

Optimización de Bioprocesos Integrados a Partir de Cepas Aisladas de Áreas Crónicamente Contaminadas con Hidrocarburos para la Obtención de Biosurfactantes

Resumen: Se aislaron cepas degradadoras de hidrocarburos de zonas contaminadas en Campana (Bs.As). El aislamiento se llevó a cabo usando cultivos de enriquecimiento: medio salino mínimo (MSM) suplementado con una mezcla de hidrocarburos comerciales (HC) como única fuente de carbono. Paralelo a esto, se estudió la capacidad de biosíntesis de surfactantes de estas cepas a través de la medición de la tensión superficial (ST). La cepa AgHC, perteneciente a género *Pseudomonas*, fue seleccionada para realizar los ensayos de optimización utilizando diferentes fuentes de carbono. Los cultivos fueron incubados durante 48h en MSM con glucosa o glicerol como sustratos. La biomasa obtenida en esta etapa se transfirió a MSM fresco con HC durante 72h. AgHC fue capaz de crecer utilizando todas las fuentes de carbono ensayadas. En cuanto a la medición ST, mostró ser menor cuando se usaron Glucosa y Glicerol. No se observó un descenso significativo cuando se utilizó HC.

Palabras Claves: Biosurfactantes; *Pseudomonas*; Hidrocarburos.

Abstract: Hydrocarbon-degrading strains were isolated from polluted areas in Campana (Bs.As). Isolation was performed by enrichment cultures in a mineral saline medium (MSM) containing a mixture of commercial hydrocarbons (HC) as carbon source. The ability of these strains to produce biosurfactants was estimated by direct measurement of the surface tension (ST). One of them, AgHC belonging to *Pseudomonas* spp., would have a potential use in biosurfactant production. Experiments were carried out in Erlenmeyer flasks cultured for 48h in MSM supplemented with glucose or glycerol as carbon source. Next, biomass produced with each substrate was transferred to fresh MSM supplemented with HC during 72h. Biomass and biosurfactant production were estimated. Results showed that AgHC was able to grow using all the carbon sources tested. Regarding ST measurement, the minimum value was obtained when the bacteria grew on glucose and glycerol. No significant decrease was observed on ST value when HC was used.

Keywords: Biosurfactants; *Pseudomonas*; Hydrocarbons.

Franco Liporace⁽¹⁾, Débora Conde Molina⁽¹⁾, Ana M. Giuliatti^(1,2), Carla Quevedo⁽¹⁾

⁽¹⁾Laboratorio de Investigación en Bioprocesos (FRD - UTN), San Martín 1171, Campana, Argentina.

⁽²⁾Instituto NANOBIOTEC (FFyB - UBA), Junín 953, CABA, Argentina.

Mail: francoliporace@hotmail.com

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El interés social por la conservación del medio ambiente ha resultado en el endurecimiento de legislaciones ambientales y cambios de política fiscal que buscan reducir el impacto ambiental de las actividades desarrolladas por el hombre. En este contexto, la Argentina enfrenta las consecuencias de la explotación de recursos no renovables (petróleo, minerales), de la actividad agropecuaria (uso de agroquímicos) y de la actividad industrial (industrias químicas, petroquímica, curtiembres, celulosa, entre otras), que muchas veces no contemplan las prácticas de conservación del medio ambiente e impactan en diversos ecosistemas, incluyendo suelos, aguas superficiales y subterráneas. Entre las clases más importantes de contaminantes orgánicos en el medio ambiente están los hidrocarburos del petróleo y productos halogenados derivados de los petroquímicos. En nuestro país amplias zonas se ven afectadas por este tipo de contaminación. Tradicionalmente, la eliminación de los contaminantes orgánicos se ha encarado mediante tecnologías probadamente efectivas que involucran tratamientos físicos y/o químicos [Araruna et al. (2004)]. En la actualidad, a causa de su elevado costo y la perturbación que generan sobre las zonas afectadas, solo se aplican en ciertos casos y como primera acción de emergencia a fin de remover grandes masas de contaminantes. El petróleo es la principal fuente de energía para las actividades humanas en la actualidad. Su utilización como tal y como materia prima para la producción de diversos compuestos genera uno de los mayores problemas ambientales que debe enfrentar el mundo actual. La mayoría de los componentes del petróleo son biodegradables, pero ésta degradación es relativamente lenta. En este sentido, un objetivo ecológico prioritario es el desarrollo de nuevas metodologías compatibles con el medio ambiente para la

remediación de ambientes contaminados [Juwarkar et al. (2010)]. Las capacidades de los microorganismos aeróbicos son particularmente relevantes para la biodegradación de dichos compuestos. La degradación completa de la mayoría de los hidrocarburos se produce en condiciones aeróbicas [Fritsche y Hofrichter (2005)]. En los últimos años, muchos estudios han probado la eficacia y la factibilidad del aprovechamiento de las capacidades metabólicas de los microorganismos (bacterias y hongos) en procesos de biodegradación de diferentes grupos de compuestos [Ponce et al. (2011), Navacharoen y Vangnai (2011)].

