

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS PARA EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES CONTAMINADOS CON FURFURAL

Echeverría, Macarena Celeste^(a), Sandoval, Evangelina^(b), Gauto, Víctor Hugo^(a), Benimeli, Claudia Susana^(b,c).

^(a)Grupo de Investigación Sobre Temas Ambientales y Químicos (GISTAQ), Facultad Regional Resistencia, Universidad Tecnológica Nacional, Resistencia, Chaco, Argentina. macarenacecheverria@gmail.com

victor.gauto@outlook.com

^(b)Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos (PROIMI-CONICET), San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. sandovalevangelina30@gmail.com

^(c)Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Catamarca, San Fernando del Valle de Catamarca, Catamarca, Argentina. cbenimeli@yahoo.com.ar

Resumen

El furfural es un aldehído heterocíclico, con variadas aplicaciones en la industria química. A pesar de los beneficios que posee su uso y producción, el aldehído se convierte en un componente tóxico importante en las aguas residuales si es liberado al medio ambiente sin un tratamiento adecuado (Lei y col., 2022; Rashtbari y col., 2022). Los cultivos inmovilizados en biopelículas representan una herramienta biológica eficiente para la eliminación de contaminantes en los procesos de biorremediación (Isaac y col., 2017). En el presente trabajo se evaluó la capacidad de formación de biopelículas por las cepas de actinobacterias *Nocardiopsis* sp. L9 y *Streptomyces* sp. A12 y M7, en cultivos mixtos y puros, sobre esponja vegetal, y la eficiencia de dichas biopelículas para la remoción de furfural en un efluente simulado. Como resultado se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la actividad enzimática hidrólisis de FDA entre el soporte de esponja vegetal estéril (sin colonizar) y los tratamientos con esponja colonizada por las cepas puras y en consorcio, indicando la actividad biológica del biofilm. El análisis por microscopía electrónica de barrido confirmó un elevado desarrollo bacteriano adherido a la superficie de la esponja vegetal con presencia de posibles sustancias poliméricas extracelulares. Durante el proceso de biorremediación del efluente simulado contaminado con furfural ($831 \pm 23 \text{ mg l}^{-1}$), se observaron concentraciones residuales nulas al tercer día de tratamiento, al utilizar el biofilm formado por el cultivo mixto de las actinobacterias *Nocardiopsis* sp. L9 y *Streptomyces* sp. A12 y M7. Los resultados obtenidos sugieren que dichas biopelículas representan una herramienta de biorremediación prometedora para el tratamiento de efluentes que contienen furfural.

Palabras claves: Furfural, Biopelícula, Biorremediación.

Introducción

El furfural se utiliza a gran escala en refinerías de petróleo, industrias petroquímicas, papel y cartón y está presente en sus aguas residuales en una proporción limitada de entre 100 y 1.200 mg l^{-1} (Rashtbari y col., 2022). Este compuesto es considerado un inhibidor de los sistemas biológicos, ya que daña a los microorganismos al reducir las actividades enzimáticas y biológicas, descomponer el ADN e inhibir la síntesis de proteínas y ARN, provocando efectos tóxicos en los sistemas vivos, si es liberado al medio ambiente sin un tratamiento adecuado (Lei y col., 2022; Rashtbari y col., 2022).

Las biopelículas constituyen un modo de crecimiento que permite a los microorganismos sobrevivir, aún en ambientes hostiles, siendo sus fenotipos, fisiología y comportamiento significativamente diferentes a los de sus contrapartes planctónicas (Sonawane y col., 2022). Su mayor nivel de tolerancia a los contaminantes y al estrés ambiental les permite

mayor capacidad para degradar una serie de sustancias tóxicas a través de diversas vías catabólicas, removiendo con éxito los contaminantes del suelo y de sistemas líquidos (Biswal y Malik, 2022).

La formación de biopelículas sobre soportes naturales, orgánicos y biocompatibles se utiliza ampliamente en los procesos de biorremediación (Dzionic y col., 2016). Entre estos soportes naturales, se presta especial atención al grupo de materiales vegetales lignocelulósicos. Uno de ellos es la esponja vegetal derivada de la fruta madura y seca de *Luffa aegyptiaca*. Esta esponja está compuesta por una red abierta de fibras que forman el esqueleto del fruto. Diversos autores informan el uso de esponja vegetal (*Luffa aegyptiaca*) como matriz de soporte efectiva para el desarrollo de biopelículas microbianas debido a su alto grado de porosidad, bajo peso específico, propiedades físicas estables, resistencia mecánica, no toxicidad y bajo costo (Dzionic y col., 2020).

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de formación de biopelículas por las cepas de actinobacterias *Nocardiopsis* sp. L9 y *Streptomyces* sp. A12 y M7, en cultivos mixtos y puros, sobre esponja vegetal, y la eficiencia de dichas biopelículas para remover furfural en un efluente líquido simulado.

