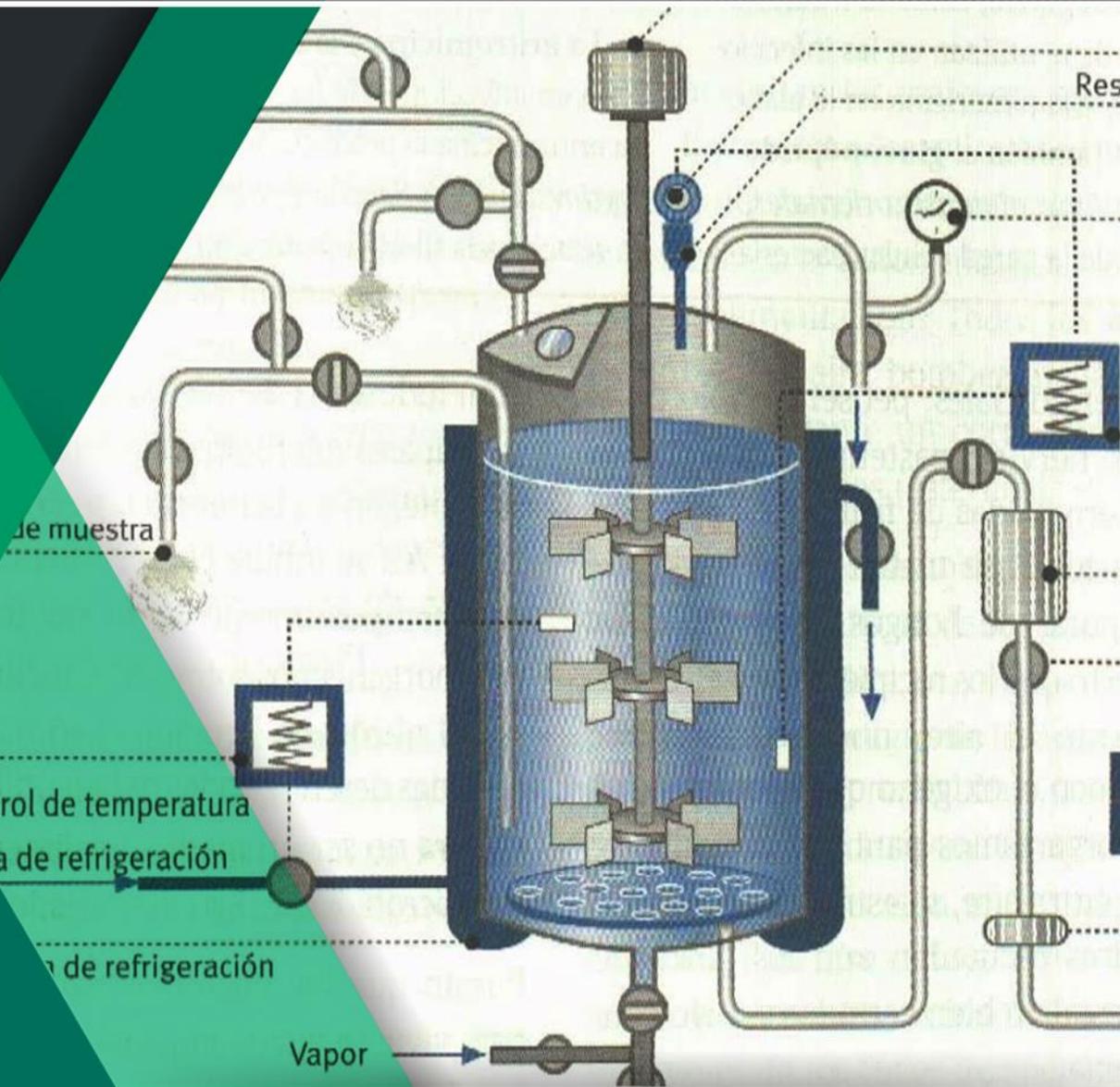




PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES PARA SU APLICACIÓN EN BIORREMEDIACIÓN DE SITIOS CRÓNICAMENTE CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS



Directora:

Dra. Carla Verónica Quevedo

Co-Directora:

Dra. Ana María Giulietti

Autor:

Mg. Ing. Franco A. Liporace

TESIS DOCTORAL

Doctorado en Ingeniería
Mención Tecnologías Químicas

*“... I'm not your son, you're not my father
We're just two grown men saying goodbye
No need to forgive, no need to forget
I know your mistakes and you know mine
And while you're sleeping I'll try to make you proud
So, daddy, won't you just close your eyes?
Don't be afraid, it's my turn
To chase the monsters away ...”*

Fragmento de “Monsters”, canción de James Blunt

A mi papá, Carlos A. Liporace (1950-2021)

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, la Dra. Carla Quevedo, por su dedicación y aportes en este trabajo, por sus contribuciones, consejos y su apoyo constante.

A la Dra. Ana María Giulietti por haber orientado y acompañado este trabajo de investigación.

A la Dra. Débora Conde Molina por compartir el trabajo en el laboratorio durante estos años.

A mis colegas y amigos del Laboratorio de Optoelectrónica y Metrología Aplicada de la Facultad Regional Delta, por su apoyo y acompañamiento en todo el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Susana Vázquez por su valiosa colaboración en la identificación genética que se llevó a cabo en esta tesis.

A la Facultad Regional Delta (UTN) por haberme formado como ingeniero, docente y persona, y por confiar en mí para participar en el desarrollo del Laboratorio de Biotecnología (hoy Grupo de Nanotecnología y Biotecnología Aplicada).

A la empresa Pobater S.A. (ex RHASA), por vincularse con la Facultad Regional Delta en la generación de conocimientos que permitan mejorar la calidad de vida de la comunidad de Campana.

Al Ing. Juan A. Olivera por sus charlas diarias, sus mates y sus consejos. Se te extraña constantemente. Te llevo siempre en mi corazón.

A mis padres, Carlos y Graciela, porque su esfuerzo y apoyo firme es parte fundamental de cada uno de mis logros, sin ellos no podría haber llegado a ser quien soy.

A mis hermanos, Fabricio y Fiamma, por estar acompañandome siempre, por su apoyo y aliento.

A mis hijos, Vicente, Ciro, Naiara y Sofía, porque son la luz de mis ojos, lo más importante que me dio la vida.

A mi esposa Paola, el amor de mi vida, por acompañarme, aconsejarme, guiarme y por su contribución con el diseño gráfico del presente manuscrito. Tu presencia siempre saca una sonrisa a los que te rodean, compartir mi vida con vos me hace inmensamente feliz. Te amo hasta el infinito.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	5
ÍNDICE.....	7
ÍNDICE DE TABLAS	11
ÍNDICE DE FIGURAS	13
LISTADO DE ABREVIACIONES.....	17
RESUMEN	19
ABSTRACT	21
INTRODUCCIÓN.....	23
1.1.- PROBLEMÁTICA AMBIENTAL PETROLERA	25
1.1.1.- EL PETRÓLEO COMO FUENTE DE ENERGÍA	25
1.1.2.- FUENTES DE ENERGÍA NO RENOVABLES	27
1.1.3.- INCONVENIENTES AMBIENTALES SURGIDOS DE LA UTILIZACIÓN DE PETRÓLEO Y SUS DERIVADOS	28
1.2.- HIDROCARBUROS.....	30
1.2.1.- HIDROCARBUROS POLIAROMÁTICOS.....	31
1.3.- REMEDIACIÓN DE SITIOS CONTAMINADOS CON PETRÓLEO Y SUS DERIVADOS	32
1.3.1.- ESTRATEGIAS DE REMEDIACIÓN.....	33
1.3.2.- REMEDIACIÓN <i>IN SITU</i> Y <i>EX SITU</i>	34
1.3.3.- PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN.....	34
1.3.3.1.- <i>Bioaumentación</i>	35
1.3.3.2.- <i>Bioestimulación</i>	36
1.3.4.- MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE HPA.....	37
1.3.5.- BIODEGRADACIÓN DE HPA: FACTORES QUE AFECTAN AL PROCESO	40
1.3.5.1.- <i>Temperatura</i>	41
1.3.5.2.- <i>pH</i>	41
1.3.5.3.- <i>Nutrientes</i>	41
1.3.5.4.- <i>Oxígeno</i>	42
1.3.5.5.- <i>Biodisponibilidad</i>	42
1.4.- BIOSURFACTANTES	43
1.4.1.- CARACTERÍSTICAS Y APLICACIONES DE LOS BIOSURFACTANTES.....	44
1.4.2.- ESTRUCTURA, CLASIFICACIÓN Y MODO DE ACCIÓN DE LOS BIOSURFACTANTES	45
1.5.- EMPLEO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES.....	49
1.6.- PROBLEMÁTICA REGIONAL	50
HIPOTESIS.....	53

2.1.- HIPÓTESIS	55
OBJETIVOS	57
3.1.- OBJETIVO GENERAL	59
MATERIALES Y MÉTODOS	61
4.1.- ÁREA DE ESTUDIO	63
4.1.1.- MUESTRAS.....	63
4.1.2.- ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DE LAS MUESTRAS	65
4.2.- MEDIOS DE CULTIVO	65
4.3.- TÉCNICAS ANALÍTICAS	66
4.3.1.- MEDICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y pH.....	66
4.3.2.- MEDICIÓN DEL K_{LA}	66
4.3.2.- MEDICIÓN DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO.....	68
4.5.- AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS	68
4.5.1.- MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS AISLADAS: CRIOPRESERVACIÓN.....	69
4.5.2.- SELECCIÓN DE CEPAS CON PODER TENSIOACTIVO	69
4.6.- IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS MICROORGANISMOS.....	69
4.6.1.- TINCIÓN DE GRAM	69
4.6.2.- IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.....	70
4.6.3.- SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS	70
4.6.4.- IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE LOS MICROORGANISMOS	70
4.7.- ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES CON LAS CEPAS AISLADAS.....	71
4.7.1.- PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES A ESCALA ERLLENMEYER UTILIZANDO HC Y AGLAG COMO SUSTRATOS	71
4.7.2.- POTENCIAL PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES CON $AGHC$ A ESCALA ERLLENMEYER	71
4.7.3.- POTENCIAL PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES A ESCALA BIORREACTOR DE LABORATORIO.....	72
4.7.4.- ESTIMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES	72
4.7.5.- TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN DE BIOSURFACTANTES.....	73
4.8.- EVALUACIÓN DE FUENTES DE CARBONO ALTERNATIVAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES.....	73
4.8.1.- MEDIO DE CULTIVO SUPLEMENTADO CON GLUCOSA Y GLICEROL.....	73
4.8.2.- EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES UTILIZANDO GLICEROL COMO FUENTE DE CARBONO	74
4.8.2.1- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA (CMC).....	74

4.9- OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES.....	75
4.9.1.- CONCENTRACIÓN DE FUENTE DE CARBONO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN.....	75
4.9.2.- CONCENTRACIÓN DE FUENTE DE NITRÓGENO Y FÓSFORO	77
4.9.3.- EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DE GLICEROL CLARIFICADO DE LA INDUSTRIA DEL BIODIESEL.	79
4.10.- ANÁLISIS POR HPLC	80
4.11.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	80
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
5.1.- ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE SUELO	83
5.2.- AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS	83
5.3.- IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS MICROORGANISMOS.....	86
5.3.1.- TINCIÓN DE GRAM	86
5.3.2.- IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA	86
5.3.3.- IDENTIFICACIÓN GENÉTICA	88
5.4.- SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS POTENCIALMENTE PRODUCTORES DE BIOSURFACTANTES	89
5.5.- RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	90
5.6.- PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES CON <i>PSEUDOMONAS SP. AG HC</i> A ESCALA ERLNMEYER	91
5.7.- EVALUACIÓN DE FUENTES DE CARBONO ALTERNATIVAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES: GLUCOSA Y GLICEROL.....	97
5.8.- EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES UTILIZANDO GLICEROL COMO FUENTE DE CARBONO.....	101
5.9.- OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE <i>PSEUDOMONAS SP. AG HC</i>	103
5.9.1.- CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO Y TEMPERATURA	103
5.9.2.- CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y FÓSFORO	110
5.10.- EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DE GLICEROL CLARIFICADO DE LA INDUSTRIA DEL BIODIESEL.....	118
5.11.- ANÁLISIS POR HPLC	119
CONCLUSIONES	121
6.- CONCLUSIONES.....	123
TRABAJO A FUTURO	125
7.- TRABAJO A FUTURO	127
BIBLIOGRAFÍA	129

TRABAJOS PUBLICADOS Y PRESENTACIONES 149
ANEXO..... 155

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Propiedades fisicoquímicas de algunos HPA **32**

TABLA 2. Rango experimental de las variables independientes para el diseño central compuesto utilizado para optimizar la producción de biosurfactantes **75**

TABLA 3. Combinación de los factores para los experimentos llevados a cabo utilizando un diseño central compuesto..... **76**

TABLA 4. Rango experimental de las variables independientes para el diseño central compuesto utilizado para optimizar la producción de biosurfactantes **78**

TABLA 5. Combinación de los factores para los experimentos utilizando una matriz CCD **78**

TABLA 6. Gradiente de fase móvil utilizado **80**

TABLA 7. Resultados de las medidas de tensión superficial de las muestras aisladas. Se observa TS promedio, desvío estandar y porcentaje de disminución del valor de TS de cada una de las colonias **84**

TABLA 8. Resultados de la tinción de Gram de los microorganismos aislados **86**

TABLA 9. Perfiles numéricos hallados a partir de los kits API de identificación de microorganismos **87**

TABLA 10. Resultados obtenidos a partir de los ensayos bioquímicos con los diferentes kits API..... **88**

TABLA 11. Resultados obtenidos a partir del análisis del ARNr 16s de las cepas aisladas .. **89**

TABLA 12. Resultados observados a partir del ensayo de resistencia a antibióticos con *Pseudomonas* sp. Ag HC **91**

TABLA 13. Disminución de TS en función de la temperatura y concentración de HC..... **92**

TABLA 14. Concentración de biomasa (PS) en función de la temperatura y la concentración de HC..... **93**

TABLA 15. Resultados de la 1^{ra} etapa de cultivo **98**

TABLA 16. Resultados de la 2^{da} etapa de cultivo. Inóculo proveniente de glucosa con HC e inóculo proveniente de glicerol con HC **99**

TABLA 17. Combinación de variables ensayadas para optimizar la producción de biosurfactantes a partir del cultivo de Ag HC. Se muestran también la concentración de biomasa alcanzada en cada caso y el rendimiento de producto en biomasa **104**

TABLA 18. Combinación de variables ensayadas para optimizar la producción de biosurfactantes a partir del cultivo de *Pseudomonas* sp. Ag HC. Se muestran también la concentración de biomasa alcanzada en cada caso y la tensión superficial del sobrenadante de cultivo **112**

TABLA 19. Concentración de biosurfactante, tensión superficial y concentración de biomasa obtenida en función del tiempo para el ensayo en biorreactor **117**

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Consumo mundial de energía en exa joules, desde 2000 hasta 202125

FIGURA 2. Patrón de consumo de energía regional para el año 2021.....26

FIGURA 3. Vías principales de degradación de HPA a partir de bacterias y hongos40

FIGURA 4. Estructura de cuatro tipos de ramnolípidos.....46

FIGURA 5. Soforolípidos de *Candida bombicola*.....47

FIGURA 6. Trehalolípidos de *Rhodococcus erythropolis*, m+n=18-22 (*parcialmente insaturado)47