El fracaso de la biorremediación se puede atribuir a las condiciones ambientales desfavorables, ausencia de vías catabólicas apropiadas o biodisponibilidad del compuesto químico a degradar. Es por eso que se han desarrollado diferentes estrategias, como la aplicación de nutrientes y aireación (bioestimulación) [Nikolopoulou (2009)] y el agregado de degradadores apropiados (bioaugmentación) [Mrozik et al. (2010)]. El grado de biodisponibilidad es, en su mayoría, el que condiciona la eliminación de contaminantes del medio, es por eso que el uso de surfactantes, aumentaría la disponibilidad de los hidrocarburos.

Los biosurfactantes son compuestos producidos por diferentes géneros de bacterias y hongos. Son moléculas orgánicas tensioactivas producidas sobre superficies vivas, mayormente superficies de células microbianas o excretadas al medio, que facilitan la eliminación de las partículas adheridas al contaminante y dan lugar a un descenso significativo de la tensión superficial y/o interfacial. El uso de los mismos acelera los procesos de biorremediación de medio ambientes contaminados por hidrocarburos [Rodríguez et al. (2006)]. Diferentes estudios muestran los potenciales usos de los biosurfactantes en las industrias alimenticias, farmacéuticas [Nitschke y Costa

(2007)], petroquímicas, en agricultura, en cosmética [Williams (2009)] y en remediación de ambientes contaminados [Mulligan (2009)].

En términos de estructura química, los biosurfactantes se pueden dividir en diferentes grupos: glicolípidos, lipopéptidos, lipopolisacáridos, fosfolípidos y ácidos grasos o lípidos polares. Son moléculas anfipáticas, que contienen un dominio liposoluble y otro hidrosoluble. Esta solubilidad parcial permite al surfactante ocupar la interfase. Se ha visto que tanto la producción como las cantidades de biosurfactante obtenido están directamente ligadas a las condiciones de crecimiento, incluyendo: fuente de carbono, nutrientes (nitrógeno, fosfatos, hierro), pH, temperatura y aireación [Miller y Zhang (1997)]. Se han obtenido biosurfactantes que han sido utilizados en procesos de biorremediación u otros, incluyendo agentes terapéuticos, a partir de residuos agroindustriales como alternativa al uso de sustratos no renovables [Deleu y Paquot (2004)]. Los sustratos disponibles en la actualidad son una variedad de residuos orgánicos procedentes de la agricultura y las industrias relacionadas. Entre ellos se destaca el glicerol como fuente de carbono alternativa importante, porque la cantidad de este co-producto ha ido en aumento año tras año ligado principalmente a la producción de biodiesel [Liguori et al. (2013)].

Desde hace varias décadas, los residuos agroindustriales han sido foco de atención a nivel mundial, debido a que parte de sus constituyentes pueden ser materia prima para generar diversos productos de interés [Aburto et al. (2008)]. Además de la importancia económica que ello supone para la producción de productos con mayor valor agregado (enzimas, proteína unicelular, pigmentos, antibióticos, etc.), la utilización de co-productos agroindustriales tiene incidencia en la preservación del medio ambiente, al considerar el desarrollo de

tecnologías orientadas hacia una transformación sustentable de los recursos naturales [Aburto et al. (2008)]. La búsqueda de materias primas de bajo costo y fácil adquisición que puedan ser utilizados como sustratos fermentables (fuentes de C o N) constituye uno de los retos más interesantes de la biotecnología actual. A pesar de las ventajas y la potencial aplicabilidad de estos compuestos biológicos, el éxito de la producción de los biosurfactantes depende de la economía del proceso utilizado y el uso de materias primas de bajo costo (10-30% de los costes globales). También se plantea la necesidad de atender de una manera ambientalmente responsable, la disposición final de los residuos que ya no pueden ser reutilizados, tomando como base el marco regulatorio vigente, para evitar que se conviertan en contaminantes de suelos y aguas, incluidas las subterráneas [Chundawat et al. (2012)].

El objetivo de este trabajo es el desarrollo y optimización de un bioproceso para la obtención de biosurfactantes destinado al tratamiento biológico de suelos contaminados con hidrocarburos, con el fin diseñar procesos viables en costos, rendimientos y eficiencia. Se evaluarán trabajos de diseño de medio de cultivo a partir del uso de hidrocarburos y co-productos agroindustriales de la región. Se partirá de cepas microbianas aisladas de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos en la zona del polo petroquímico Zarate-Campana, Pcia. de Buenos Aires, específicamente en la Refinería RHASA [Liporace et al. (2012), Liporace et al. (2012)].