Materiales y Métodos

Para la preparación del soporte vegetal se cortaron cubos de esponja de aproximadamente 0,1 g. Los cubos obtenidos se sumergieron en agua hirviendo durante 30 min, se lavaron minuciosamente con agua destilada, se secaron en horno a 70°C y se almacenaron en desecador. Posteriormente se esterilizaron en autoclave (121 °C; 1,2 atm).

Se realizaron precultivos planctónicos individuales de las actinobacterias *Nocardiopsis* sp. L9 y *Streptomyces* sp. A12 y M7, a 30°C durante 72h, con agitación de 300 rpm, en medio TSB, con un sistema compuesto por un resorte de acero inoxidable en el interior de los matraces Erlenmeyer para evitar la formación de flóculos, característicos del crecimiento de algunos géneros de actinobacterias. Posteriormente se realizaron suspensiones bacterianas de las cepas puras y en consorcio en medio TSB fresco para alcanzar una $D_{540 \text{ nm}} = 1$, para lo cual se utilizaron 240 μL de precultivo y 1 ml de TSB. Para determinar la influencia del furfural sobre la formación de biofilm, las suspensiones bacterianas se prepararon en ausencia (SF) y en presencia (CF) de 800 mg l^{-1} de furfural.

El desarrollo de biopelículas se realizó en Erlenmeyers de 250 ml, que contenían aproximadamente 0,5 g de esponja (5 cubos) y 60 ml de la suspensión bacteriana. Los erlenmeyers se incubaron a 30 °C con agitación suave (100rpm). Después de 96 h de incubación, los cubos de esponja colonizados se enjuagaron con

solución de NaCl (0,9 %) para eliminar los microorganismos no unidos.

Para verificar la calidad del biofilm formado sobre el soporte, se evaluó su estado fisiológico mediante la determinación de su capacidad para hidrolizar diacetato de fluoresceína (FDA) por esterases inespecíficas producidas por células bacterianas vivas (actividad enzimática total). La medición se realizó añadiendo 1 cubo de esponja colonizada a 8 ml de tampón de fosfato (g l^{-1} : 8 NaCl; 0,2 KCl; 1,5 Na_2HPO_4 ; 0,2 K_2HPO_4 ; pH 7,4), se incubó durante 15 min en agitador orbital (130 rpm, 30°C). Posteriormente, se inyectaron de forma lenta 0,1 ml de FDA ($4,8 \text{ mmol l}^{-1}$) directamente en el centro del soporte, se incubó en oscuridad en agitador orbital (130 rpm, 30 °C) durante 1 h. La intensidad de la fluorescencia en el líquido se midió espectrofotométricamente a 490 nm. La concentración de fluoresceína liberada se calculó sobre la base de una curva estándar. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se utilizó esponja vegetal estéril como control abiótico.

La estructura del biofilm formado sobre esponja vegetal se observó mediante microscopio electrónico de barrido JEOL 5800LV, con digitalizador Gatan modo 788 y equipo de secado a punto crítico Denton Vacuum; perteneciente a la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE). Para la fijación y preparación de las muestras se empleó la técnica descrita por (Salgado y Galíndez, 2023).

Para los ensayos de remoción de furfural utilizando el biofilm desarrollado sobre esponja vegetal, se trabajó en matraces Erlenmeyer color caramelo de 150 ml, en los que se colocaron 30 ml de efluente simulado ($831 \pm 23 \text{ mg l}^{-1}$ de furfural) y 3 cubos de esponja vegetal colonizada. Se trabajó con sistemas formados por 3 cubos colonizados, cada uno con una cepa pura de actinobacteria (M7-A12-L9) o bien, 3 cubos colonizados con el cultivo mixto de las actinobacterias (Cons), en presencia o ausencia del contaminante. Se incubó a 30°C con agitación (130 rpm). Se incluyeron controles abióticos con esponja vegetal estéril para determinar la pérdida de furfural por adsorción a dicho soporte.

La cuantificación de furfural se realizó mediante HPLC, empleando un equipo Shimadzu CBM 20A, que cuenta con un detector UV SPD 20, se trabajó a 278 nm de longitud de onda, utilizando una columna de fase inversa C18, a 40°C de temperatura, con una velocidad de flujo de 1 ml min^{-1} , un volumen de inyección de 20 μl y una mezcla de acetonitrilo-agua (17,5:82,5) como fase móvil. Se tomaron muestras de los cultivos al inicio (T0), y a los 1, 3, 5, 7 y 10 días (T1, T3, T5, T7 y T10, respectivamente) de tratamiento.

Resultados

Al evaluar la actividad de hidrólisis de FDA, los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el blanco (esponja estéril sin colonizar) y los tratamientos con esponja colonizada por las cepas *Nocardioopsis* sp. L9 y *Streptomyces* sp. A12 y M7 puras y en consorcio, indicando que las mismas se encuentran biológicamente activas en el biofilm (Figura 1).