FIGURA 7. Surfactin de *Bacillus subtilis*48

FIGURA 8. RAG-1 Emulsan de *Acinetobacter* sp. ATCC3101249

FIGURA 9. Izquierda: Vista satelital (*Google Earth*) del predio de la empresa Pobater S.A. (ex RHASA) y del lago dentro del predio.Derecha: Imágenes de la descarga de planta a la laguna.....51

FIGURA 10. Plano de la ciudad de Campana. En amarillo se indica la ubicación de la destilería de petróleo de la empresa Pobater S.A.64

FIGURA 11. Vista ampliada del predio de la empresa. Se muestra la zona de donde se obtuvieron las muestras65

FIGURA 12. Curva de cambio en la concentración de oxígeno disuelto en función del tiempo durante la medición del K_La por el método dinámico67

FIGURA 13. Representación del arreglo de moléculas de un tensioactivo en concentraciones cercanas a la CMC. I: Molécula de tensioactivo. II: Monómeros por debajo de la CMC. III: Micelas por encima de la CMC. IV: Arreglos cilíndricos de micelas a concentraciones mucho mayores a la CMC.75

FIGURA 14. Cultivos de enriquecimiento y placas realizadas con el objetivo de lograr el aislamiento de cepas degradadoras de hidrocarburos.....84

FIGURA 15. Resultados del estudio en policubeta85

FIGURA 16. Tinción de Gram de la muestra de la cepa *Ag HC* vista en un microscopio óptico con un objetivo 100x86

FIGURA 17. Reacciones colorimétricas para uno de los microorganismos bajo estudio (*Ag HC*). Arriba: KIT API 20NE y la reacción de la enzima oxidasa a su derecha. Medio: KIT API Coryne. Abajo: KIT API 20 Strep.87

FIGURA 18. Fotografías tomadas con un microscopio electrónico de barrido (SEM), luego de un tratamiento superficial con oro.89

FIGURA 19. Ensayo de resistencia a antibióticos de *Pseudomonas* sp. *Ag HC*. Se observa el halo de inhibición del crecimiento frente a Minociclina, Meropenem, Ciprofloxacina, Imipenem y Piperacilina + Tazobactama.90

FIGURA 20. Cultivo a 29 °C luego de 6 días de cultivo en MSM suplementado con HC. Izquierda: 2 % v/v HC. Medio: 4,5 % v/v HC. Derecha: 6 % v/v HC.	92
FIGURA 21. Disminución de TS en función de la temperatura y concentración de HC.....	92
FIGURA 22. Concentración de biomasa (PS) en función de la temperatura y concentración de HC.....	93
FIGURA 23. Variación en el valor de pH del cultivo en función de la temperatura y concentración de HC	94
FIGURA 24. Ensayo en policubeta del sobrenadante de cultivo	94
FIGURA 25. Biorreactor y sistema de control utilizado para el cultivo del microorganismo (<i>BioFlo 115, New Brunswick Scientific Co.</i>).....	95
FIGURA 26. Variables de proceso en el cultivo en biorreactor: pH y Oxígeno disuelto (%). Se mantuvieron constantes la velocidad de agitación (200 rpm) y la temperatura (25°C).	96
FIGURA 27. Concentración de oxígeno disuelto durante la medición del K_{La}	96
FIGURA 28. Tensión superficial del sobrenadante de cultivo y concentración de biomasa en función del tiempo de cultivo	97
FIGURA 29. Resultados de la 1 ^{ra} etapa de cultivo. Se observa concentración de biomasa y TS del cultivo y control en función del tiempo de cultivo. Fuentes de carbono utilizadas: Arriba, glucosa; Abajo, glicerol.....	98
FIGURA 30. Resultados de la 2 ^{da} etapa del cultivo. Se observa la concentración de biomasa y TS del cultivo y del control en función del tiempo de cultivo. Fuentes de carbono utilizadas: Arriba, glucosa y luego HC; Abajo, glicerol y luego HC.....	100
FIGURA 31. Curva de crecimiento de biomasa en función del tiempo.....	101
FIGURA 32. Valores de tensión superficial en función del tiempo.....	102
FIGURA 33. Perfil de tensión superficial en función de la concentración de biosurfactante para la obtención del valor de CMC del tensioactivo producido por <i>Ag HC</i>	103
FIGURA 34. Análisis de la varianza para la concentración de biosurfactante	105
FIGURA 35. Gráficos de residuos para la producción de biosurfactantes.....	106
FIGURA 36. Gráfico de superficie de respuesta de la concentración de biosurfactante en función de la temperatura y la concentración de sustrato.....	107
FIGURA 37. Gráfico de contorno de la concentración de biosurfactante en función de la temperatura y la concentración de sustrato.....	107
FIGURA 38. Maximización del polinomio de ajuste de los valores experimentales. Los valores que maximizan la producción de biosurfactantes se observan en color rojo.....	108
FIGURA 39. Izquierda: Esquema experimental utilizado. Derecha: A los 4 días de cultivo se observa gran producción de espuma por sobre el medio de cultivo.....	109

FIGURA 40. Tensión superficial y concentración de biomasa obtenida en función del tiempo para el ensayo en biorreactor **110**

FIGURA 41. Análisis de la varianza para el modelo de superficie de respuesta para la producción de biosurfactante a partir de *Pseudomonas* sp. **113**

FIGURA 42. Gráficos de residuos para la producción de biosurfactantes..... **114**

FIGURA 43. Gráfico en 3 dimensiones de la concentración de biosurfactantes en función de la concentración de N y P. C(100):N y C(100):P indican las partes de N y P por cada 100 partes de carbono en el medio de cultivo, respectivamente **115**

FIGURA 44. Gráfico de contorno de la concentración de biosurfactantes en función de la concentración de N y la de P. C(100):N y C(100):P indican las partes de N y P por cada 100 partes de carbono en el medio de cultivo, respectivamente **115**

FIGURA 45. Maximización del polinomio de ajuste de los valores experimentales. Los valores que maximizan la producción de biosurfactantes se observan en color rojo..... **116**

FIGURA 46. Izquierda: Se observa la espuma producida por el cultivo de la cepa *Ag HC*. Derecha: Se observa la configuración experimental con la trampa de espuma..... **117**

FIGURA 47. Izquierda: Gráfico que muestra la tensión superficial y concentración de biomasa al inicio y final del cultivo. Derecha: Muestra de *Ag HC* cultivada durante 4 días **119**

FIGURA 48. Cromatogramas obtenidos a 220 nm. **a:** agua; **b:** medio salino mínimo; **c:** solución de glicerol grado analítico 7,6 %; **d:** muestra del sobrenadante de cultivo que contiene el biosurfactante..... **120**

LISTADO DE ABREVIACIONES

AgLag	Agua de la laguna
ANOVA	Análisis de la varianza
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
C	Carbono
CMC	Concentración micelar crítica
DO	Densidad óptica
EPA	Agencia de protección ambiental
E ₂₄	Índice de emulsificación
FMA	Fase móvil A
FMB	Fase móvil B
GLU	Glucosa
GLY	Glicerol analítico
GLYBIO	Glicerol co-producto del biodiesel
HC	Mezcla en partes iguales de nafta, diesel y kerosene
HMW	Moléculas de alto peso
HPA	Hidrocarburos poliaromáticos
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
K	Potasio
K _{La}	Coefficiente de transferencia de oxígeno
K _{ow}	Coefficiente de partición octanol/agua
LB	Medio Luria-Bertani
LMW	Moléculas de bajo peso
MPA	Ensayo de policubeta
MSM	Medio salino mínimo
N	Nitrógeno
OGM	Organismo genéticamente modificado
OUR	Velocidad de consumo de oxígeno
P	Fósforo
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
pH	Potencial Hidrógeno
PS	Peso seco
RSM	Metodología de superficie de respuesta
TS	Tensión superficial
μ	Velocidad específica de crecimiento
%	Porcentaje
%v/v	Porcentaje volumen/volumen
°C	Grados centígrados
d	Día
EJ	Exa Joules
g	Gramos
g/l	Gramos/litro
hs	Horas
kg	Kilogramo
km	Kilometro

kWh	Kilo Watt hora
l	Litro
log	Logaritmo
M	Molar
m ³	Metro cúbico
mg	Miligramo
min	Minutos
mM	Milimolar
mm	Milimetro
ml	Militro
mN/m	MiliNewton/metro
nm	Nanometro
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
U	Unidad internacional
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
USD	Dólares estadounidenses
Y _{PX}	Rendimiento de producto en biomasa

RESUMEN

El petróleo es la fuente de energía más difundida y utilizada en el planeta, pero hay un gran inconveniente en esto, la contaminación ambiental. Con el objetivo de reducir este impacto, se han desarrollado técnicas de remediación, dentro de las cuales resaltan aquellas que utilizan organismos vivos para llevar a cabo la recuperación del sitio contaminado. La utilización de biosurfactantes es una de estas estrategias donde se aumenta la biodisponibilidad del contaminante. En este trabajo se presenta un estudio sobre la producción de biosurfactantes a escala laboratorio a partir de microorganismos aislados de zonas crónicamente contaminadas con hidrocarburos en el partido de Campana, provincia de Buenos Aires.

De las muestras obtenidas en el predio de una destilería de la ciudad de Campana, se aisló una cepa del género *Pseudomonas* sp. Ag HC y se utilizó para el desarrollo de la investigación debido a su potencial como productora de biosurfactantes. Se llevó a cabo la optimización estadística del medio de cultivo y se precipitó el tensioactivo producido a partir de la utilización de una solución de ácido clorhídrico. Las concentraciones óptimas de los componentes del medio de cultivo obtenidas fueron 7,60 % v/v de glicerol ($C_3H_8O_3$); 6,825 g/l de nitrato de sodio ($NaNO_3$) y 0,342 g/l de fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4) y 26,9 °C de temperatura, y se obtuvo una producción de 0,482 g/l de biosurfactante a escala Erlenmeyer.

Palabras clave: Biosurfactantes, biorremediación, biorreactor

ABSTRACT

Oil is the most widespread and widely used energy source on the planet, but there is a major drawback: environmental pollution. To reduce this impact, remediation techniques have been developed, among which those that use living organisms to carry out the recovery of the contaminated site stand out. The use of biosurfactants is one of these strategies where the bioavailability of the pollutant is increased. This work presents a study on the production of biosurfactants at laboratory scale from microorganisms isolated from chronically hydrocarbon-contaminated areas in Campana, province of Buenos Aires.

A strain of the genus *Pseudomonas* sp. *Ag HC* was isolated from samples obtained from a distillery located in Campana and was used for the development of the research due to its potential as a biosurfactant producer. Statistical optimization of the culture medium was carried out and the surfactant produced was precipitated using a solution of HCl. The optimum concentrations of the culture medium components obtained were 7,60 %v/v glycerol ($C_3H_8O_3$); 6,825 g/l sodium nitrate ($NaNO_3$) and 0,342 g/l potassium di-hydrogen phosphate (KH_2PO_4) and a temperature of 26,9 °C. A production of 0,482 g/l of biosurfactant was obtained at Erlenmeyer scale.

Key words: Biosurfactants, bioremediation, bioreactor

INTRODUCCIÓN

1.1.- Problemática ambiental petrolera

1.1.1.- El petróleo como fuente de energía

Según la Real Academia Española, el petróleo es un *líquido natural oleaginoso e inflamable, constituido por una mezcla de hidrocarburos, que se extrae de lechos geológicos continentales o marítimos y del que se obtienen productos utilizables con fines energéticos o industriales, como la gasolina, el queroseno o el gasóleo (Diccionario de La Real Academia Española, 2023).*

Con respecto a su utilización con fines energéticos, desde las últimas décadas del siglo XIX, el petróleo, el carbón y el gas natural son las fuentes de energía más comunes, ya que son utilizadas por la mayoría de las actividades económicas mundiales (*Energías de Mi País, 2023*). Actualmente, estas son consideradas fuentes de energía no renovables, ya que se encuentran en una cantidad limitada en la naturaleza y no existe sistema de producción capaz de regenerarlas. En 2021 se consumieron, en promedio, en el mundo 184,21 EJ (Exa Joules) de energía a partir de petróleo, 145,35 EJ a partir de gas natural y 160,10 EJ a partir de carbón, esto corresponde al 82,28% de la energía consumida en el mundo en dicho año (*Figura 1*).

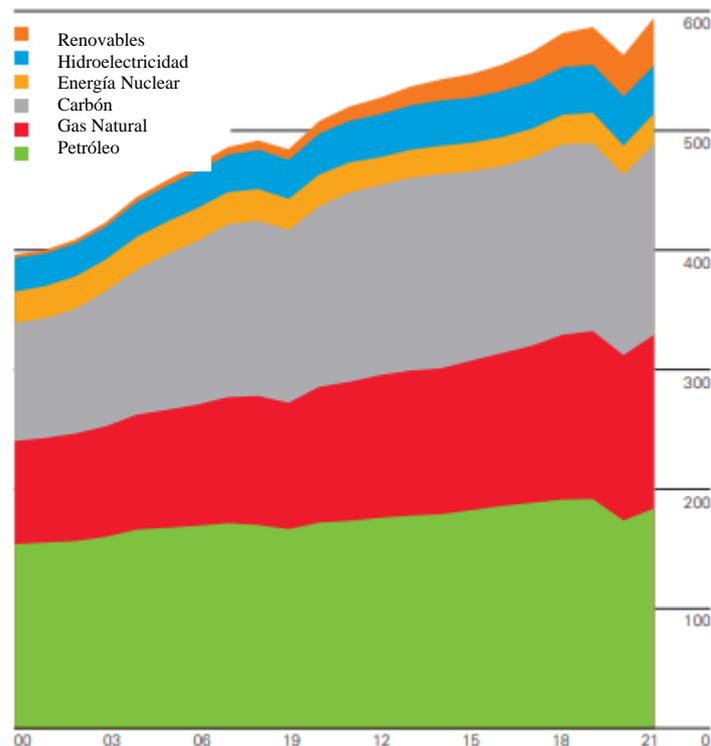


Figura 1. Consumo mundial de energía en Exa Joules, desde 2000 hasta 2021 (BP, 2022).

En particular, para el subcontinente de América del Sur y América Central, la suma de la energía consumida a partir de petróleo, gas y carbón ronda el 65,53 % del total (*Figura 2*).