METODOLOGÍA

Toma de Muestra y Almacenamiento

Las muestras de suelo y agua fueron recolectadas con palas de mano de zonas crónicamente contami-

nadas con hidrocarburos del predio que la empresa RHASA (Campana) en frascos de 800cm³. Todas las muestras fueron debidamente rotuladas y almacenadas en heladera a 4°C.

Análisis Físicoquímico de las Muestras

El análisis fisicoquímico de las muestras obtenidas se realizó en el Centro de Investigaciones Toxicológicas S.A. de la ciudad de Buenos Aires. Se realizaron tres ensayos a las muestras: Hidrocarburos Totales (EPA 9071), Rango Orgánico de Gasolinas (GRO, EPA 8015) y Rango Orgánico de Diésel (DRO, EPA 8015).

Medios de Cultivo

Se utilizó un medio mínimo salino (MSM) [Shen et al. (1998)] cuya composición es: 4g de NaNO₃; 1,5g de KH₂PO₄; 0,5g de Na₂HPO₄; 0,0011g de FeSO₄·7H₂O; 0,2g de MgSO₄·7H₂O; 0,0132g de CaCl₂·2H₂O; 20g agar-agar (cultivo en medio sólido) por litro de solución. El pH del medio se ajustó a 7,00 ± 0,02.

Los sustratos utilizados fueron: una mezcla en partes iguales de tres hidrocarburos comerciales (HC): nafta super (RON95), diésel (<2000ppm de azufre) y kerosene (YPF S.A.). Además, se utilizó glicerol (en primera instancia de grado analítico, Sistemas Analíticos S.A., Biopack) y glucosa bacteriológica (Laboratorios Britania S.A.).

Para realizar los cultivos de activación para los ensayos, se utilizó caldo de lisogenia (LB).

Aislamiento y Selección de los Microorganismos

Las muestras obtenidas fueron cultivadas en Erlenmeyers, en medio de enriquecimiento (MSM + 4,5% HC) con el objetivo de seleccionar microorganismos

nativos productores de biosurfactantes. Estos fueron cultivados a 100 rpm y 25°C por 72 horas. Este proceso se repitió 8 veces. A partir de estos cultivos, se inocularon placas en MSM + HC sólido a 25°C por 6 días con el objetivo de obtener colonias aisladas.

Se evaluó la capacidad de producción de biosurfactantes de las colonias aisladas. Se estableció como criterio de selección la capacidad de un microorganismo para disminuir la tensión superficial del sobrenadante más de un 30% respecto del control. Los cultivos se llevaron a cabo en Erlenmeyers y se incubaron a 100rpm y 25°C por 10 días.

Estimación de Concentración de Biomasa

Se llevó a cabo a partir la medición del peso seco al cabo de 24 horas (CDW): se centrifugó la muestra a 13500 rpm a 19°C durante 15 minutos, se removió el sobrenadante y el pellet fue resuspendido con n-hexano para extraer restos de hidrocarburo (Chandankere et al. 2013). Luego, la suspensión fue trasvasada a un tubo eppendorf previamente pesado, y se centrifugó nuevamente. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue colocado en una estufa a 80°C durante 24 hs. En aquellos casos en los que no se utilizó HC como sustrato para los cultivos, el pellet fue resuspendido con agua destilada.

Estimación de la Producción de Biosurfactantes

La estimación de la producción de biosurfactantes se realizó por tres métodos, a saber: medición directa de la tensión superficial (ST) del sobrenadante de cultivo con un tensiómetro Attension Sigma Force Tensiometer 702 (Biolin Scientific Holding AB) por el método del anillo de Du Nouy [Walter et al. (2010); Youssef et al. (2004); Abouseoud et al. (2008)]. Se utili-

zaron 18ml de sobrenadante de cultivo centrifugado a 13500rpm y 19°C por 15 minutos. El control de cada medición fue el medio de cultivo suplementado con el sustrato correspondiente sin inocular cultivado en las mismas condiciones que la muestra. Además, se realizó un ensayo de distorsión óptica en policubeta (MPA), realizado según Walter et al. (2010), y un ensayo de capacidad emulsificadora (E24), de acuerdo a Cooper et al. (1987) con una ligera modificación. Además de kerosene se utilizó n-hexano, aceite comercial de girasol, diésel comercial (<2000ppm azufre) y nafta súper (RON 95) como fases orgánicas.