El análisis por microscopía electrónica de barrido, a una ampliación de 1500X, permitió observar un elevado desarrollo bacteriano adherido a la superficie de la esponja vegetal con presencia de posibles sustancias poliméricas extracelulares características de la estructura del biofilm (Figura 2). No se observaron diferencias entre las estructuras bacterianas desarrolladas en presencia y en ausencia de furfural.

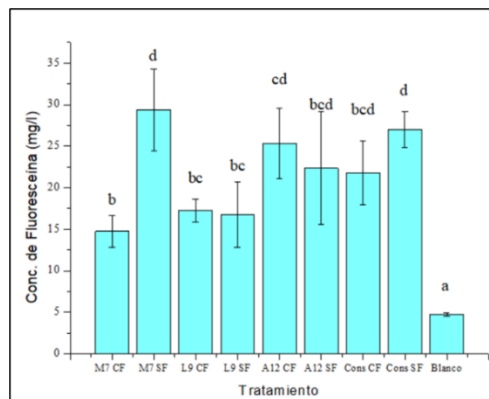


Figura 1.- Medida de la actividad enzimática FDA. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

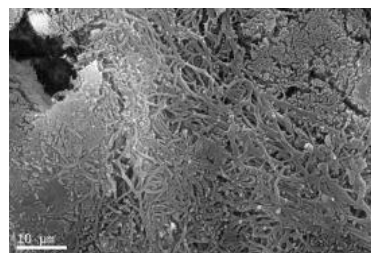


Figura 2.- Desarrollo de biofilm adherido a la superficie de esponja vegetal

Durante el proceso de biorremediación del efluente simulado contaminado con furfural ($831 \pm 23 \text{ mg l}^{-1}$) se observaron concentraciones de furfural residual nulas al tercer día de tratamiento cuando se trabajó con biopelículas formadas en ausencia del contaminante (SF) (Figura 3).

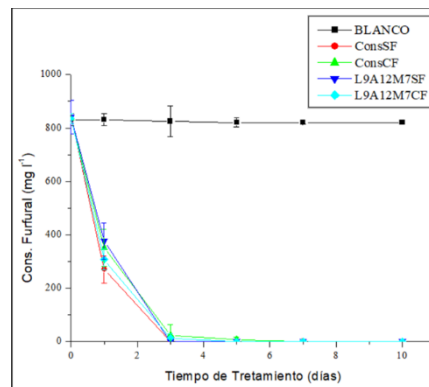


Figura 3.- Remoción de furfural durante los tratamientos con biopelículas formadas sobre esponja vegetal.

Conclusiones

Los resultados obtenidos sugieren que el biofilm formado por el cultivo mixto de *Nocardioopsis* sp. L9 y *Streptomyces* sp. A12 y M7, sobre esponja vegetal, representa una herramienta de biorremediación prometedora para el tratamiento de efluentes que contienen furfural.

Referencias Bibliográficas

- Biswal, T., Malik, J.A. (2022). "Role of biofilms in bioremediation". In *Microbes and Microbial Biotechnology for Green Remediation* (pp. 205-225).
- Dzionek, A., Wojcieszynska, D. and Guzik, U. (2016). "Natural carriers in bioremediation: A review". *Electronic Journal of Biotechnology*, 23, 28-36.

Dziona, A., Wojcieszńska, D., Adamczyk, M.H., Guzik, U. (2020). "Enhanced Degradation of Naproxen by Immobilization of *Bacillus thuringiensis* B1 (2015b) on Loofah Sponge". *Molecules*, 25, 872.

Isaac, P., Alessandrello, M.J., Macedo, A.J., Estévez, M.C. and Ferrero, M.A. (2017). "Pre-exposition to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) enhance biofilm formation and hydrocarbon removal by native multi-species consortium". *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(2), 1372–1378.

Lei, T., Liu, Y. and Yang, J. (2022). "Removal of furfural in wastewater by Al-MIL-53 prepared in various solvents". *Inorganic Chemistry Communications*, 140, 109405.

Rashtbari, Y., Sher, F., Afshin, S., Hamzadeh, A., Ahmadi, S., Azhar, O. and Poureshgh, Y. (2022). "Green synthesis of zero-valent iron nanoparticles and loading effect on activated carbon for furfural adsorption". *Chemosphere*, 287, 132114.

Salgado, C.R., Galíndez, M.C. (2023). "Fast and simple biological sample preparation and observation procedure for scanning electron microscopy". *Acta Microscópica*, 32(1), 13-26.

Sonawane, J.M., Rai, A.K., Sharma, M., Tripathi, M. and Prasad, R. (2022). "Microbial biofilms: Recent advances and progress in environmental bioremediation". *Science of The Total Environment*, 153843.