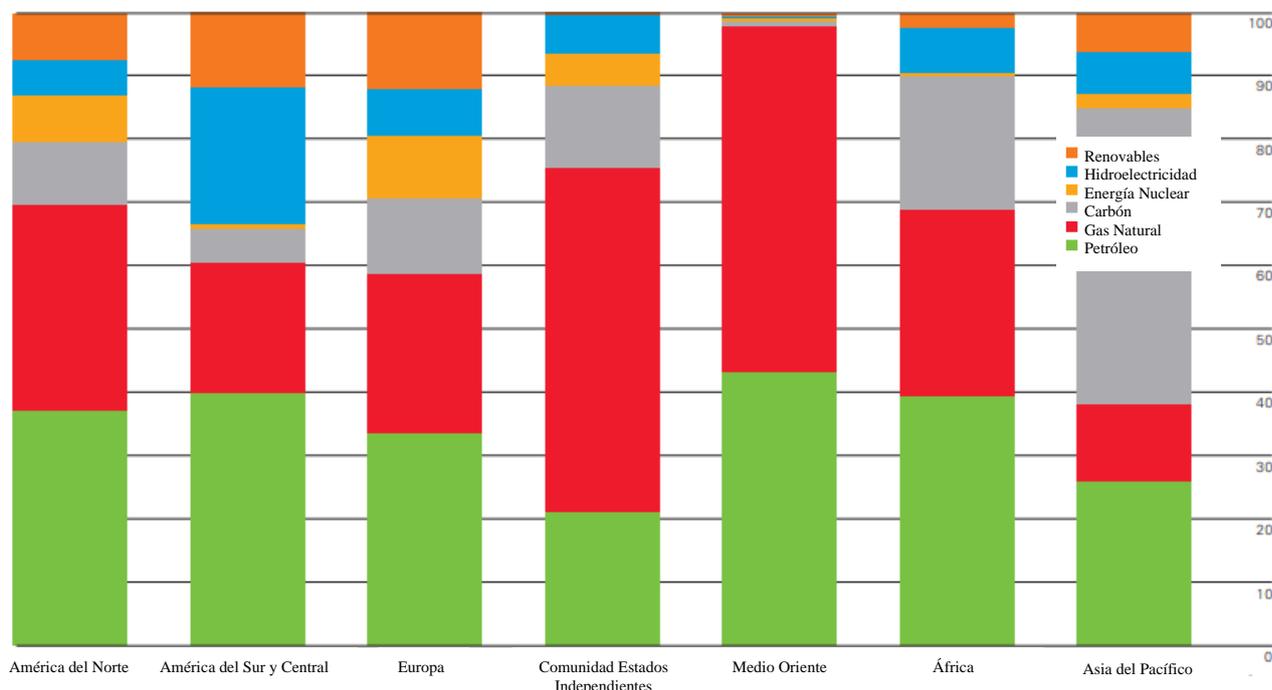


Figura 2. Patrón de consumo de energía regional para el año 2021 (BP, 2022).

En contraposición a lo mencionado, se encuentran las fuentes de energía renovables que, según la *Alianza de Industrias de Energías Renovables de Texas (TREIA)*, se definen como “cualquier fuente de energía que se regenera de forma natural en un corto período de tiempo y deriva directamente del sol (térmica, fotoquímica), independiente del sol (eólica, hidroeléctrica) o de otros movimientos o mecanismos del medio ambiente (mareomotriz, geotérmica). Estos tipos de energía no incluyen los derivados de combustibles fósiles, productos de desecho de fuentes fósiles ni inorgánicas” (*TREIA, 2023*). A pesar de que a partir de la década de 1970 se comenzaron a tener en cuenta como sustitutas a las fuentes de energía convencionales, estas han sido utilizadas por el hombre desde la antigüedad. Algunos ejemplos que se pueden mencionar son los molinos de viento y agua (capaces de producir entre 2 y 3 caballos de fuerza) para moler granos, curtir, lavar y la navegación a vela. De las fuentes de energía consideradas previamente, las más utilizadas en la actualidad son la hidroeléctrica, eólica y solar (*Power Technology, 2023*).

A pesar de los grandes avances en cuanto a los métodos de producción, la energía a partir de fuentes renovables (incluyendo a los biocombustibles) continúa produciéndose y consumiéndose en pequeña escala frente a los valores obtenidos con los métodos convencionales

(Arroyo, 2008), por citar un ejemplo, en el año 2021 se consumieron 39,91 Exa Joules de energía a partir de fuentes renovables, frente a los 489,66 Exa Joules consumidos a partir de fuentes convencionales (petróleo, gas y carbón) (BP, 2022). Una de las razones por las que no se produce energía de fuentes renovables a mayor escala es el alto costo de las instalaciones necesarias para la generación y el bajo rendimiento de conversión, lo que se traduce en instalaciones de baja capacidad de producción de energía. Una de las razones más importantes, es la falta de políticas gubernamentales destinadas, por un lado, a ampliar la oferta de este tipo de energías y, por otro, a incentivar su utilización a través de exenciones impositivas u otros medios.

1.1.2.- Fuentes de energía no renovables

Las fuentes de energía no renovables son las más utilizadas a nivel global, esto se debe a 3 características: *disponibilidad, costo y transporte*. Respecto a la disponibilidad, en la actualidad hay gran abundancia de petróleo a nivel mundial, ya sea en reservas en explotación, reservas probadas o reservas que se cree se encuentran dispersas a lo largo y ancho del planeta (Organization of the Petroleum Exporting Countries, 2022). En la mayoría de los lugares en que se encuentra disponible se puede acceder al mismo de manera sencilla. Debido a los yacimientos existentes y a los que restan por descubrir, la producción se encuentra bastante diversificada pero, a pesar de esto, los principales productores a nivel mundial son aquellos países pertenecientes a la *OPEP*, los cuales suministraron el 37,9 % de la producción mundial de petróleo en 2021 (Organization of the Petroleum Exporting Countries, 2022).

En cuanto a los costos de producción y venta, resulta hoy en día económico, aun teniendo en cuenta que desde junio de 2014 a enero de 2016 el precio del barril de petróleo cayó desde unos 107 U\$D hasta 28 U\$D. Hoy en día, el barril de petróleo Brent cuesta unos 76,20 U\$D, unos 0,046 U\$D/KWh (*Puente: Soluciones Financieras*, 2021). Si bien el costo de producción de energía por vías alternativas como la eólica terrestre, hidroeléctrica y fotovoltaica se encuentra cercano a estos valores (IRNEA, 2022), el nivel de desarrollo de las tecnologías utilizadas para la extracción, transporte, almacenamiento y procesamiento hacen que sea más rentable la producción de energía a partir de petróleo, sin tener en cuenta la rentabilidad obtenida a partir de la producción y comercialización de los diversos productos obtenidos del petróleo (Cavcic, 2022).

Por último, debido a que es un material fluido, el transporte del petróleo se puede llevar a cabo de diversas formas, a granel en contenedores o barriles por vía terrestre o acuática hacia cualquier parte del mundo, o mediante oleoductos subterráneos que conectan el sitio de extracción

con el de procesamiento. Esto puede encontrarse en el mismo país de producción, país limítrofe o en el mismo continente. Estos tipos de transporte disminuyen los costos de logística al mínimo además de que conllevan una operación relativamente sencilla. Se debe tener en cuenta que la utilización del petróleo para la obtención de una amplia variedad de productos derivados incrementa la demanda de este. Hoy en día, casi todos los productos con los que nos encontramos cotidianamente se obtienen a partir del mismo (*Oil and Petroleum Products Explained*, 2021), ejemplo de estos son los aceites y lubricantes, ampliamente utilizados en motores y diversos tipos de maquinaria; detergentes; asfalto; derivados para la industria textil, para suplantar la lana y fibras de algodón; caucho sintético; plásticos; colorantes; aditivos alimentarios, como la sacarina (edulcorante) y el benzoato de sodio (conservante de alimentos); entre muchos otros. Esta gran variedad de derivados, sumado a la utilización de los combustibles para aviones, barcos y todo tipo de automóviles hace que, hoy en día el petróleo sea un producto indispensable para la vida a nivel mundial (US Energy Information Administration, 2022).

1.1.3.- Inconvenientes ambientales surgidos de la utilización de petróleo y sus derivados

Si bien el petróleo ha contribuido al desarrollo socioeconómico de gran cantidad de países y culturas posee una desventaja que, desde el punto de vista medioambiental, resulta de gran importancia. Las actividades relacionadas con la extracción, almacenamiento, procesamiento y de transporte a granel producen grandes niveles de contaminación ambiental (Center, 2003). Esto es debido a filtraciones en tanques y a derrames accidentales o intencionales, que hacen que el petróleo y/o sus derivados entren en contacto con suelos y cuerpos de agua (Alvarez & Illman, 2006). Otro factor importante son las emanaciones de gases producto de la combustión de hidrocarburos utilizados en automóviles, barcos y aviones, y en calderas y equipos de proceso a nivel industrial. De estos, las situaciones que afectan de forma grave al medioambiente son los derrames de petróleo en ríos, mares y océanos, que tienen consecuencias importantes para grandes superficies de agua, afectando al ecosistema acuático e imposibilitando el desarrollo de la fotosíntesis por bloqueo de la luz solar (ITOPF, 2014; Ranju et al., 2020). Se produce también una reducción del aporte de oxígeno al ecosistema, con la consecuente merma de la cantidad de especies vegetales acuáticas lo que produce falta de alimento para los microorganismos y larvas de peces que las habitan, sumado a la exposición a predadores de peces que en ellas se resguardan. Además, aumenta la mortalidad de especies acuáticas y aves por envenenamiento a partir de la ingesta o absorción de los contaminantes con los que se encuentran en contacto, debida a que se

encuentran impregnados de hidrocarburos y esto imposibilita el movimiento libre o debido a hipotermia, ya que les impide una buena aislación térmica, principalmente a las aves (Maccott et al., 2019).

En cuanto a ecosistemas terrestres, la extensión de la contaminación por hidrocarburos depende en gran medida de las características del suelo, tanto en su composición como en su textura. En el caso de los suelos arenosos, permiten la penetración y dispersión de los contaminantes por lo que gran cantidad de estos puede alcanzar las napas freáticas. Al contrario, suelos con características rocosas impiden la absorción y penetración de hidrocarburos. En el caso de suelos con abundante materia orgánica, los contaminantes tienden a absorberse en gran medida y permanecer por un largo período de tiempo, afectando la flora y fauna del lugar. Algunas situaciones que pueden presentarse debidas a contaminación de suelos y cuerpos de agua son: incorporación de sustancias potencialmente cancerígenas o carcinogénicas a las plantas que, luego, continúen a lo largo de la cadena trófica hasta el ser humano y/o alteración del hábitat con la consecuente muerte indirecta de diversas especies e ingesta de sustancias tóxicas presentes en el agua de cauces naturales (Honda & Suzuki, 2020; Romero et al., 2018).

Por último, la quema de derivados del petróleo para la obtención de energía y calefacción produce un fenómeno conocido como calentamiento global (*Greenhouse Effect*, 2021). Este tema se encuentra en el centro de la escena mundial desde hace unos 35 años siendo la principal razón por la que se llevaron a cabo diversos tratados internacionales para la preservación del medio ambiente (Protocolo de Kioto (Chrysanthis et al., 1991), Protocolo de Montreal (ONU, 2006), entre otros). El fenómeno del calentamiento global se produce debido al aumento de la concentración de gases de efecto invernadero en la atmósfera (CO_2 , H_2O , CH_4 , NO_x , SO_x , entre otros), lo que hace que parte de la energía radiada por la Tierra, que antes atravesaba la atmósfera, quede retenida entre esta y la superficie del planeta, generando un aumento de las temperaturas medias a lo largo del tiempo. En el intento de revertir esta situación, gran cantidad de países han suscripto al tratado de Kioto (1997) para llevar a cabo una disminución del 5% en promedio de las emisiones de gases de efecto invernadero de 1990, para el período 2008-2012. Actualmente, diversos países se encuentran trabajando para disminuir sus emisiones en el marco de una extensión del Protocolo de Kioto por el período 2013-2020.

1.2.- Hidrocarburos

El principal proceso de tratamiento del petróleo crudo consiste en la refinación y destilación para separar los hidrocarburos que lo componen en distintas fracciones comúnmente denominadas “cortes”, cada uno de ellos está compuesto por hidrocarburos cuyo punto de ebullición se encuentra dentro de un determinado rango de temperatura. Las fracciones más livianas, compuestas por hidrocarburos volátiles, se utilizan principalmente como combustibles y solventes orgánicos, las fracciones más pesadas se utilizan como asfalto, combustible sólido (coque de petróleo), lubricantes o aditivos para la industria papelera. En el medio se encuentra una gran cantidad de sustancias de naturaleza recalcitrante que poseen diversas aplicaciones en industrias alimenticias, plásticas, de adhesivos y pinturas, medicina (Kirk & Othmer, 2000).

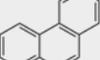
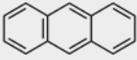
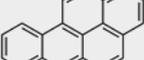
Las actividades de extracción, transporte, refinación y almacenamiento de petróleo implican un gran impacto ambiental en suelos y cuerpos de agua, debido a filtraciones en tanques de almacenamiento u oleoductos, derrames accidentales o intencionales en la carga y descarga del material (Kingston, 2002). Lo que sucede en estos casos es que la persistencia de los contaminantes en el ambiente se encuentra determinada debido a los procesos de volatilización, lixiviación y/o degradación que los afecten. Generalmente, los compuestos alifáticos de pequeña y media longitud de cadena poseen bajos puntos de ebullición y alta solubilidad, por lo que los principales mecanismos de eliminación son la volatilización, dispersión (se pierden rápidamente en la atmósfera), lixiviación y difusión a través de los cuerpos de agua subterráneos. Sumado a esto, los hidrocarburos alifáticos de mayor tamaño y algunos aromáticos inicialmente experimentan un proceso de volatilización, pero éste fenómeno por sí solo no logra una remoción total de los mismos. Otro proceso que afecta la concentración de estos contaminantes en el suelo es la degradación total o parcial a partir de la flora microbiana nativa (Desai & Vyas, 2006). Por último, los compuestos de alto peso molecular, alifáticos y aromáticos, son contaminantes muy resistentes debido a su baja solubilidad y sus altas relaciones de distribución suelo-agua. Esto hace que sean de difícil disponibilidad para los organismos degradadores y se acumulen en el medioambiente (Johnsen et al., 2005). Un ejemplo de este tipo de compuestos contaminantes ampliamente distribuidos en el medio ambiente son los hidrocarburos poliaromáticos (HPA), ya que son compuestos recalcitrantes hallados en suelos y cuerpos de agua de todo el planeta. Debido a los efectos mutagénicos y carcinogénicos que poseen los HPA, se ha realizado un gran esfuerzo en los últimos años para desarrollar estrategias de remediación de este tipo de compuestos, principalmente a partir de la utilización de microorganismos (Kumar et al., 2016; Samanta et al., 1999; Uyttebroek et al., 2006).

1.2.1.- Hidrocarburos poliaromáticos.

Los HPA son una clase de compuestos orgánicos que poseen en su estructura dos o más anillos aromáticos unidos en distintas configuraciones. Algunas de las propiedades fisicoquímicas que poseen los miembros de esta familia de compuestos, son altos puntos de fusión, baja o nula solubilidad en agua (*Tabla 1*) y alta hidrofobicidad, lo que hace que las moléculas de los HPA sean altamente recalcitrantes, con grandes tiempos de retención en el medio ambiente. Esto se debe a que las nubes de electrones π a ambos lados de la estructura la hacen resistente a ataques nucleofílicos (Xu-xiang et al., 2006). La extensión de este tiempo depende de diversos factores como la concentración, biodisponibilidad, tipo de suelo y estructura, humedad, oxígeno disponible, nutrientes, pH, temperatura, presencia de microorganismos degradadores (Kanaly & Harayama, 2000).

