovechar diversas materias primas renovables y el nivel bruto de sus emisiones es muy inferior (Meyer *et al.*, 2014). Por ser el suelo el receptor y depósito final de los residuos generados por esta creciente industria, la biorremediación (una rama de la biotecnología) aparece como un conjunto de tecnologías ambientalmente sostenibles 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 (Das & Chandran, 2011).

OBJETIVOS

- Evaluar el potencial biodegradativo de bacterias aisladas frente al biodiesel:
 - Aislar y conservar bacterias de suelos contaminados con hidrocarburos (diésel y/o biodiesel).
 - Realizar un screening preliminar de las cepas bacterianas aisladas frente a su potencial biodegradativo frente al biodiesel.
 - Seleccionar las bacterias que presenten mayor poder de biodegradación.

Título del proyecto: BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS UTILIZANDO BACTERIAS Y MOHOS HIDROCARBONOCLÁSTICOS AISLADOS EN AMBIENTES CONTAMINADOS

Convocatoria: PROYECTO CAI+D 2020 PI TIPO I

Organismo Financiador: UNL

Director/a: Frisón, Laura Noemí



METODOLOGÍA

Toma y procesamiento de muestras de suelo contaminadas con combustible:

- **Ciudad de Santa Fe:** Se eligieron zonas de expendio y recarga de combustible donde maquinarias, equipos agrícolas y demás vehículos realizan su aprovisionamiento. Previo al muestreo se removió la capa vegetal superficial y luego, con un barreno extractor, se procedió a tomar por triplicado 2 muestras de suelo contaminado ubicado a una profundidad de entre 0 y 15 cm. Las muestras se tamizaron para de eliminar piedras y material vegetal.

- **Vaca Muerta (Neuquén):** También se tomaron por triplicado muestras de suelo de dos sitios de la región petrolera con contaminaciones crónicas de hidrocarburos.

Para su análisis, cada muestra se depositó individualmente en bolsas plásticas termoselladas y se transportaron bajo refrigeración al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) de la Universidad Nacional del Litoral, en Santa Fe.

En la Tabla N°1 se resume las muestras obtenidas y sus respectivas ubicaciones.

Tabla N°1: Lugares de toma de muestras de suelos contaminadas con combustibles

Lugar de muestreo	Denominación de la muestra	Coordenadas geográficas
Zona costanera este, Santa Fe, generador (izquierdo)	2A	-31.634813, -60.670291
Zona costanera este, Santa Fe, generador (derecho)	2B	-31.634813, -60.670291
Pasivo Vaca muerta, Neuquén	3A	-38.061714,-69.846139 (Norte) -38.378374,-69.813181 (Sur)
Activo Vaca muerta, Neuquén	3B	-38.205919,-69.901071 (Este) -38.302976,-69.494577 (Oeste)
AXION, Av. Facundo Zuviría, Santa Fe	4A	-31.625006, -60.705547
AXION, Av. Facundo Zuviría, Santa Fe	4B	-31.625006, -60.705547

Aislamiento y conservación:

Para el aislamiento y recuento en placa de las bacterias esporuladas aeróbicas se realizó a cada muestra un choque térmico a 80°C en baño termostático por 10 min. y luego, se sumergió en baño de hielo. De cada muestra se pesaron (10 g) y se colocaron en bolsas estériles Whilpack. A cada bolsa se le adicionaron 90 ml de agua de peptona estéril 0,1% (m/v) (dilución 10⁻¹). Las muestras se homogeneizaron en un homogeinizador Stomacher Lab Blender 400. A partir de esta dilución se realizaron diluciones decimales seriadas hasta 10⁻⁵. En cada una de las diluciones se sembró en profundidad (1 ml) utilizando 19 ml del medio agar nutritivo (AN). La incubación se realizó a 37°C por 24-48 h.

De las colonias de bacterias desarrolladas, se realizaron los aislamientos observando las características macro y microscópicas (usando tinción simple y de Gram) de las colonias obtenidas. Los microorganismos se incubaron empleando caldo y agar nutritivo. Los aislados considerados como cepas puras, se mantuvieron en placas de Petri y/o tubos en pico de flauta a 4°C para continuar con los ensayos.



Screening preliminar - Ensayo de capacidad biodegradadora:

En placas de Petri con medio Bushnell Haas (BH) + Solución de micronutrientes (SM) (0,1 % v/v) + Biodiesel (BD) (2 % v/v) (Bushnell & Haas, 1941) se sembró cada cepa aislada por punción y por triplicado. Se cultivaron a 37°C durante al menos 48 horas, se observó presencia de desarrollo y en caso de ser positivo se midió el tamaño de la colonia de cada cepa cada 24 hs. Es importante destacar que el medio BH es un medio basal sin fuente de carbono, por lo que el biodiesel es quien aporta dicha fuente. Esto implica que sólo aquellos microorganismos capaces de degradar el biodiesel podrán desarrollar en el medio.