Identificación Genética de los Microorganismos

La identificación se realizó a partir de la extracción del material genético del microorganismo con el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega®). Este se utilizó como templado para una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 16s. Se utilizaron los primers 27F y 1492R (2µl de solución 10 µM, cada uno), 5µl de una solución buffer 15mM de MgCl₂, 5µl de solución 1mM de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), 0,5µl de solución 30mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA), 0,3µl de polimerasa Taq (5U/µl) y agua desionizada. El ciclo de PCR que se realizó fue: 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos, 72°C por 10 minutos y 10°C en el paso final. Luego, se purificó el material obtenido a partir del kit comercial AxyPrep PCR Clean-up Kit (Axygen Bioscience). Finalmente, se envió el material genético amplificado a la Unidad de Genómica del Servicio de Secuenciación del INTA Castelar.

Las secuencias fueron analizadas con el software BioEdit® y comparadas con las existentes en las bases de datos: EZ Taxon, RDP y SILVA.

Optimización del Medio de Cultivo

Ensayo en Erlenmeyer

Se ensayaron tres concentraciones de fuente de carbono y tres temperaturas de cultivo diferentes (2% v/v, 4,5%v/v y 6%v/v; 21°C, 25°C y 29°C respectivamente), y se analizó la capacidad de la cepa microbiana para crecer y producir compuesto tensioactivo en cada ensayo. Para ello, se realizó un precultivo en MSM suplementado con 4,5%v/v HC en un Erlenmeyer de 250ml con 25ml de volumen final durante 6 días a 25°C y 120rpm. Luego, se tomó una alícuota de este cultivo y se realizó una dilución con MSM hasta obtener un valor de densidad óptica a 600nm (DO) de $0,200 \pm 0,010$. Se utilizó 1 ml de esta solución como inóculo inicial. Para cada temperatura ensayada se utilizó MSM suplementado con 2%v/v, 4,5%v/v y 6%v/v HC como sustrato a 120rpm \pm 2rpm por 6 días. Cada conjunto de variables estudiadas fue realizado por duplicado. Se midió CDW, ST, MPA y pH (inicial y final) de cada cultivo.

Ensayo en Biorreactor

A partir de los resultados obtenidos, se evaluó el comportamiento del microorganismo a escala biorreactor de laboratorio (modelo BioFlo 115, New Brunswick Scientific Co.), con una capacidad de 3 litros. Los cultivos fueron realizados en Erlenmeyers de 250ml con 25ml de volumen final. Se utilizó MSM suplementado con 4,5%v/v de HC como sustrato. El cultivo se dispuso en un agitador orbital a 25°C y 120rpm por 6 días. Luego, una alícuota de este se diluyó en MSM hasta un valor de DO de $0,200 \pm 0,010$ y se utilizaron 45ml como inóculo para el biorreactor (volumen final 2000ml). El proceso se llevó a cabo durante 7 días a 25°C, 200rpm y un pH inicial de $7,10 \pm 0,1$,

utilizando 4,5%v/v HC como sustrato. Se tomaron muestras diarias y se midió CDW, pH, ST, E24 y MPA. Además, se midió el coeficiente global de transferencia de oxígeno (KLa) con el objetivo de evaluar la eficiencia del sistema respecto de la transferencia de materia. El KLa se midió a partir del método dinámico simple (Doran P. (2013)).

Ensayo de Inducción de Síntesis de Biosurfactantes

Se cultivó el microorganismo por 72h a 25°C y 135rpm en un Erlenmeyer con 60ml de medio LB. A partir de este, se realizó una dilución en agua destilada hasta una turbidez correspondiente a una solución 0,5 McFarland para su uso como inóculo de los cultivos.

Los cultivos con MSM suplementados con 20g/l de glucosa o 3%v/v de glicerol, como fuentes de carbono, fueron inoculados e incubados a 135rpm y 25°C por 48hs. Se tomaron muestras a las 0, 24 y 48 horas y se midió CDW, pH, ST y MPA. La biomasa producida a las 48hs se centrifugó a 3500rpm por 20 minutos, se retiró el sobrenadante de cultivo y se resuspendió el pellet con 10ml de agua destilada. La solución resultante se utilizó como inóculo para la siguiente etapa. Con esta solución se inocularon Erlenmeyers de 250ml con 125ml de MSM suplementado con 4,5%v/v de HC como única fuente de carbono y energía. Éstos se mantuvieron a 135rpm y 25°C por 72 horas. Se tomaron muestras a las 0, 24, 48 y 72 horas y se midió CDW, pH, ST y MPA. Se utilizó un MSM suplementado con glucosa, glicerol o 4,5%v/v de HC según corresponda, sin inocular como control para los ensayos.