Los HPA se encuentran ampliamente distribuidos en el planeta, y son generados y liberados al medio ambiente debido a dos fuentes principales: naturales y antropogénicas. Las primeras refieren a procesos que ocurren en la naturaleza en donde se produce la combustión de distintos materiales que, entre otros productos, liberan al ambiente estos hidrocarburos, erupciones volcánicas, incendios naturales de pastizales y bosques. Por otro lado, se encuentran las fuentes antropogénicas que también pueden dividirse en dos: las primeras involucran la liberación de HPA al ambiente a partir de fugas y/o derrames intencionales o accidentales en la extracción, transporte, refinación y almacenamiento de petróleo y sus derivados. Las últimas surgen a partir de las emisiones generadas a partir de la combustión incompleta de materia orgánica, de vehículos de combustión interna, de operaciones de procesamiento de madera, de la producción de energía eléctrica en plantas de generación (CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment), 2010). Debido a esto y a la persistencia de los HPA en el medio ambiente, estas sustancias se encuentran entre los contaminantes orgánicos más ampliamente distribuidos en suelos, agua y aire. Además, se ha encontrado que la concentración de HPA en suelos (Kanaly & Harayama, 2000) y aire (Freeman & Cattell, 1990) puede variar entre $1\mu\text{g}/\text{kg} - 300\text{g}/\text{kg}$ en el primer caso, y $60\mu\text{g}/\text{m}^3 - 3\text{mg}/\text{m}^3$. Entonces, resulta de vital importancia desarrollar estrategias para lograr la eliminación de estas sustancias recalcitrantes. Uno de los enfoques más relevantes en la actualidad es la degradación de los HPA a partir de microorganismos.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de algunos HPA. (^a: K_{OW} es el coeficiente de partición octanol/agua. Se define como la relación de la concentración de un soluto en octanol con respecto a la concentración de este en agua, en un sistema bifásico octanol – agua.)

HPA	<i>Naftaleno</i>	<i>Fluoreno</i>	<i>Fenantreno</i>	<i>Antraceno</i>	<i>Pireno</i>	<i>Benzo[a]pireno</i>
Peso Molecular	128,2	166,2	178,2	178,2	202,3	252,3
Estructura						
Punto de Fusión (°C)	80,2	116	99	218	156	179
Solubilidad en agua (mg/l)	320	1,85	1,24	0,64	0,14	0,0038
Log K_{ow}^a	3,5	4,28	5,62	5,33	4,47	5,74

1.3.- Remediación de sitios contaminados con petróleo y sus derivados

A causa del desarrollo de las técnicas de extracción de petróleo, refinación y su masiva utilización a nivel mundial, se incrementó la contaminación ambiental de suelos y cuerpos de agua. Como ejemplos de esto puede mencionarse algunos de los incidentes más graves en relación con este tema, tales como el sucedido en la plataforma *Deepwater Horizon* en el golfo de México en abril de 2010 a causa de material defectuoso y negligencia por parte de los operadores, o el derrame del buque petrolero *Exxon Valdez* en Alaska en marzo de 1989 (Pepper et al., 2015; Shigenaka, 2014; Velasco, 2010).

Se han diseñado diversas estrategias para mitigar (remediar) los efectos producidos por los hidrocarburos en el medioambiente (Ossai et al., 2020; Riser-Roberts, 1998). Estas estrategias pueden ser clasificadas de acuerdo con tres criterios: estrategia de remediación, lugar en que se realiza el proceso y tipo de tratamiento (Marks et al., 1994; Volke Sepúlveda & Velasco, 2002).

1.3.1.- Estrategias de remediación

Las estrategias mayormente utilizadas, solas o en conjunto, para lograr la remediación de sitios contaminados son las siguientes:

Destrucción o modificación de los contaminantes: se basa en la modificación de la estructura química de la sustancia nociva. Esto puede alcanzarse a través de métodos físico-químicos, térmicos o biológicos. La remediación físico-química involucra principalmente procesos de oxidación y degradación de los contaminantes, son de bajo costo y pueden llevarse a cabo en cortos periodos de tiempo pero involucran la generación de residuos que deben disponerse de acuerdo con la clasificación correspondiente. Los primeros utilizan agentes oxidantes fuertes como ozono (Moreno et al., 2020) o peróxido de hidrógeno (Verma & Haritash, 2019), mientras que los últimos involucran en general procesos fotocatalíticos (Silva et al., 2020). La destrucción de los contaminantes también puede llevarse a cabo por métodos térmicos (Kasai et al., 2000; Zhao et al., 2018) o utilizando organismos vivos (bacterias, hongos, levaduras, plantas). En este último caso, la destrucción se realiza cuando el organismo utiliza al contaminante como fuente de carbono y/o energía y lleva adelante las reacciones químicas propias de su metabolismo hasta lograr una sustancia menos nociva o inocua para el ambiente. Además, otra ventaja es que son compatibles con el medio ambiente, por lo que raramente se requiere de tratamientos posteriores (Hausmann & Syldatk, 2015). Como desventaja podemos mencionar el tiempo de proceso, que suele ser largo, y que no pueden aplicarse cuando el suelo o cuerpo de agua contaminado no favorezca el crecimiento biótico. Se han descrito procesos de este tipo orientados a la remediación de sitios contaminados con hidrocarburos (Basumatary et al., 2020) y metales pesados (Hassan et al., 2019; Mohamed et al., 2020).

Separación o extracción de los contaminantes: se lleva a cabo aprovechando las propiedades de estos. Algunas de las tecnologías utilizadas son extracción con solventes (Ayeni et al., 2019), desorción térmica (Falciglia et al., 2020), burbujeo de aire (Ahmadnezhad et al., 2020), calentamiento por frecuencia de microondas (Sivagami et al., 2019), lavado del suelo o extracción con vapor (Labianca et al., 2020), en el caso de suelos contaminados; separación de fases (Pickett et al., 2018) y adsorción para cuerpos de agua (Tursi et al., 2019).

Aislamiento o inmovilización de los contaminantes: a través de un proceso de vitrificación, contención, estabilización o solidificación, y generalmente requieren de mantenimiento (Abramovitch et al., 1999).

Al momento de decidir la estrategia de remediación a llevar a cabo en un sitio particular, se utiliza una combinación de las técnicas descritas, ya que resulta muy difícil que una sola de ellas pueda llevar a cabo el proceso de recuperación por sí misma (Alves et al., 2010; Gomes et al., 2012).

1.3.2.- Remediación *in situ* y *ex situ*

Las estrategias mencionadas en el apartado anterior pueden clasificarse, de acuerdo con el lugar donde se llevan a cabo, en:

In situ: la remediación se lleva a cabo en el sitio donde se encuentra la contaminación. Este tipo de procesos tiene como ventaja principal que se evita el transporte del material contaminado, por lo que se reducen los potenciales costos de este. Por otro lado, son procesos difíciles de monitorear, no se puede asegurar la homogeneidad y, generalmente, se desarrollan durante un extenso período de tiempo (Carberry & Wik, 2015).

Ex situ: son aquellos procesos en los que se lleva a cabo la excavación o remoción del material a remediar previamente. Entre las ventajas se puede mencionar que requieren menores tiempos de proceso (respecto de procesos *in situ*) para alcanzar una concentración de contaminante determinada y que puede lograrse una buena homogeneización del material, por lo que se pueden tomar muestras representativas para monitorear el proceso. Todo esto hace que la remediación *ex situ* sea una tecnología más predecible y controlable que la *in situ*. En cuanto a las desventajas, la más importante es que esta tecnología resulta significativamente más costosa debido al proceso de remoción y transporte del material, al equipamiento necesario y a los riesgos de exposición al material contaminado a los que se encuentran sometidos los operadores (Carberry & Wik, 2015).

1.3.3.- Procesos de Biorremediación

Cuando se utilizan organismos vivos para degradar contaminantes el proceso se denomina biorremediación (Adams et al., 2015; Megharaj et al., 2011). Diversos contaminantes han sido tratados a partir de esta técnica, como metales pesados (Goswami et al., 2017), compuestos organofosforados, pesticidas (Amani et al., 2019), hidrocarburos clorados, compuestos nitroaromáticos (Tiwari et al., 2020) e hidrocarburos de todo tipo (Marchand et al., 2017; Smulek et al., 2020).

La biorremediación puede ser intrínseca o mejorada. El primer caso implica que no se realiza ninguna acción externa, sino que se lleva a cabo con los microorganismos nativos y con los nutrientes disponibles en el lugar. Este forma parte de un proceso global mucho mayor, denominado atenuación natural, que involucra procesos físicos (evaporación, dispersión), químicos (oxidación) y biológicos para alcanzar la remediación del sitio crónicamente contaminado. Por otro lado, se dice que es mejorada cuando se desarrollan actividades destinadas a acelerar el proceso de degradación, tales como suministro de oxígeno, nutrientes o algún componente que acelere el proceso (Wu et al., 2019).

Este proceso depende de diversos factores para lograr su objetivo, biodisponibilidad y propiedades del contaminante, presencia de comunidades degradadoras y las condiciones del medio, como temperatura, disponibilidad de nutrientes y el aceptor de electrones (Mishra et al., 2021). Debido a la baja o nula solubilidad de los hidrocarburos en agua, la biodisponibilidad es la razón más frecuente por la cual la biorremediación intrínseca no es viable (Boopathy, 2000). Para mejorar el rendimiento de la biorremediación existen dos técnicas: bioaumentación y bioestimulación.

1.3.3.1.- Bioaumentación

Es considerada una de las herramientas con mayor potencial para aumentar la eficiencia de la biorremediación (Guarino et al., 2017). Consiste en el agregado de comunidades de microorganismos foráneos para mejorar la cinética de degradación del contaminante. En sitios con una baja carga microbiana o donde la microflora presente carece de las vías metabólicas necesarias para llevar a cabo la remediación, la implementación de esta técnica resulta adecuada (Smith et al., 2005). Debe tenerse en cuenta que hay ciertos factores que deben ser considerados a la hora de aplicar esta técnica, ya que influyen directamente en la actividad del inóculo: disponibilidad de nutrientes, disponibilidad de un aceptor de electrones, condiciones ambientales, presencia de depredadores, distribución de las comunidades exógenas y competencia con microorganismos nativos (Tyagi et al., 2011). Actualmente, resulta valioso el conocimiento de la distribución y dinámica poblacional de la flora autóctona ya que esto afecta directamente la eficiencia de la técnica de bioaumentación. Para determinar estos parámetros y los cambios en la distribución poblacional luego del proceso de inoculación se implementan técnicas de secuenciación genética (Festa et al., 2016; Madueño et al., 2009).

Los inóculos utilizados para realizar un bioaumentación pueden ser de diferentes tipos de microorganismos:

- Cultivos puros: se introduce en el sistema una única cepa capaz de degradar el contaminante presente (Pacwa-Płociniczak et al., 2019).
- Cultivos mixtos: se utilizan cepas autóctonas enriquecidas utilizando el contaminante de interés (Poi et al., 2017).
- Organismos genéticamente modificados (OGM): se utilizan cepas que fueron específicamente modificadas genéticamente para degradar un contaminante en particular (Massa et al., 2009; Rodrigues et al., 2006). La bibliografía existente respecto a la utilización de OGM's se centra en estudios de laboratorio debido a los riesgos potenciales para el medio ambiente y la salud pública que presenta la liberación de este tipo de organismos.

Dado que al aumentar la concentración de microorganismos aumenta la demanda de otros componentes presentes en el medio, esta técnica se suele utilizar junto con el agregado de nutrientes y oxígeno (Straube et al., 2003). Además, el agregado de microorganismos endógenos junto con la adición de los nutrientes necesarios resulta la mejor opción para aumentar la velocidad de degradación de un contaminante particular (Suja et al., 2014). Por último, se debe resaltar que se obtienen mejores resultados a partir de la aplicación de esta técnica en procesos de biorremediación *ex situ*, debido a la posibilidad de remover y arar el material sometido al proceso, lo que se traduce en una homogénea distribución de los microorganismos suministrados, en contraposición a lo que sucede cuando se trabaja *in situ*.

1.3.3.2.- Bioestimulación

Consiste en el aumento de la actividad degradadora de los microorganismos autóctonos a partir del agregado de nutrientes, aceptor de electrones o algún otro componente que influya en la cinética del proceso. Para poder aplicar la bioestimulación, los microorganismos autóctonos deben ser capaces de llevar a cabo la degradación del contaminante, es decir, deben poseer las vías metabólicas necesarias (Adams et al., 2015).

Uno de los pasos críticos en la aplicación de esta técnica consiste en identificar adecuadamente cuáles son las condiciones limitantes para que los microorganismos lleven a cabo la remediación. En general, la disponibilidad de nutrientes (orgánicos e inorgánicos) y de oxígeno limitan el progreso de la reacción. El contaminante es la fuente de carbono y energía utilizada por los microorganismos por lo que cuando su concentración es lo suficientemente alta y sobrepasa la concentración de oxígeno estequiométrica, este último se vuelve un limitante del proceso. La

introducción de aire en el subsuelo terrestre o el arado del terreno han demostrado ser eficaces en la biorremediación de diversos contaminantes (Frutos et al., 2010; Jia et al., 2016).

En procesos que se han mantenido en condiciones anaeróbicas por largos períodos de tiempo existe la posibilidad que se produzca un proceso de desnitrificación en paralelo, dando lugar a una disminución en el contenido total de nitrógeno que hace que éste se convierta en limitante. Se ha llevado a cabo con éxito el agregado de nitrógeno a partir de urea, amonio, o nitratos en muestras de suelos contaminados (Komilis et al., 2010; Taylor et al., 2010; Walworth et al., 2007).

Otro nutriente que puede actuar como limitante en el proceso de biorremediación es el fósforo debido a que, en general, el contenido de este nutriente en el subsuelo terrestre es muy bajo o puede presentarse en altas concentraciones en forma mineral, no disponible para los microorganismos. Diversos estudios han evaluado con éxito la adición de fosfatos como bioestimulante (Rabelo de Sousa et al., 2011; Suja et al., 2014). En general, la clave para lograr una bioestimulación exitosa es la relación de concentración de nutrientes, principalmente la relación entre carbono:nitrógeno:fósforo (C:N:P). Una relación C:N:P de 100:10:1 se considera el valor óptimo estequiométrico, sin embargo este debe ser ensayado en cada caso para hallar el óptimo particular (Martínez Álvarez et al., 2017).

1.3.4.- Microorganismos degradadores de HPA

Debido a la ubicuidad de los HPA y a su recalcitrancia, se han hallado organismos, principalmente bacterias y hongos, de distintas especies capaces de degradarlos. Estos han desarrollado esta capacidad debido a la exposición por largos períodos de tiempo a estos contaminantes. Por un lado, se ha demostrado que bacterias del género *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Agrobacterium* son capaces de mineralizar fenantreno y benzo[a]pireno (Aitken et al., 1998; Guntupalli et al., 2016; Lu et al., 2019; L. Zhou et al., 2016), además, se halló una cepa de *Micobacterium* sp. que puede crecer utilizando pireno como fuente de carbono y energía (Wu et al., 2019). Por otro lado, se ha visto que diversas especies de hongos también son capaces de degradar compuestos aromáticos. Entre ellos se puede mencionar *Scopulariopsis brevicaulis*, cuya capacidad para degradar antraceno ha sido probada (Godoy et al., 2016), o *Aspergillus fumigatus*, capaz de degradar antraceno, benceno y tolueno (Ye et al., 2011).