Crioconservación:

Las cepas que presentaron desarrollo en Medio BH con 2% de biodiesel fueron conservadas en ultrafreezer a -80°C en caldo nutritivo suplementado con glicerol (15% v/v) como agente crioprotector.

RESULTADOS

En total, se aislaron de 50 cepas, las cuales fueron denominadas de la siguiente manera:

2A1-2A10, 2B1-2B9, 3A1-3A10, 3B1-3B6, 4A1-4A6, 4B1-4B9

Como era de esperarse, se pudo observar que todas las cepas aisladas de los diferentes suelos contaminados con combustibles fueron bacilos Gram positivos esporulados (ver ejemplos Tabla N°2). Esto se debe principalmente a la forma en la cual se realizó el aislamiento (choque térmico).

Observaciones microscópicas de cepas aisladas:

En la tabla N°2 se muestran a modo de ejemplo algunas de las observaciones microscópicas realizadas.

Tabla 2: Características microscópicas de algunas cepas aisladas de los suelos contaminados con combustible

CEPA	MEDIO	FORMA/TAMAÑO	AGRUPACIÓN	ESPOROS
2A5	AN	Bacilos tamaño medio	Cadenas, pares y aislados	Alta esporulación. Tipo plectridio
3A3	AN	Bacilos anchos y de gran tamaño	Cadenas	Esporos internos centrales no deformantes
4A1	AN	Bacilos tamaño medio	Cadenas, pares y aislados	Esporos internos no deformantes que ocupan casi toda la célula. También esporos sueltos no teñidos

Con respecto al ensayo de capacidad biodegradadora empleando el medio basal agar BH con 2% de biodiesel, se pudo observar que 30 cepas de un total de bacterias aisladas pudieron desarrollar y crecer en dicho medio, lo cual implica que las mismas pudieron utilizar el biodiesel como única fuente de Carbono. En la Tabla N°3 se puede observar el diámetro promedio de cada colonia sembrada en agar BH luego de diferentes días de desarrollo. Se puede apreciar que la mayoría de las colonias presentaron diámetros de colonias mayor o igual a 1 cm y en algunos casos invadieron



completamente la placa, como ser los casos de las cepas 3A5, 3A6, 3A7, 3A9, 3B2, entre otras.

Tabla 3: Ensayo de capacidad biodegradadora: Se muestran a continuación los diámetros de las colonias desarrolladas en medio BH agarizado + SM + 2% BD

CEPA	Diámetro de la colonia (cm) (*)	Día de medición del diámetro de colonia	CEPA	Diámetro de la colonia (cm) (*)	Día de medición del diámetro de colonia	CEPA	Diámetro de la colonia (cm) (*)	Día de medición del diámetro de colonia
2A7	0,5	7	3A9	Toda la placa	2	4A6	5,2	2
2B1	1,6	4	3B1	1,7	4	4B1	1,5	7
2B2	2,4	4	3B2	Toda la placa	2	4B2	2,0	7
3A1	2,0	4	3B3	Toda la placa	2	4B3	1,0	7
3A10	Toda la placa	2	3B4	Toda la placa	2	4B4	1,0	7
3A3	1,8	4	4A1	Toda la placa	2	4B5	Toda la placa	2
3A4	1,4	7	4A2	Toda la placa	2	4B6	3,0	4
3A5	Toda la placa	2	4A3	4,7	2	4B7	2,0	2
3A7	Toda la placa	2	4A4	Toda la placa	2	4B8	2,0	2
3A8	Toda la placa	2	4A5	Toda la placa	2	4B9	Toda la placa	2

(*) El valor informado es un valor promedio de cultivos realizados por triplicado

CONCLUSIONES

En este trabajo se pudieron aislar, caracterizar microscópicamente y conservar diferentes bacterias, esporuladas, a partir de suelos contaminados con combustibles. Un gran porcentaje de las mismas presentó actividad biodegradativa sobre el biodiesel cuando se las desarrolló en un medio sintético con este combustible como única fuente de carbono. Si bien estos resultados son preliminares, resultan interesante ya que profundizar los estudios en este sentido, podrían aportar resultados que ayuden a encontrar nuevas estrategias para mejorar la calidad de los suelos contaminados con este tipo de combustibles.

BIBLIOGRAFÍA

Bushnell L. D. & Haas H. F. 1941. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 41(5): 653-673.

Das N. & Chandran P. 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*, 2011: 941810.

Meyer D. D., Anderson Beker S., Bücker F., Ruaro Peralba M., Guedes Frazzon A., Osti J. F., Andrezza R., de Oliveira Camargo F., Menezes Bento F. 2014. Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95: 356-363.