ANOVA-Estadística

El análisis estadístico de los datos ha sido llevado a cabo a través del análisis de la varianza (ANOVA) y la diferencia significativa entre medias a través del test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Toma de Muestras y Análisis Físicoquímico

Se obtuvieron cinco muestras, cuatro de ellas de suelo correspondiente a sitios crónicamente contaminados con hidrocarburos de diversos sectores del predio de la empresa, y la restante, de agua de laguna situada en las inmediaciones de la empresa. Dos de las muestras de suelo fueron seleccionadas para llevar a cabo el análisis físicoquímico con el objetivo de conocer el tipo de hidrocarburos presentes en las mismas. Se detectó la presencia de hidrocarburos poli aromáticos (PAH's) y ácidos grasos. Esto se debe principalmente a que, cuando se produce un derrame o vuelco, los hidrocarburos de bajo peso molecular, bajo punto de ebullición y/o de baja hidrofobicidad, se remueven y/o dispersan rápidamente por métodos físicos, principalmente.

Aislamiento y Selección de los Microorganismos

A partir de las muestras se aislaron 13 colonias de microorganismos fenotípicamente diferentes. Estos se cultivaron para evaluar su potencial utilización en procesos de producción de biosurfactantes. Para estimar la capacidad de producción de tensioactivos se evaluó ST, E24 y MPA. Los resultados significativos se muestran en la Tabla 1 y en la Figura 1.

De las muestras ensayadas, 6 disminuyeron el valor de ST más de un 30% respecto del control, por lo que

Muestra	LgHC	MHC	CoHC	AgHC	Tk2HC	Tk1HCCC	Tk1HCCG	Control
ST	49,8	46,7	45,0	49,2	50,3	53,9	52,4	75,0
Desvío estándar	3,0	3,2	2,2	5,5	5,9	1,4	2,7	0,6
ΔST	33,7	37,7	39,9	34,4	32,9	28,2	30,2	0,0

Tabla 1. Medidas de tensión superficial de las muestras aisladas. Los valores se expresan en mN/m.

se continuó el estudio con éstas. El MPA respaldó estos resultados. Por otro lado, ninguna de las muestras ensayadas exhibió capacidad emulsificadora (E24 50%).

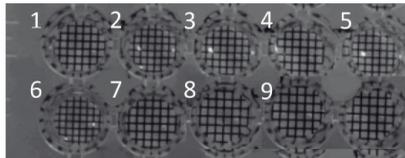


Figura 1. Resultados MPA. 1-Lg; 2-Mt; 3-Co; 4-Ag; 5-Tk2; 6-Tk1 CC; 7-Tk1 CG; 8 y 9-Agua destilada

Identificación Bacteriana Mediante Secuenciación del ARN Ribosomal 16S de las Colonias Aisladas

Respecto al análisis filogenético a partir de la secuenciación del ARNr16S, se obtuvieron secuencias de alrededor de 1400 nucleótidos y se las comparó con 3 bases de datos diferentes disponibles de forma on line. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Cepa	Género y Especie (% identidad)	Grupo al que pertenecería ¹
AgHC	<i>Pseudomonas koreensis</i> (99,3%)	<i>P. fluorescens</i>
MtHC	<i>Pseudomonas kunmingensis</i> (99,6%)	<i>P. oleovorans</i> o <i>P. stutzeri</i>
LgHC	<i>Pseudomonas veronii</i> (99,86%)	<i>P. fluorescens</i>
Tk1HCCG	<i>Pseudomonas panipatensis</i> (100%)	<i>P. aeruginosa</i>
Tk1HCCC	<i>Cellulosimicrobium funkei</i> (99,7%)	No corresponde

¹De acuerdo a Mulet et al. (2010).

Tabla 2. Resultados de la identificación de las cepas aisladas.

La muestra CoHC no pudo ser identificada. Esto podría deberse a que la muestra estaría formada por un consorcio de microorganismos y no por una cepa aislada.

De éstas, se seleccionó la cepa AgHC para su posterior estudio en cuanto a la optimización de medios de cultivos, ya que fue capaz de disminuir significativamente la tensión superficial en MSM con HC como fuente de carbono, manteniendo esta actividad invariable a lo largo del tiempo.

Optimización del Medio de Cultivo

Se ensayó el comportamiento de la cepa a partir de la estimación de la producción de biomasa y biosurfactantes en un ensayo a tres temperaturas (21°C, 25°C y 29°C) y tres concentraciones de fuente de carbono (2%v/v, 4,5%v/v y 6%v/v).

Temp.	[HC]		
	2%	4,5%	6%
21°C	0,89	6,44	6,64
25°C	-0,23	7,92	10,16
29°C	3,40	7,25	7,38

Tabla 3. Disminución de tensión superficial (mN/m) obtenida para cada condición ensayada.

Temp.	[HC]		
	2%	4,5%	6%
21°C	0,100	0,243	0,383
25°C	0,107	0,184	0,303
29°C	0,232	0,472	0,486

Tabla 4. Concentración de biomasa (CDW) obtenida, en g/l, para cada condición ensayada.