Se ha postulado que la degradación de HPA a partir de los microorganismos adecuados puede ser desencadenada por tres razones (Johnsen et al., 2005; Megharaj et al., 2011). La primera

de ellas, puede ser la mineralización del contaminante para obtener energía para sus funciones celulares y carbono para sintetizar material celular. En este caso, el HPA se utiliza como sustrato para obtener energía y material para el crecimiento y duplicación. En segundo lugar, el microorganismo puede llevar a cabo un proceso de degradación del contaminante con el objetivo de producir un intermediario que posea mayor solubilidad, con la consecuente obtención de energía, que luego es excretado. En tercer lugar, la degradación del HPA puede llevarse a cabo a través de co-metabolismo (Sun et al., 2020). El HPA es un cosustrato que compite con el sustrato a partir del cual el microorganismo obtiene energía para su crecimiento y supervivencia. La degradación del co-sustrato es una reacción colateral a partir de la que el microorganismo no obtiene beneficios, es más, este no induce la actividad de las enzimas involucradas en su degradación (Ho et al., 2000).

Respecto del metabolismo de degradación de HPA de estos microorganismos, de acuerdo con la bibliografía hay tres mecanismos fundamentales que conducen a la degradación aeróbica de estas sustancias (*Figura 3*). Más allá de las diferencias entre ellos, tienen en común una etapa de oxidación del anillo aromático seguida de la degradación del compuesto en metabolitos y/o dióxido de carbono (Bamforth & Singleton, 2005). Estos tres mecanismos de degradación corresponden al de las bacterias (con la intervención de enzimas dioxigenasas), hongos lignolíticos y al de los hongos no lignolíticos y algunas bacterias (con la intervención de enzimas citocromo P450 monooxigenasas).

Los hongos ligninolíticos son aquellos que crecen en la madera, ya que producen una serie de enzimas (lacasas y peroxidasas) que les permite oxidar la lignina. En estas condiciones, estos microorganismos son capaces de degradar los HPA a partir de la generación de radicales libres, removiendo un electrón de la molécula. Estos radicales libres sufren una oxidación posterior para formar quinonas (Ghosal et al., 2016). Se ha demostrado que, a partir del uso de hongos ligninolíticos, los HPA pueden mineralizarse completamente a CO₂ a partir de una combinación de enzimas ligninolíticas, citocromo P₄₅₀ monooxigenasas y epóxido hidrolasas. Diversos estudios se han llevado a cabo para evaluar la posibilidad de utilizar estos microorganismos para la degradación de HPA (Agrawal et al., 2018; Jove et al., 2016; Torres-Farradá et al., 2019).

En el caso de los hongos no lignolíticos, la oxidación del anillo aromático se produce por medio de una reacción catalizada por una enzima citocromo P₄₅₀ monooxigenasa, en la que se adiciona un átomo de una molécula de oxígeno para formar un óxido de areno. La mayoría de estos compuestos son inestables y pueden sufrir un rearrreglo en ausencia de enzimas, para producir fenoles, los cuales pueden conjugarse con glucosa, xilosa, sulfatos. Por otro lado, los óxidos de

areno también pueden sufrir una hidratación catalizada por una epóxido-hidrolasa, para dar *trans*-dihidrodióles (Ghosal et al., 2016). Especies de hongos no lignolíticos pueden degradar los HPA a fenoles, *trans*-dihidrodióles y otros compuestos intermediarios, pero son muy pocos los que logran la mineralización completa. En muchos casos se ha demostrado que los intermediarios obtenidos poseen una menor toxicidad y mayor solubilidad que sus precursores (Bamforth & Singleton, 2005).

Las bacterias comienzan el proceso de degradación de los HPA a partir de la oxidación del anillo aromático. Esto lo hacen incorporando dos átomos de oxígeno al anillo, por medio de la acción de oxígeno transferasas, para producir *cis*-dihidrodióles. Si el sustrato es un compuesto con tres o más anillos, generalmente las bacterias los metabolizan en varios sitios. Para poder lograr esto, las dioxigenasas son sistemas multienzimáticos que contienen al menos tres proteínas. Estos *cis*-dihidrodióles son luego deshidrogenados, a través de una reacción NAD⁺-dependiente, para formar catecol, y este luego es canalizado a través de las vías de clivaje *orto* o *meta*, según corresponda, a dióxido de carbono y agua (Bamforth & Singleton, 2005; Johnsen et al., 2005). Este último es uno de los pasos más importantes en la degradación de HPA y consiste en la ruptura del anillo aromático para dar intermediarios alifáticos. Este paso es catalizado por enzimas dioxigenasas específicas para sustratos destinados al clivaje en la posición *orto* y *meta*. Cuando el anillo aromático del intermediario se somete a clivaje en la posición *orto*, la ruptura se produce entre los carbonos que contienen los grupos hidroxilo. Por otro lado, cuando el clivaje se da en la posición *meta*, la ruptura del anillo se produce entre uno de los carbonos que contiene un oxhidrilo y un carbono adyacente (Blaise et al., 2011). Por último, los compuestos alifáticos formados ingresan a las vías metabólicas centrales y se oxidan para producir energía o son utilizados para la biosíntesis de material celular (Seo et al., 2009).

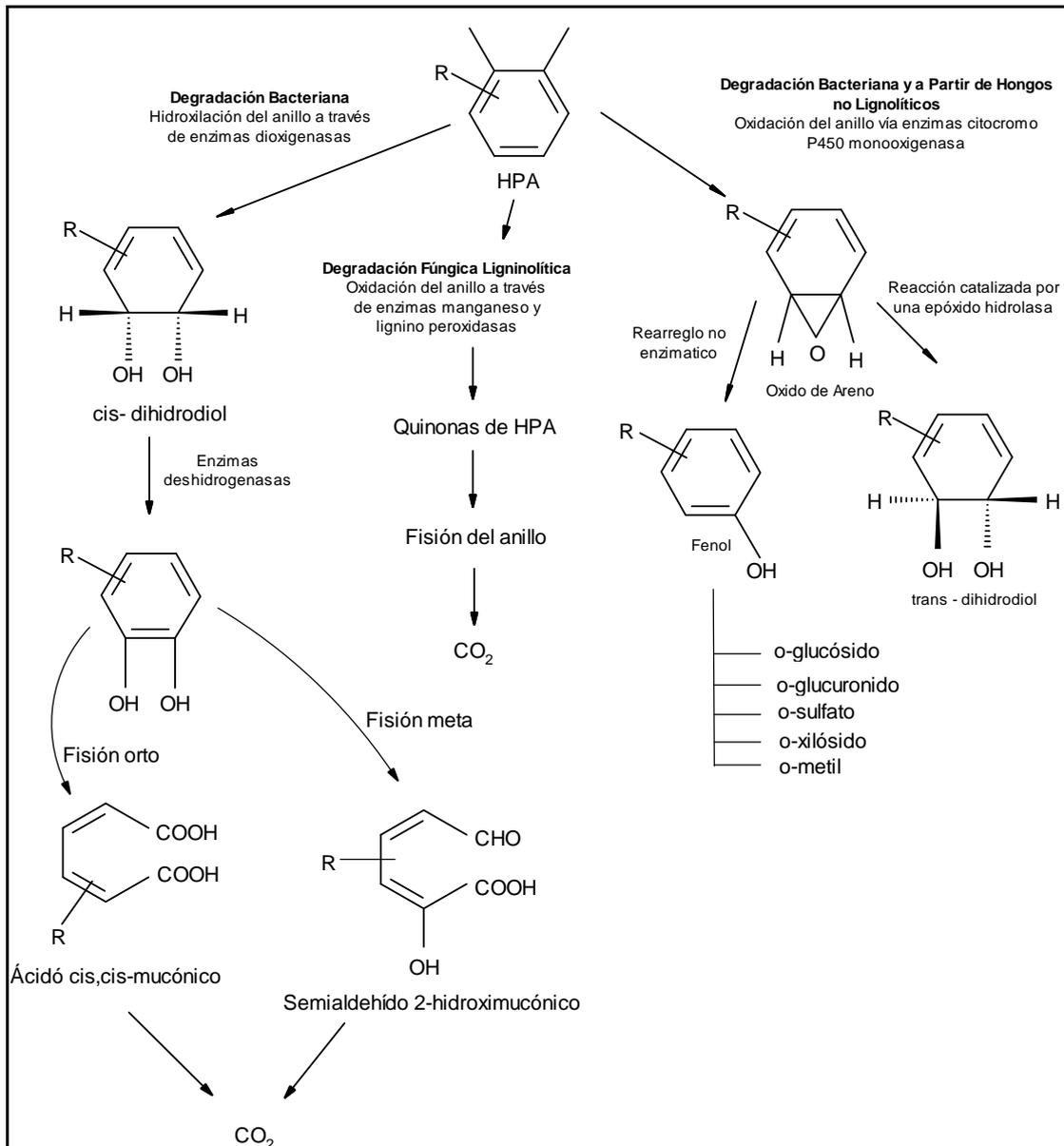


Figura 3. Vías principales de degradación de HPA a partir de bacterias y hongos (Bamforth & Singleton, 2005).

1.3.5.- Biodegradación de HPA: Factores que afectan al proceso

La estrategia de biorremediación puede lograrse utilizando técnicas *in situ* (bioventeo, fitorremediación, atenuación natural) o *ex situ* (compost, biopilas, biorreactores). Este tipo de procesos posee ventajas frente a técnicas convencionales y ciertas limitaciones. Con respecto a estas últimas, diversos factores que afectan el grado de remediación a alcanzar. Entre estos se puede mencionar la temperatura, el pH y las características del suelo, la biodisponibilidad del contaminante, disponibilidad de oxígeno y nutrientes, etc.

1.3.5.1.- Temperatura

La temperatura es un factor muy importante en el proceso de biodegradación, ya que afecta tanto al microorganismo como al sustrato. La solubilidad y biodisponibilidad de los HPA dependen de la temperatura, en general, cuando la temperatura aumenta crece la solubilidad y biodisponibilidad de los HPA (Tao et al., 2020). Se podría pensar que esto mejora la velocidad de degradación pero, por el contrario, esta se ve afectada negativamente debido a la disminución de la concentración de oxígeno disuelto (Coulon et al., 2005).

Se han hallado microorganismos degradadores de HPA capaces de metabolizarlos en grandes intervalos de temperatura desde 0°C hasta 70°C. Aunque la velocidad de degradación óptima generalmente ocurre a temperaturas mesofílicas, se han identificado microorganismos capaces de crecer y degradar compuestos aromáticos a temperaturas cercanas a los 0°C (Crisafi et al., 2016), en zonas tropicales (Obayori et al., 2008) y en zonas desérticas donde la temperatura se mantiene alta durante el todo el año (Rahmeh et al., 2021).

1.3.5.2.- pH

En contaminación de suelos, el pH depende del tipo de contaminante vertido en el mismo por lo que la influencia de este factor es mucho más importante que en contaminación de cuerpos de agua. En cuerpos de agua, la acción de los microorganismos en conjunto con las corrientes actúa como regulador del pH y hace que su valor se mantenga en un rango acotado.

A pesar de que se han observado procesos de degradación de HPA en suelos ácidos (Stapleton et al., 1998) y básicos (Bamforth et al., 2005), el valor óptimo se encuentra entre 6,5 y 7,5. Una pequeña variación en este valor puede afectar significativamente el grado de degradación (Kastner et al., 1998; Wong et al., 2002). Por lo tanto, se recomienda regular el pH de sitio a remediar con nitrato de amonio o sulfato de amonio si el suelo es básico, o con carbonato de magnesio si el suelo es ácido (Ghosal et al., 2016).

1.3.5.3.- Nutrientes

Se ha estimado que la relación C:N:P es uno de los parámetros que limita de forma considerable el proceso de biorremediación. Esto es debido a la gran cantidad de carbono orgánico disponible en el contaminante, por lo que dicha relación se regula a partir del agregado de N y P de una fuente externa, por ejemplo, fertilizantes (Stroud et al., 2007).

Se han reportado distintas relaciones de nutrientes óptimas en la bibliografía que van desde 100:15:3 (Ebadi et al., 2017; Zitrides, 1978), pasando por 100:10:1 (Oualha et al., 2019; Yang et al., 2019), hasta 100:5:1 (Zhou & Hua, 2004). Este rango se considera un buen punto de partida para el estudio de una estrategia de biorremediación. En algunos casos, por ejemplo, cuando se utilizan hongos ligninolíticos, un exceso de nutrientes minerales puede afectar negativamente el proceso de degradación. Esto se debe a que este tipo de organismos pueden reciclar nutrientes, en particular, nitrógeno.

1.3.5.4.- Oxígeno

La degradación de hidrocarburos puede llevarse a cabo en ambas condiciones, aeróbica y anaeróbica, pero esta última posee desventajas que hacen que no sea deseable. Primeramente, no todos los sitios contaminados con hidrocarburos presentan microorganismos anaeróbicos capaces de degradar HPA, además, la geoquímica será alterada debido a las condiciones reductoras impuestas por el metabolismo anaeróbico de la población. Los aceptores de electrones (nitratos, Fe^{3+} y sulfatos) se reducen durante el proceso y se forman Fe^{2+} y fosfatos que son tóxicos para el medio ambiente. Debido a esto, y a que resulta más sencillo el control y desarrollo de procesos aeróbicos, es que la mayor proporción de investigaciones se enfocan en estos últimos procesos.

El oxígeno resulta de vital importancia para los procesos aeróbicos ya que el primer paso en la biodegradación de HPA involucra la acción de enzimas mono- y di-oxigenasas para la oxidación del anillo aromático (Gibson et al., 1968; Srivastava & Kumar, 2019), reacción en la que el oxígeno actúa como aceptor de electrones. Cuando el proceso de biorremediación se lleva a cabo *ex situ*, el suministro de oxígeno no resulta una operación dificultosa. Por el contrario, en el caso de un proceso *in situ*, debe llevarse a cabo de forma controlada y regularmente para evitar que se convierta en un factor limitante del proceso. Algunas de las formas en que puede oxigenarse un proceso de biorremediación *in situ* son: inyección directa de aire; a través de un sistema de reparto de sustancias químicas que liberen oxígeno o mediante el labrado y mezclado del suelo, entre otros (Ghosal et al., 2016).

1.3.5.5.- Biodisponibilidad

La biodisponibilidad es el factor más importante que afecta al proceso de degradación de contaminantes. Hay dos grandes pasos en el proceso de biodegradación de HPA en suelos, a saber, el consumo del contaminante por el microorganismo y la metabolización de este. Se ha demostrado

que el paso controlante de la reacción de degradación es el primero de ellos, la transferencia de materia desde el sitio de la contaminación hasta el interior de la célula (Bezza & Nkhalambayausi Chirwa, 2016). Si consideramos un microorganismo con capacidad para degradar HPA, el proceso puede llevarse a cabo rápidamente si el sustrato se encuentra disponible en una forma que el organismo pueda utilizarlo. Como se mencionó previamente, los HPA son compuestos con muy baja solubilidad y, a medida que el tamaño de molécula crece, esta se hace cada vez menor. Además, poseen coeficientes de partición (K_{ow}) muy altos por lo que tienden a interactuar fuertemente con la materia orgánica del suelo. Todo esto se traduce en una baja biodisponibilidad. Además, a medida que aumenta el tiempo de contacto entre el HPA y la matriz del suelo se produce una interacción entre ellos que dificulta aún más el contacto entre sustrato y microorganismo, esto se conoce como “ageing” o “envejecimiento” (Semple et al., 2003).

Para aumentar la biodisponibilidad de estos contaminantes una de las estrategias más difundidas y efectivas es la utilización de biosurfactantes producidos a partir de microorganismos nativos aislados de zonas crónicamente contaminadas. Estos permiten liberar al HPA retenido en la matriz debido a que en su estructura poseen una mitad hidrofóbica y otra hidrofílica, lo que les permite desorber y solubilizar los hidrocarburos en la fase acuosa, mejorando así la biodisponibilidad y, por lo tanto, la biodegradación (Bezza & Nkhalambayausi Chirwa, 2016; Guo & Wen, 2021).

1.4.- Biosurfactantes

Para que se lleve a cabo el proceso de biorremediación, se requiere que los nutrientes entren en contacto con los microorganismos y que sean suficientes para soportar el crecimiento de la población. Como regla general, para que un proceso de biorremediación resulte exitoso, las técnicas de bioaumento y bioestimulación se deben aplicar de forma combinada. Una de las estrategias para llevar a cabo la bioestimulación es la adición de biosurfactantes al sitio a remediar. Los biosurfactantes son compuestos anfipáticos que, a diferencia de los surfactantes químicos o sintéticos, son producidos por distintos tipos de microorganismos: hongos, levaduras y bacterias; siendo los provenientes de estas últimas los mayormente estudiados. Es debido a su origen que son mucho menos tóxicos para el medio ambiente que los surfactantes químicos convencionales y, dado que son compuestos tensioactivos, con su adición se pretende aumentar la biodisponibilidad del contaminante y mejorar la velocidad de degradación de este (Whang et al., 2008). Se ha demostrado que la adición de biosurfactantes mejoró notablemente la degradación de

hidrocarburos en suelos comparada con la adición de nutrientes (nitrógeno, fósforo y potasio). Es más, la adición de biosurfactantes en combinación con microorganismos degradadores de hidrocarburos ha demostrado ser más eficiente que la combinación de biosurfactantes + nutrientes (NPK) (Tahseen et al., 2016).

Todos los biosurfactantes poseen en su estructura al menos una parte hidrofóbica y una parte hidrofílica, lo que permite que estas moléculas puedan acumularse entre distintas fases fluidas y disminuyan la tensión interfacial o superficial (Peele et al., 2018). El tipo de estructura de las fracciones hidrofílica e hidrofóbica de la molécula depende de diversos factores como tipo y especie de microorganismo, fuente de carbono, tipo de fuente de nitrógeno y concentración, concentración de otros nutrientes, y parámetros de proceso (pH, temperatura, velocidad de agitación del cultivo) (Jahan et al., 2020). Con relación a esto, se ha demostrado la influencia del tipo de sustrato en la estructura del biosurfactante producido (Nitschke et al., 2005).

Los biosurfactantes poseen diversas ventajas frente a sus contrapartes sintéticas, son menos tóxicos, poseen mejor selectividad, y concentraciones micelares críticas (CMC) más bajas. Sin embargo, los surfactantes químicos aún monopolizan el mercado de los surfactantes debido, principalmente, al alto costo y bajo rendimiento de producción de los primeros (Von Lau et al., 2014). Un enfoque prometedor para superar este inconveniente consiste en la optimización de las condiciones de cultivo (Dos Santos et al., 2016) o en la utilización de organismos productores genéticamente modificados (Sekhon et al., 2011).

1.4.1.- Características y aplicaciones de los biosurfactantes

Los surfactantes de origen biológico poseen diversas ventajas respecto de los sintéticos, biodegradabilidad completa, posibilidad de producirlos a partir de fuentes renovables (George & Jayachandran, 2013; Pele et al., 2019), gran diversidad y actividad biológica específica. Poseen mayor estabilidad a temperaturas, pH extremo, concentraciones altas de sales (Gonçalves, 2015) y una amplia variedad de aplicaciones, antibióticos (Ding et al., 2011), aditivos para la industria alimenticia (Kiran et al., 2017), biorremediación de metales pesados e hidrocarburos (Gidudu et al., 2020), como insecticidas, pesticidas, adjuvante para formulación de productos, etc. Los biosurfactantes poseen una desventaja de gran importancia, sus costos de producción. Este aspecto hace que su producción a gran escala no sea competitiva por el momento frente a sus contrapartes sintéticas (Singh et al., 2019). Hoy en día la utilización de los biosurfactantes se complementa con la de los surfactantes sintéticos en algunas aplicaciones, más allá de sus altos costos de producción

(Hajibagheri et al., 2018; Shah et al., 2019). Por ejemplo, cuando el surfactante debe dispersarse en el medio ambiente para la remediación de sitios crónicamente contaminados.

1.4.2.- Estructura, clasificación y modo de acción de los biosurfactantes

Los biosurfactantes en solución acuosa cumplen su función de dos formas, disminuyen la tensión superficial (interfase aire-agua) a partir de la interacción con las moléculas del líquido, favoreciendo la formación de enlaces de hidrógeno y enlaces de interacción hidrofóbica, o incrementan la solubilidad de compuestos hidrofóbicos evitando la coalescencia de las emulsiones aceite-agua. Dicha actividad se encuentra directamente relacionada con la estructura de la molécula (Mulligan, 2014).

La fracción hidrofóbica de la molécula de un biosurfactante generalmente es uno o más ácidos grasos saturados o insaturados, o algunos derivados de éstos. La fracción hidrofílica puede poseer diversas estructuras tales como carbohidratos (monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos), péptidos (lineales o cíclicos), grupos fosfatos, aminoácidos y proteínas, y estas estructuras pueden ser catiónicas, aniónicas, no iónicas o anfóteras (Hausmann & Syltatk, 2015). La estructura del compuesto tensioactivo se encuentra influenciada por el grado de aireación, temperatura, pH, como así también por la fuente de carbono utilizada, ya que las fracciones hidrofílicas e hidrofóbicas de la molécula se producen a partir del metabolismo primario. Esto es importante debido a que, si se producen moléculas diferentes, sus propiedades fisicoquímicas pueden ser distintas y se podrían utilizar para diferentes aplicaciones (Jones, 1997; Marqués et al., 2009).

Con el objetivo de clasificarlos, los biosurfactantes pueden dividirse de acuerdo con su peso molecular en (Olivera & Nievas, 2009):

- Sustancias de bajo peso molecular, se incluyen aquí aquellos compuestos que poseen una actividad superficial significativa.
- Sustancias de alto peso molecular, son aquellas que poseen propiedades emulsificantes.

Los biosurfactantes de bajo peso molecular, son más eficientes para disminuir la tensión superficial y/o interfacial entre dos fases inmiscibles (Ahmad et al., 2015). Los mayormente estudiados son los glicolípidos y lipopéptidos, aunque también se encuentran algunos fosfolípidos y ácidos grasos. Dentro de los primeros, los más comunes son los ramnolípidos, soforolípidos,

trehalolípidos y los lípidos de manosil eritritol. Las fracciones hidrofílicas de cada molécula pueden ser unidades de glucosa, ramnosa, soforosa, galactosa, entre otros, y la fracción lipídica puede estar compuesta por ácidos grasos saturados e insaturados, ácidos grasos hidroxilados o alcoholes derivados de ácidos grasos (Gautam, 2006).

Los ramnolípidos, producidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*, son glicolípidos cuya estructura puede estar compuesta por una o dos unidades de α -L-ramnosa enlazadas por medio de un enlace O-glicosídico a una o dos unidades de 3-hidroxiácidos grasos (Figura 4). Los ramnolípidos poseen múltiples aplicaciones, entre las que se puede mencionar producción de compuestos de química fina, como aditivos para la biorremediación de suelos y agentes de control biológico (Wu et al., 2019).

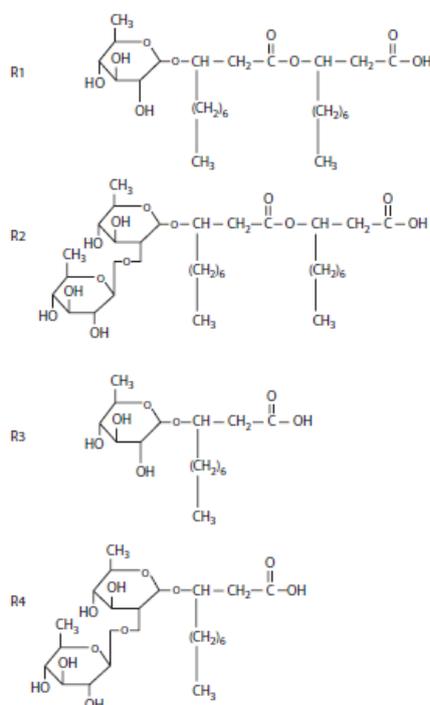


Figura 4. Estructura de cuatro tipos de ramnolípidos (C. N. Mulligan, 2009).

Los soforolípidos son glicolípidos compuestos por el disacárido soforosa unido a un hidroxiácido graso y son producidos por levaduras del género *Torulopsis* sp. (Figura 5). Este tipo de biosurfactantes posee buena actividad tensioactiva pero no así actividad bioemulsificadora (Banat, 1997). Este tipo de glicolípidos posee varias aplicaciones como detergentes para lavar la ropa, como aditivos para biorremediación *in situ* de hidrocarburos, aditivos para la industria alimenticia, o para remover metales pesados de diversos sedimentos (Mulligan, 2014).

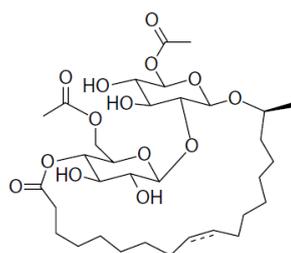


Figura 5. Soforolípido de *Candida bombicola* (Hausmann & Sylatk, 2015)

Los trehalolípidos (*Figura 6*) son biosurfactantes que poseen en su estructura el disacárido trehalosa unido a ácidos micólicos. Este tipo de compuestos los producen distintos tipos de microorganismos pertenecientes a los géneros *Mycobacterium* sp., *Nocardia* sp., *Corynebacterium* sp., *Rhodococcus* sp., donde el tamaño y estructura de los ácidos micólicos difiere de acuerdo con el organismo productor. Algunas aplicaciones de estos glicolípidos son: agente antitumoral y antifúngico en medicina, emulsificador en la industria de la cosmética y alimentaria, y para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos poliaromáticos (Franzetti et al., 2010; Steinbu, 2010).

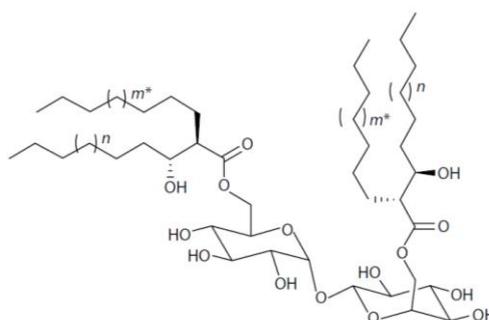


Figura 6. Trehalolípidos de *Rhodococcus erythropolis*, $m+n = 18-22$ (*parcialmente insaturado) (Hausmann & Sylatk, 2015)

Diversos microorganismos producen biosurfactantes lipopeptídicos, entre ellos se puede mencionar *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Pseudomonas* sp. y *Serratia* sp. Este tipo de biosurfactantes se caracteriza por poseer una muy buena capacidad tensioactiva (Alvarez et al., 2020; Jemil et al., 2018) y muchos de ellos poseen efecto antibiótico (Baltz et al., 2005).

Entre los biosurfactantes con estructura lipopeptídica el más estudiado es surfactin, producido por *Bacillus subtilis* (Figura 7). La estructura de esta molécula consta de un péptido cíclico, compuesto por 7 aminoácidos, que se encuentra acilado con 3-hidroxiácidos grasos. Surfactin es uno de los pocos biosurfactantes disponibles comercialmente y posee diversas aplicaciones ámbito de la medicina, como inhibidor de la coagulación sanguínea, agente antitumoral y antiinflamatorio (Mulligan, 2014).

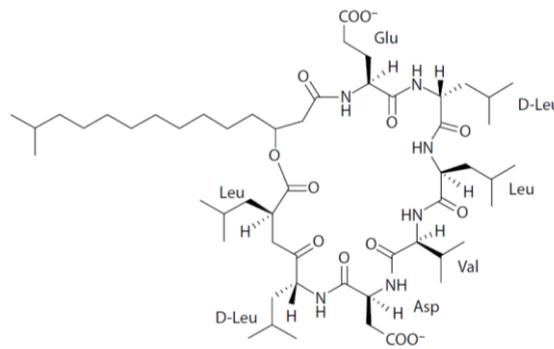


Figura 7. Surfactin de *Bacillus subtilis* (Hausmann & Sylødtak, 2015).

Además de los biosurfactantes de bajo peso molecular, se encuentran los de alto peso molecular, que son polisacáridos, proteínas, lipopolisacáridos, lipoproteínas o mezclas complejas de éstos a las que se refiere como lipoheteropolisacáridos. Estos biosurfactantes son bien conocidos debido a su capacidad para formar emulsiones estables de aceite/hidrocarburo en agua (Calvo et al., 2009). Diversas especies de microorganismos producen este tipo de biosurfactantes entre las que podemos mencionar las bacterias del género *Acinetobacter* sp., *Halomonas eurihalina*, *Planococcus maitriensis*, la levadura *Cándida lipolytica* (Calvo et al., 2009). De este grupo de biosurfactantes los más estudiados son los denominados bioemulsan, producidos por *Acinetobacter* sp. Estos son emulsificadores de gran rendimiento, entre los que destaca RAG-1. La estructura de este último es una mezcla compleja de exopolisacáridos de alto peso molecular y lipopolisacáridos con un peso superior a 250kDa (Figura 8).

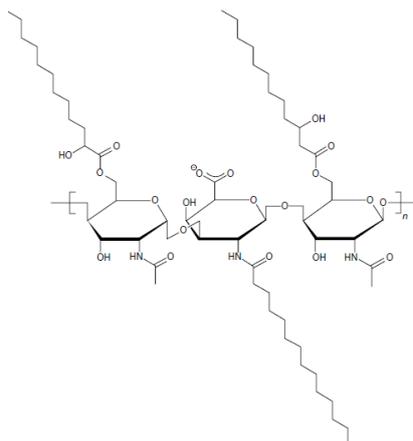


Figura 8. RAG-1 Emulsan de *Acinetobacter* sp. ATCC 31012 (Hausmann & Syltatk, 2015).

1.5.- Empleo de residuos agroindustriales

Día a día crece la utilización de residuos o subproductos agroindustriales como fuente de carbono para procesos biotecnológicos. La agricultura e industrias estrechamente relacionadas aportan una gran variedad de sustancias que pueden utilizarse en este sentido y, en particular, para la producción de biosurfactantes. Algunos ejemplos son: la utilización de aceite agotado de soja o girasol (Moya Ramírez et al., 2015; Rocha e Silva et al., 2014), residuos lignocelulósicos (Panjiar et al., 2020), residuos con alto contenido de almidón (Gurjar & Sengupta, 2015) y residuos de la industria láctea (Daverey et al., 2011). Entre ellos, el glicerol es quien destaca debido a que se ha demostrado su capacidad como sustrato para la producción de biosurfactantes (Moshtagh et al., 2021), sumado a que su propia producción se encuentra asociada a la producción de biodiesel, la que se ha incrementado sostenidamente desde el año 2006, desde 20000 litros (Marin et al., 2014) hasta la capacidad actual de unos 4,5 millones de toneladas (MAGYP, 2018).