En la Tabla 3 se observa que la mayor disminución en el valor de ST se produjo a 25°C y 6% HC, desde 48,44mN/m ± 0,03mN/m hasta 38,29mN/m ± 0,15mN/m. Además, se observó una correlación entre el aumento de la concentración de sustrato y la disminución del valor de ST a cada una de las temperaturas. Esto podría atribuirse a que los hidrocarburos disueltos en solución normalmente modifican la ST del solvente y/o al hecho de que el microorganismo requiere de mayor cantidad de tensioactivo para consumir el sustrato disponible en el medio.

Por otro lado, se observó crecimiento del microorganismo a todas las concentraciones y temperaturas ensayadas, teniendo un valor máximo a 29°C y 6%v/v HC de 0,486g/l \pm 0,008g/l (Tabla 4). Nuevamente, se observó un perfil creciente de concentración de biomasa respecto de la concentración de HC a cada temperatura ensayada, por lo que, dentro de este rango, no se observó inhibición del crecimiento debida a exceso de sustrato.

Ensayo en Biorreactor

A partir de los resultados previos, se evaluó el comportamiento del microorganismo a escala biorreactor de laboratorio. El cultivo se llevó a cabo isotérmicamente con 6%v/v HC, durante 7 días. Se monitoreó el pH (tomó valores desde $7,00 \pm 0,02$ hasta $8,26 \pm 0,05$), temperatura (25°C), velocidad de agitación (200rpm \pm 1 rpm) y oxígeno disuelto (se observó una disminución a lo largo del proceso hasta un 90% del valor inicial). Además, como se muestra en la Figura 2, se tomaron muestras diarias para el monitoreo del proceso a partir de la medición de CDW y ST. También, se midió el coeficiente global de transferencia de oxígeno del sistema (KLa).

En la Figura 2 se observa un perfil de concentración de biomasa típico para un microorganismo creciendo en un cultivo discontinuo. Se observa una fase de latencia de 1 día, una fase exponencial de 3 días y una fase estacionaria hasta el final del cultivo. El valor máximo obtenido fue de 0,698g/l. Con respecto al valor de ST, se observó una leve disminución hasta el día 2 (de $42,23\text{mN/m} \pm 0,03\text{mN/m}$ hasta $41,25\text{mN/m} \pm 0,11\text{mN/m}$) seguido de un aumento progresivo hasta un valor final de $45,71\text{mN/m} \pm 0,08\text{mN/m}$ (mayor al inicial y al del control).

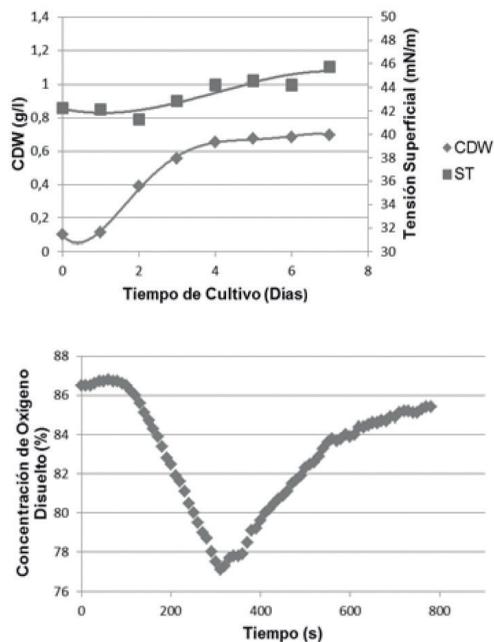


Figura 2. Izquierda: ST y concentración de biomasa en función del tiempo de cultivo. Derecha: variación de la concentración de oxígeno disuelto a lo largo del proceso de medición del KLa.

Por último, se midió el valor del coeficiente global de transferencia de oxígeno del sistema utilizado. La medición se llevó a cabo a través del método dinámico de estimación del KLa, y el valor obtenido fue 0,0085s⁻¹.

Ensayo de Inducción de Síntesis de Biosurfactantes

A partir de los resultados obtenidos, se llevaron a cabo estudios de inducción de producción de biosurfactantes. Los mismos se realizaron en dos etapas: primeramente, una etapa de crecimiento en una fuente de carbono de asimilación simple (glucosa o glicerol) para un crecimiento rápido. Luego, en una segunda etapa, se transfirió dicha biomasa a un medio con 4,5%v/v HC como único sustrato para inducir la producción de biosurfactantes. El ensayo completo se condujo por 6 días (1ra etapa: 2 días; 2da etapa: 4

días) a 25°C y 135rpm. Los resultados obtenidos en la primera etapa se observan en la Figura 3.