La utilización de este tipo de materias primas en procesos productivos redundan en el cuidado del medio ambiente, al disminuir la cantidad de residuos a disponer, y en una transformación sustentable debido al aprovechamiento de subproductos y desechos de otras industrias con alta carga orgánica. Sumado a esto, este tipo de sustratos son de bajo costo comparados con los convencionales, por lo que su empleo beneficia desde el punto de vista económico al proceso global (Rodríguez et al., 2019). En este contexto, este trabajo aborda el desarrollo y optimización de un bioproceso para la obtención de biosurfactantes utilizando glicerol como fuente de carbono y energía con el objetivo de que este sea técnico económicamente viable.

1.6.- Problemática regional

El polo industrial Zárate-Campana, ubicado al noroeste de la provincia de Buenos Aires, representa uno de los polos industriales más importantes de la Argentina. Esto se debe a diversos motivos, pero principalmente a su ubicación estratégica, siendo que se encuentra a 75 km al nordeste de la Ciudad de Buenos Aires sobre la ruta Nacional N° 9, cuya ruta le permite la comunicación a nivel nacional. Además, limita al norte con el Río Paraná de las Palmas con la disponibilidad de un puerto propio para buques de gran calado, que conecta al polo con la Ciudad de Buenos Aires y el mundo, con Rosario y el litoral argentino. Asimismo, atraviesan el polo otras vías de comunicación de vital importancia en la economía y desarrollo de la zona y del país, como son la ruta Provincial N° 6, la Ruta Nacional N° 12 y el ex ferrocarril Mitre.

En una zona del margen del Río Paraná de Las Palmas de la ciudad de Campana, se encuentra un conglomerado de empresas dedicadas exclusivamente a la actividad petroquímica. Como el caso de dos destilerías emplazadas y diversas empresas cuyas materias primas son derivados del petróleo crudo. Siendo que la zona lleva 100 años en dicha actividad, la misma posee un historial importante de derrames accidentales o intencionales, fugas de tanques de almacenamiento y barriles, vuelcos accidentales en el proceso de carga y descarga de camiones. Esto hace que los suelos y los cuerpos de agua de esta área se encuentren crónicamente contaminados con hidrocarburos.

Una de las refinerías que se encuentra en la zona mencionada es la empresa Pobater S.A. (ex RHASA y previamente Fábrica Militar de Tolueno Sintético) (*Figura 9*). Resulta que a principios de los años '90, en tiempos del surgimiento de la ley nacional N° 24051 (Ley Nacional de Residuos Peligrosos), la empresa decidió realizar la limpieza barros de hidrocarburos que se van acumulando en el fondo de los tanques de almacenaje, y dispuso volcarlos en la laguna que se encuentra dentro del predio de la misma empresa. Esta inadecuada práctica ambiental ha empeorado la situación medioambiental debido a la contaminación por hidrocarburos.



Figura 9. Izquierda: Vista satelital (*Google Earth*) de la ciudad de Campana donde se observa el predio de la empresa Pobater S.A. (ex *RHASA*) y el lago dentro de este. Derecha: Imágenes de la descarga de planta a la laguna.

En los últimos años, motivados principalmente por exigencias legales del Organismo Provincial para el Desarrollo Sustentable (OPDS), las empresas han tenido que comenzar a realizar tareas de disminución del impacto ambiental y del pasivo ambiental. Es en este marco que la Facultad Regional Delta (FRD) de la Universidad Tecnológica Nacional (UTN) firmó un convenio de trabajo conjunto con la empresa Pobater S.A. para el desarrollo de una estrategia de biorremediación de suelos y cuerpos de agua crónicamente contaminados con hidrocarburos. Es dentro de este convenio que se enmarca el presente trabajo de investigación.

HIPÓTESIS



2.1.- Hipótesis

La biorremediación es un proceso biológico el cual ha probado su efectividad en la descontaminación y recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos. Dicha remoción puede ser llevada a cabo por microorganismos y/o por plantas y este proceso puede ser favorecido por la aplicación de procesos de bioestimulación, bioaumentación o la aplicación de agentes tensioactivos (biosurfactantes/surfactantes) que contribuyen en el aumento de la biodisponibilidad de los hidrocarburos para que puedan ser degradados por los microorganismos y/o plantas. En base a esto, nuestras hipótesis de trabajo son:

- Las cepas productoras de biosurfactantes y de biomasa aisladas de sitios crónicamente contaminados, pueden ser utilizadas como agentes biológicos para procesos de producción de biosurfactantes.
- Co-productos obtenidos de destilerías, tales como el glicerol, son potenciales sustratos para la producción de surfactantes. Estos sustratos pueden ser empleados en los procesos fermentativos.
- Es posible poder purificar e identificar a los biosurfactantes ya que son moléculas anfifílicas de origen biológico con propiedades similares a los surfactantes sintéticos, es decir, con capacidad de reducir la tensión superficial del agua en la interfaz y llegan a formar estructuras agregadas denominadas micelas.
- De la optimización del proceso productivo a escala de laboratorio, se obtendrá la información para la simulación primero a escala piloto y así evaluar su escalado a nivel industrial.

OBJETIVOS

3.1.- Objetivo General

El objetivo de este trabajo es el desarrollo y optimización de un bioproceso para la obtención de biosurfactantes a partir del aprovechamiento de co-productos como sustratos de bajo costo provenientes de la producción de biocombustibles. La producción de estos será destinada al tratamiento biológico de suelos contaminados con hidrocarburos con el fin diseñar procesos económicamente viables, rendimientos y eficiencia, evaluándose la transferencia tecnológica del mismo. Para el cumplimiento se partirá de cepas microbianas previamente aisladas de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos en la zona del polo petroquímico Zárate-Campana, Pcia. de Buenos Aires, específicamente en la Empresa Pobater S.A. (ex Refinería RHASA), con la cual la FRD-UTN posee un convenio específico de trabajo.

Los objetivos específicos que se plantean son los siguientes:

1. Selección de cepas y/o consorcios microbianos potenciales productoras de biosurfactantes y caracterización molecular, bioquímica y taxonómica de las mismos.
2. Relevamiento de residuos agroindustriales de la región, con especial referencia a glicerol (subproducto de la producción de biodiesel) factibles de ser usados como sustrato para la producción de biosurfactantes.
3. Diseño y optimización de medios de cultivo que satisfagan los requerimientos nutricionales de los microorganismos seleccionados, evaluándose el modo de operación y determinación de los criterios para el escalado del proceso.
4. Optimización a nivel de fermentador de laboratorio de un proceso de producción del biosurfactante y biomasa, empleando el medio seleccionado, evaluándose el modo de operación.
5. Purificación del agente tensioactivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Área de Estudio

El presente estudio fue realizado a partir de la toma de muestras en la zona de Campana, provincia de Buenos Aires, Argentina (-34.167872, -58.939692). La misma se ubica 75 km al noroeste de la Ciudad de Buenos Aires sobre la Ruta Nacional N°9. Limita al norte con el río Paraná de las Palmas, al sur con los Partidos de Exaltación de la Cruz y Pilar, al sureste con el Partido de Escobar, y al Oeste con el Partido de Zárate. Además, atraviesan el partido de Campana otras vías de comunicación de vital importancia en la economía y desarrollo de la zona y el país, como son la Ruta Provincial N°6, la Ruta Nacional N°12 y el ex ferrocarril Mitre. Sumado a esto, el puerto de Campana (se encuentra en el km 67 del Río Paraná de las Palmas) conecta la ciudad con Buenos Aires con Rosario, el litoral argentino y el Mercosur.

4.1.1.- Muestras

Las muestras fueron tomadas en sectores de la empresa Pobater S.A. en la ciudad de Campana (*Figuras 10 y 11*), en diferentes áreas del predio de la refinería, de acuerdo con el historial de contaminación:

- Montículo de tierra de relleno (*Mt*). Esta tierra fue adicionada a un lugar que solía ser una laguna artificial, donde se desechaban los remanentes de los tanques de almacenamiento de la destilería. Esta muestra fue tomada a una profundidad de entre 10 y 20 cm, utilizando palas de mano y frascos de vidrio de 800 ml estériles para su almacenamiento.
- Tanque de almacenamiento (*Tk*). Estos sirven como depósito de barros y material de descarte de los equipos utilizados en planta. Muestra de tierra alrededor del tanque (*Tk.1*), muestra del interior de este (*Tk.2*). *Tk.1* fue tomada a una profundidad de entre 10 y 20 cm, utilizando palas de mano y *Tk.2* del contenido del tanque. Ambas fueron almacenadas en frascos de vidrio de 800 ml estériles.
- Costa de la laguna natural dentro del predio de la empresa, donde se descargan los efluentes de planta (*Co*). Esta muestra fue tomada a una profundidad de entre 10 y 20 cm, utilizando palas de mano y frascos de vidrio de 800 ml estériles para su almacenamiento.

- Lecho de la laguna natural cercano a las orillas (Lg). Esta muestra se tomó a un metro de profundidad y una distancia de 10 metros de la descarga de la planta de tratamiento de efluentes.
- Agua de la laguna (Ag). Esta muestra se tomó directamente del agua superficial de la laguna, a unos 5 metros de la descarga de efluentes de la planta, en botellas de vidrio tipo Duran Schott de 1000 ml.



Figura 10. Plano de la ciudad de Campana. En amarillo se indica la ubicación de la destilería de petróleo de la empresa Pobater S.A.

El proceso se realizó utilizando palas de mano y material de vidrio estéril (frascos de 800 ml) para el almacenamiento. También se recolectó agua de la laguna para ser utilizada como única fuente de carbono para el aislamiento de los microorganismos. Todas las muestras fueron debidamente rotuladas y almacenadas en una heladera a 4 °C hasta el momento de procesarlas.



Figura 11. Vista ampliada del predio de la empresa. Se muestra la zona de donde se obtuvieron las muestras.

4.1.2.- Análisis Físicoquímicos de las Muestras

El análisis físicoquímico de las muestras de suelo y agua obtenidas se realizó en el Centro de Investigaciones Toxicológicas S.A. de la ciudad de Buenos Aires. Para cada una de las muestras enviadas, se realizaron tres ensayos:

- Hidrocarburos Totales: se realizó a través del método analítico EPA 9071.
- Rango Orgánico de Gasolinas (GRO): se realizó a través del método analítico EPA 8015.
- Rango Orgánico de Diésel (DRO): se realizó a través del método analítico EPA 8015.

4.2.- Medios de cultivo

Para los estudios realizados se empleó un medio de cultivo salino mínimo (MSM), formulado con (g/L): NaNO_3 (4,0); KH_2PO_4 (1,5); Na_2HPO_4 (0,5); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,0011); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,0132); suplementado con una fuente de carbono. Todas las sales fueron marca Biopack. El MSM fue ajustado a pH 7 y esterilizado en autoclave, a 121 °C y 1 atm durante 15 min. La fuente de carbono fue esterilizada según se indica en cada caso, y luego adicionada al MSM estéril.

En los ensayos en los que se realizó un pre-cultivo, se empleó medio de cultivo Luria-Bertani (LB) (Al-wahaibi et al., 2014), formulado con (g/L): tripteína bacteriológica (10), extracto de levadura (5), cloruro de sodio (10). Los reactivos fueron adquiridos a *Laboratorios Britania S.A.*, a excepción del NaCl (*Alcor reactivos analíticos*).

4.3.- Técnicas analíticas

4.3.1.- Medición de la producción de biomasa y pH

La estimación de concentración de biomasa se llevó a cabo a partir de la medición del peso seco (PS). Para ello se centrifugaron 18 mL de cada muestra a 13500 rpm, a 19 °C durante 15 min. Se separó el sobrenadante y el pellet fue colocado en una estufa a 80 °C durante 24 hs. Luego por diferencia de peso se calculó la biomasa en g/L. Cuando se grafica el logaritmo natural de la concentración de biomasa en función del tiempo de cultivo y se traza una recta en la zona exponencial de crecimiento, se obtiene la velocidad específica de crecimiento del microorganismo (μ) a partir de la pendiente de dicha recta. Asimismo, el pH se determinó sobre cada muestra de cultivo con un pHmetro (Adwa).

4.3.2.- Medición del K_{La}

La medición del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno se llevó a cabo a partir del método dinámico (Doran, 2013; Garcia-ochoa & Gomez, 2009), que se basa en realizar un balance de ese elemento en estado no estacionario. Para realizar la medición se utilizó una sonda marca Mettler Toledo provista junto con el biorreactor Bioflo 115. Se utilizó este método debido a que el valor calculado para el K_{La} se encuentra en función de la velocidad de agitación, del flujo de aire, de las características del medio de cultivo y de la capacidad de respiración del microorganismo que se encuentra en crecimiento.

El proceso de cálculo es el siguiente, en un momento determinado (t_0) se procede a cortar el suministro de aire al fermentador por lo que la concentración de oxígeno disuelto (C_{AL}) comienza a disminuir debido al consumo del microorganismo en el medio. Luego, se reestablece el flujo de aire y se observa un aumento en la C_{AL} con el tiempo y se espera a que se alcance un valor estable ($\overline{C_{AL}}$), condición de estado estacionario (*Figura 12*). Entonces, en el proceso de re-oxigenación el balance de oxígeno es:

$$\frac{dC_{AL}}{dt} = K_L a. (C_{AL}^* - C_{AL}) - q_o \cdot X$$

Donde: $q_o \cdot X$ es la velocidad de consumo de oxígeno (OUR)

C_{AL}^* es la concentración de saturación de oxígeno en el líquido

Cuando se alcanza el estado estacionario final, $\frac{dC_{AL}}{dt} = 0$ y el valor de OUR se puede calcular de la siguiente forma:

$$0 = K_L a. (C_{AL}^* - \bar{C}_{AL}) - q_o \cdot X$$

$$K_L a. (C_{AL}^* - \bar{C}_{AL}) = q_o \cdot X$$

Sustituyendo en el balance fuera del estado estacionario queda:

$$\frac{dC_{AL}}{dt} = K_L a. (\bar{C}_{AL} - C_{AL})$$

Suponiendo $K_L a$ constante en función del tiempo, integrando y despejando se tiene:

$$K_L a = \frac{\ln \left(\frac{\bar{C}_{AL} - C_{AL1}}{\bar{C}_{AL} - C_{AL2}} \right)}{t_2 - t_1}$$

Utilizando esta ecuación puede calcularse el valor del coeficiente global de transferencia de oxígeno a partir de dos o varios puntos. Resulta de suma importancia que, cuando se corte la oxigenación del medio, la concentración de oxígeno no baje hasta valores cercanos a la crítica para que la OUR sea independiente de esta.

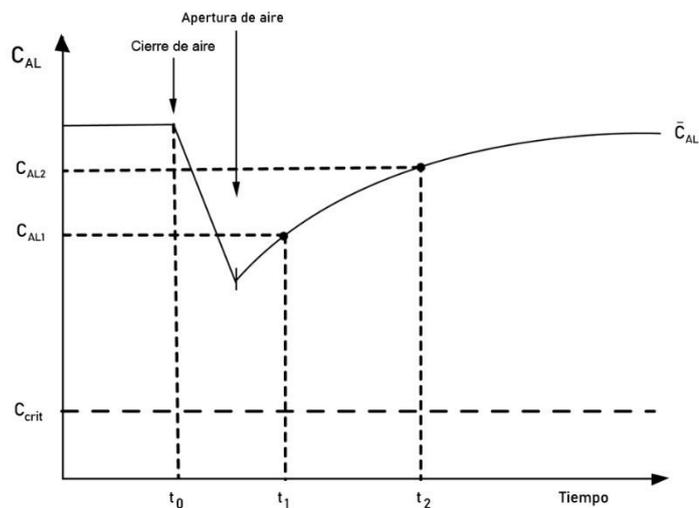


Figura 12. Curva de cambio en la concentración de oxígeno disuelto en función del tiempo durante la medición del $K_L a$ por el método dinámico.