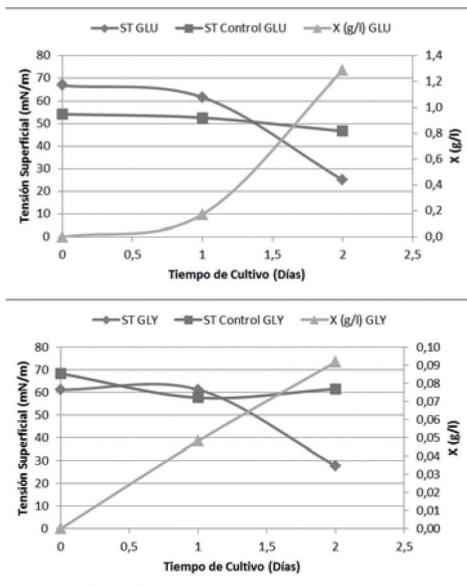


Figura 3. Resultados de la primera etapa de cultivo.

En esta etapa se observó que el microorganismo posee capacidad para crecer en ambas fuentes de carbono. Cuando se utilizó glucosa, la bacteria alcanzó, a las 48hs, una concentración de $1,29\text{g/l} \pm 0,06\text{g/l}$, 3 veces mayor a la obtenida con HC y en un tercio del tiempo de cultivo. Además, en ninguno de los dos casos se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento, lo que sugiere que se podría continuar con el cultivo si se quisiera alcanzar una concentración de biomasa mayor, o se podría utilizar menor concentración de sustrato con el objetivo de reducir costos de proceso.

Por otro lado, se observa una disminución significativa en el valor de la tensión superficial del sobrenadante de cultivo entre el día 1 y 2 respecto del control, para cada uno de los sustratos. A las 48hs de cultivo se obtuvieron valores de tensión superficial de $25,10\text{mN/m} \pm 0,54\text{mN/m}$ y $27,84\text{mN/m} \pm 0,39\text{mN/m}$,

para el cultivo con glucosa y glicerol respectivamente. Esto representa una disminución del 46,3% y 54,7% respecto de cada uno de los controles. Además, resulta una mejora sustancial respecto de los cultivos en los que se utilizó HC como fuente de carbono. En esta primera etapa se obtuvieron mejores resultados en comparación con bibliografía consultada (Abouseoud et al. 2008). En la Figura 4 se observan los resultados de la segunda etapa del ensayo. Aquí también se observó crecimiento del microorganismo hasta valores de $0,43\text{g/l} \pm 0,07\text{g/l}$ y $0,35\text{g/l} \pm 0,06\text{g/l}$ con glucosa y glicerol en la primera etapa respectivamente. Estos resultados muestran un aumento en la concentración de biomasa respecto de la obtenida para el cultivo en las mismas condiciones suplementado únicamente con HC ($0,184\text{g/l} \pm 0,027\text{g/l}$).

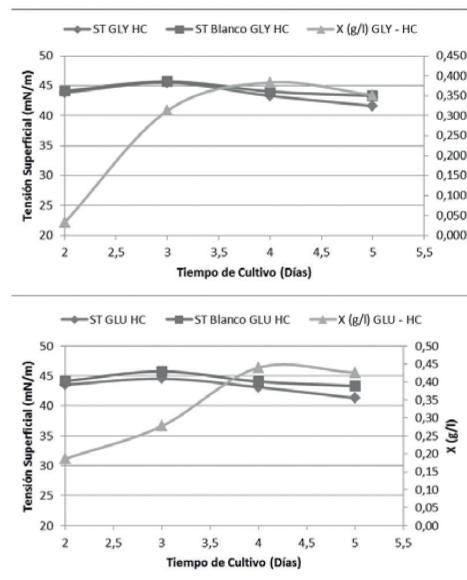


Figura 4. Resultados de la segunda etapa de cultivo.

En cuanto a la medición de ST, el valor se mantuvo cercano al del control durante todo el experimento. Al final, día 2 y 3 de esta etapa, se observó una pequeña

disminución, alcanzando valores de $41,29\text{mN/m} \pm 0,61\text{mN/m}$ y $41,65\text{mN/m} \pm 0,90\text{mN/m}$, con glucosa-HC y glicerol-HC respectivamente. La disminución en el valor de la ST obtenida resultó despreciable frente a la esperada. Esta falta de actividad tensioactiva sugeriría que el microorganismo no estaría produciendo biosurfactantes durante su cultivo en HC.

CONCLUSIONES

Se aislaron 13 cepas de microorganismos capaces de degradar hidrocarburos como única fuente de carbono y energía. De ellas, seis poseen buena actividad tensioactiva, a partir de su capacidad de disminución de la tensión superficial. De estos microorganismos, cuatro pertenecen al género *Pseudomonas* sp., uno al género *Cellulosimicrobium* sp. y el restante no se pudo identificar hasta el momento.

Se estudió el comportamiento de la cepa identificada

como AgHC bajo distintas condiciones y se observó que fue capaz de crecer en el rango de concentraciones de HC y de temperaturas bajo análisis, logrando valores de concentración de biomasa de $0,486\text{g/l}$ a 29°C y 6% HC y disminución de ST de $10,16\text{mN/m}$ respecto del control. Además, fue capaz de crecer cuando se cultivó a escala biorreactor de laboratorio ($0,698\text{g/l}$). Pero cuando este fue el caso, no se observó una disminución significativa en la ST del cultivo respecto del control.

Debido a esto último, se ideó una estrategia de cultivo con el objetivo de inducir la producción de compuestos tensioactivos. En este caso, AgHC fue capaz de crecer utilizando glucosa, glicerol y HC, y exhibió una muy buena actividad tensioactiva cuando creció utilizando los dos primeros.

En base a lo observado, la cepa AgHC poseería un alto potencial para su utilización en la producción de biosurfactantes utilizando principalmente co-productos de industrias de la zona.

REFERENCIAS

Araruna JT. et. al. (2004). *Oil spills debris clean up by thermal desorption. Journal of Hazardous Materials.* 1-3: 161-171.

Juwarkar AA, SinghSK, Mudhoo A. (2010) *A comprehensive overview of elements in bioremediation. Reviews in Environmental Science and Technology.* 9: 215-288.

Wolfgang Fritsche and Martin Hofrichter. (2005) *Aerobic Degradation of Recalcitrant Organic Compounds*

by Microorganisms. Environmental Biotechnology. Concepts and Applications. 3-527-30585-8.

Ponce BL. et al (2011). *Antioxidant compounds improved PCB-degradation by Burkholderia xenovorans strain LB400. Enzyme and Microbial Technology,* 49: 509-516.

Navacharoen A, Vangnai AS. (2011) *Biodegradation of diethyl phtalate by an organic-solvent-tolerant Bacillus*

- subtilis* strain 3C3 and effect of phthalate ester coexistence. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 65: 818-826.
- Nikolopoulou M, Kalogerakis N. (2009) Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons. *J. Chem. Tech. Biotech.* 84(6): 802-807.
- Mrozik A. et al. (2010) Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiol. Research*. 165(5): 363-375.
- Rodrigues L. et al. (2006) Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemotherapy*.
- Nitschke M, Costa SGVAO. (2007) Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science and Technology*. 18: 252-259.
- Williams K. (2009) Biosurfactants for cosmetic applications: Overcoming production challenges. *MMG 445 Basic Biotechnology*. 5: 78-83.
- Mulligan C. (2009) Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 14: 372-378.
- Miller R. and Zhang Y. (1997). Measurement of biosurfactant-enhanced solubilization and biodegradation of hydrocarbons. *Bioremediation Protocols*. 2, 59-66.
- Deleu, M.; Paquot, M. (2004) From renewable vegetables resources to Microorganisms: new trends in surfactants. *Comptes Rendus Chimie*, 2004 7(6-7): 641-646.
- Liguori, R.; Amore, A.; Faraco, V. (2013) Waste valorization by biotechnological conversion into added value products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 6129-6147.
- Aburto, J. et al. (2008) Evaluación técnico-económica de la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. *Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ)* 2008, 23(1): 23-30.
- Chundawat S, Beckham G, Himmel M, Dale B. (2012) Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2:121-145
- Liporace, F. et al. (2012). Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes presentes en suelos crónicamente contaminados de una destilería de petróleo. *SaProBio: 2º Simposio Argentino de Procesos Biotechnológicos. Prof. Dr. Rodolfo J.J. Ertola*.
- Liporace, F. et al. (2012) Isolation of biosurfactant-producing microorganisms at the petrochemical area of Campana. *Biocell 2012, Vol. 36 pag: 97*.
- Shen, Y., Stehmeier, L., Voordouw, G. (1998). Identification of hydrocarbon-degrading bacteria in soil by reverse simple genome probing. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2): 637-645.
- Chandankere, R, Yao, J., Choi, M., Masakorala, K., Chan, Y. (2013). An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylo-trophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir. *Biochem. Eng. J.* 74: 46-53.
- Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S., Nabi, A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*. 223: 143-151.
- Walter, V., Sylatk, C., Hausmann, R. (2010). Capítulo 1. En: *Biosurfactants*. Austin: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC.
- Cooper, D., Goldenberg, B. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2: 224-229.
- Doran, P. (2013). *Bioprocess Engineering Principles*. Waltham, MA: Elsevier Ltd.
- Mulet, M., Lalucat, J., García-Valdés. E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* 12(6): 1513-1530.