4.3.2.- Medición de la velocidad específica de crecimiento

El cálculo de la velocidad específica de crecimiento del microorganismo en la etapa de crecimiento exponencial se llevó a cabo a partir de la ecuación cinética del proceso (Doran, 2013):

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

$$\int \frac{dX}{X} = \int \mu \cdot dt$$

$$\ln X = \ln X_0 + \mu \cdot (t - t_0)$$

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t - t_0}$$

4.5.- Aislamiento y selección de los microorganismos

De acuerdo con el protocolo indicado en Mason, 1992, se dispusieron las muestras en cristalizadores de vidrio y se procedió a mezclar y reducir el tamaño de partícula. En el caso del agua proveniente de la laguna, se agitó vigorosamente el recipiente que la contenía para homogeneizarla. En tubos Falcon se agregaron 5 ml de agua destilada y 1 g de cada una (1 ml para el caso de la líquida), se agitaron en un vortex por 3 minutos a 2000 rpm y se los dejó reposar 15 minutos. Luego, se utilizaron 2 ml del sobrenadante de cada una para inocular los cultivos de enriquecimiento, los que se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 150 ml. Fueron utilizados 12 matraces con medio de cultivo salino mínimo (MSM), seis fueron suplementados con una mezcla en partes iguales de hidrocarburos (HC; nafta super, diesel y kerosene) y los otros seis con muestra agua extraída de la laguna del predio de la empresa (AgLag) como fuente de carbono. La concentración de las fuentes de carbono utilizadas en cada caso se determinó de acuerdo con la bibliografía consultada. Cuando se utiliza un hidrocarburo como sustrato las concentraciones varían entre el 0,5 % y el 5 % (Chandran & Das, 2014; Mnif et al., 2011; Saimmai et al., 2012; Sharma et al., 2019). En cuanto a la utilización del agua de laguna como sustrato, al ser una fuente diluida de hidrocarburos se seleccionó una concentración superior a la anterior (Mandri & Lin, 2007). De esta manera se optó por utilizar un 3 % de HC y un 25 % de AgLag. Se cultivaron en un agitador orbital a 100 rpm y 25 °C por 3 días. Se llevaron a cabo 8 repiques de cada cultivo, utilizando 1 ml del medio crecido como inóculo.

Para el aislamiento de las cepas microbianas, una alícuota de los cultivos de enriquecimiento fue transferida a las placas de Petri conteniendo 10 ml de MSM con 20 g/l de

agar, suplementadas con 100 µl de HC o AgLag como fuente de carbono. La misma fue distribuida con una espátula de Drigalsky, las placas se dejaron reposar por 2 horas y, luego, se mantuvieron en estufa de cultivo a 25 °C durante 6 días. Con aquellas colonias aisladas, se realizaron repiques seriados, repitiendo el proceso por 3 veces.

4.5.1.- Mantenimiento de las cepas aisladas: Criopreservación

Los microorganismos fueron criopreservados en glicerol 20 % v/v. Para ello, cada una de las cepas fue cultivada en Erlenmeyers de 250 mL conteniendo medio LB y el correspondiente inóculo de cada cepa (1,5 % v/v). Los cultivos fueron inoculados en un shaker a 25 °C, 135 rpm, durante 48 hs. Luego se tomaron alícuotas de 0,960 mL de cultivo más 0,240 mL de glicerol estéril, se colocaron dentro de tubos eppendorf de 1,5 mL y se vortexearon a 1600 rpm por 2 minutos. 10 tubos correspondientes a cada cepa se almacenaron a -18 °C, hasta el momento de su uso. Este procedimiento se repitió cada 6 meses para el mantenimiento de las cepas.

4.5.2.- Selección de cepas con poder tensioactivo

A partir de cada una de las colonias aisladas, se inocularon Erlenmeyers con MSM suplementado con HC y AgLag, para evaluar su producción de tensioactivos. Los cultivos se mantuvieron en un agitador orbital a 100 rpm y 25 °C por 10 días, siendo el criterio de selección la capacidad para disminuir la tensión superficial del sobrenadante libre de células en más de un 30 %.

4.6.- Identificación filogenética de los microorganismos

Aquellas colonias aisladas que mostraron tener capacidad tensioactiva fueron identificadas taxonómicamente.

4.6.1.- Tinción de Gram

A las cepas se les realizó la tinción Gram con un kit comercial (*Sistemas Analíticos S.A., Biopack*).

4.6.2.- Identificación bioquímica

La caracterización bioquímica se realizó utilizando los sistemas de identificación API: API 20 NE (sistema de identificación para bacilos Gram negativos, aerobios, no fermentadores), API 20 Strep (sistema de identificación para estreptococos), API Coryne (sistema de identificación para corinebacterias), según las indicaciones del fabricante BioMérieux, Mercy l'Etoile, Francia.

4.6.3.- Susceptibilidad a antibióticos

Con el fin de ampliar la caracterización de los microorganismos aislados se determinó la susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión de discos en agar. Los antibióticos empleados fueron: eritromicina 15 µg, imipenem 10 µg, ampicilina 10 µg, cefalotina 30 µg, meropenem 10 µg, vancomicina 30 µg, ampicilina 10 µg / sulbactama 10 µg, minociclina 30 µg, penicilina 10 U, piperaciclina 100 µg / tazobactam 10 µg, ciprofloxacina 5 µg.

Las bacterias sembradas en placas de Petri conteniendo medio sólido LB + agar (1,5 %) fueron incubadas 48 hs. Se tomaron colonias aisladas y se resuspendieron en solución fisiológica en tubos falcon de 15 mL, para la obtención de una suspensión bacteriana con un patrón de turbidez de 0,5 en la escala McFarland. Las mismas se inocularon en placas de Petri conteniendo medio sólido LB + agar (1,5%), sin dejar ninguna zona libre, utilizando un hisopo estéril. Las placas se secaron durante 3-5 min y posteriormente se depositaron los discos de antibióticos. Luego de 48 hs de incubación a 25 °C, se midió el halo de inhibición del crecimiento de cada bacteria ante cada antibiótico, para establecer si las bacterias son susceptibles o resistentes a cada antibiótico (EUCAST, 2023; Radice et al., 2011).

4.6.4.- 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 15 mM de MgCl₂, 5 µl de solución 1 mM de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), 0,5 µl de solución 30 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA), 0,3 µl de polimerasa Taq (5 U/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.

4.7.- Estudio de la producción de biosurfactantes con las cepas aisladas

4.7.1.- Producción de biosurfactantes a escala Erlenmeyer utilizando HC y AgLag como sustratos

Con el objetivo de poder evaluar la respuesta a la síntesis de biosurfactantes por parte de las cepas aisladas se llevaron a cabo cultivos en Erlenmeyers de 150 ml con 25 ml de volumen final. Se utilizó MSM y dos fuentes de carbono: una mezcla de nafta super, diesel y kerosene en partes iguales al 4,5 % v/v (HC); o agua de la laguna del predio de la empresa al 25 % v/v (AgLag). Los cultivos se mantuvieron a 100 rpm y 25 °C por 7 días en un agitador orbital y se midió la tensión superficial, distorsión óptica y pH de cada cultivo (inicial y final).

4.7.2.- Potencial producción de biosurfactantes con AgHC a escala Erlenmeyer

Se estudió el potencial de la cepa *AgHC* para producir biosurfactantes a través de estudios en donde se tuvieron como variables principales la concentración de la fuente de carbono y la temperatura de incubación. De esta manera, se realizaron tres cultivos a tres concentraciones diferentes (2 % v/v, 4,5 % v/v y 6 % v/v) de la fuente de carbono (HC + MSM) y a cada uno de ellos se los incubaron a 21°C, 25°C y 29°C respectivamente, a 120 rpm durante 6 días. Los ensayos fueron realizados a escala Erlenmeyer por duplicado. Se utilizó 1 ml de una solución con una densidad óptica de 0,200 que contenía la cepa *Ag HC* como inóculo y se estimó la concentración de biomasa (PS), tensión superficial (TS), distorsión óptica en policubeta (MPA) y pH en cada muestra. Se utilizó la medida de la tensión superficial como indicador indirecto de la producción de biosurfactantes.

4.7.3.- Potencial producción de biosurfactantes a escala biorreactor de laboratorio

La condición que evidenció mejores resultados en escala Erlenmeyer fue evaluada en un biorreactor modelo BioFlo 115 (*New Brunswick Scientific Co.*) con un vaso encamisado de 3 litros de capacidad total, un agitador mecánico con dos turbinas de tipo Rushton y un sistema de distribución de aire con un difusor circular ubicado debajo del agitador. Este estudio MSM suplementado con HC a 200 rpm, pH 7, 25 °C por 7 días. Se tomaron muestras diarias para determinar la concentración de biomasa (PS), pH, tensión superficial (TS), distorsión óptica (MPA) y capacidad emulsificadora. Además, se determinó el coeficiente global de transferencia de oxígeno (K_{La}) del sistema a través del método dinámico de estimación del K_{La} (Doran, 2013; Garcia-ochoa & Gomez, 2009).

4.7.4.- Estimación de la producción de biosurfactantes

Se evaluó la capacidad de las cepas de producir tensioactivos por la medición directa de la tensión superficial (TS) del sobrenadante de cultivo. Resulta importante medir esta magnitud debido a que muchas bacterias degradadoras de hidrocarburos producen biosurfactantes y estos disminuyen el valor de esta magnitud. Los compuestos tensioactivos permiten emulsionar hidrocarburos en disolución acuosa, aumentando la biodisponibilidad de estos últimos (Patowary et al., 2017).

La TS se midió empleando un equipo tensiómetro Attension Sigma Force Tensiometer 702 (Biolin Scientific Holding AB), mediante el método anillo de Du Nouy (Walter et al., 2010; Youssef et al., 2004). Para ello se utilizaron los 18 ml de sobrenadante de cultivo centrifugado a 13500 rpm, a 19 °C durante 15 minutos, obtenidos del ensayo de estimación de biomasa. Se realizaron 12 medidas sobre cada muestra y se registró la media y el desvío estándar de los resultados. El control de cada medición fue el medio de cultivo sin inocular, cultivado en las mismas condiciones que cada muestra.

Se complementó la estimación de la producción de biosurfactantes con: ensayo de distorsión óptica en policubeta (MPA), de emulsificación (E_{24}) y de hemólisis. El primero de ellos se realizó en una policubeta de 96 hoyos utilizando 100 μ l de agua destilada estéril como control. La policubeta se dispuso sobre una hoja con un grillado perpendicular y en cada orificio se introdujo 100 μ l de sobrenadante de cultivo libre de células de cada muestra (Chen et al., 2007; Walter et al., 2010).

Para el ensayo de emulsificación se utilizó un método publicado previamente (Cooper & Goldenberg, 1987) con una modificación, además de kerosene se utilizó n-hexano, aceite de girasol y nafta super como fases orgánicas. La técnica de hemólisis se realizó en placas de agar sangre base tripticasa soya (TSA) inoculadas con las cepas aisladas. El ensayo se llevó a cabo a 25 °C y 37 °C, donde se evaluó el tipo de hemólisis luego de 24 hs y 48 hs (Carrillo et al., 1996; Youssef et al., 2004).

4.7.5.- Técnicas de purificación de biosurfactantes

Se llevó a cabo a través de un proceso de precipitación en medio ácido, 24 ml de muestra que se centrifugaron a 13500 rpm y 19 °C por 15 min. El sobrenadante fue acidificado a pH 2 con una solución 1 M de HCl y 18 ml de este fueron centrifugados a 13500 rpm y 4 °C por 20 min. El pellet obtenido se secó en estufa a 80 °C por 1 hora y, luego, por diferencia de peso se calculó la concentración de biosurfactante en g/l (Nair et al., 2020).

4.8.- Evaluación de fuentes de carbono alternativas para la producción de biosurfactantes

4.8.1.- Medio de cultivo suplementado con glucosa y glicerol.

Continuando con los estudios sobre el crecimiento y producción de biosurfactantes de *Pseudomonas* sp. Ag HC, se llevó a cabo un ensayo de cultivo en dos etapas a escala Erlenmeyer. En una primera etapa, se utilizó MSM suplementado con dos fuentes de carbono por ensayo:

Por un lado se empleó glucosa (20 g/l) como fuente de carbono y por otro lado glicerol (3 %v/v). Los cultivos fueron incubados a 25 °C y 135 rpm por 48 horas en un agitador orbital, tomándose muestras a las 0, 24 y 48 horas, para determinar concentración de biomasa, pH, tensión superficial y distorsión óptica en policubeta. Se utilizó como inóculo 2 ml de una solución con una absorbancia de 0,100 (a 600 nm) que contenía a la cepa Ag HC y el medio de cultivo sin inocular como control.

A las 48 horas de cultivo, se separó la biomasa producida por centrifugación a 3500 rpm durante 20 minutos. Ésta se utilizó para la segunda etapa del ensayo por lo que se la transfirió a Erlenmeyers con MSM suplementado con HC (4,5 %v/v) que se cultivaron en un agitador orbital a 135 rpm y 25 °C por 72 horas más (5 días en total). Se tomaron muestras al día 2, 3, 4 y 5, y se determinó concentración de biomasa, pH, tensión superficial y distorsión óptica en policubeta. Los

ensayos se llevaron a cabo por triplicado y el medio de cultivo completo sin inocular fue empleado como control.

4.8.2.- Evaluación de la producción de biosurfactantes utilizando glicerol como fuente de carbono

En línea con el desarrollo de bioprocesos económicamente viables, se llevó a cabo un experimento en matraces Erlenmeyers utilizando, como única fuente de carbono y energía, glicerol. Este es un sustrato de bajo costo y que puede obtenerse como co-producto del biodiesel, aunque inicialmente se utilizó glicerol grado analítico para evaluar el comportamiento de la cepa *AgHC*. Se utilizó medio MSM suplementado con glicerol grado analítico (3 % v/v) como fuente de carbono y energía, a 135 rpm y 25 °C por 4 días. 6,7 ml de una solución con una densidad óptica de 0,200 a 600 nm de longitud de onda que contenía a la cepa *Ag HC* fue utilizada como inóculo, y como cultivo control se utilizó MSM suplementado con glicerol (3 %v/v) sin inocular. Los ensayos se condujeron por triplicado. Se tomó una muestra por día y se midió concentración de biomasa, pH, valor de la tensión superficial y se purificó el biosurfactante a partir de una precipitación ácida.

4.8.2.1- Determinación de la concentración micelar crítica (CMC)

La CMC es la mínima concentración a partir de la cual las moléculas de biosurfactante se agregan formando micelas. Se llevó a cabo la determinación de la CMC del biosurfactante precipitado a partir de un proceso de diluciones seriadas en agua destilada del mismo, con la correspondiente medición de la tensión superficial. Para realizar las mediciones se utilizó un tensiómetro Attension Sigma Force Tensiometer 702 (Biolin Scientific Holding AB), mediante el método anillo de Du Nouy. Luego se graficaron los resultados y se determinó la concentración de biosurfactante precipitado para la cual la curva de TS sufre un cambio brusco de pendiente (CMC) (*Figura 13*).

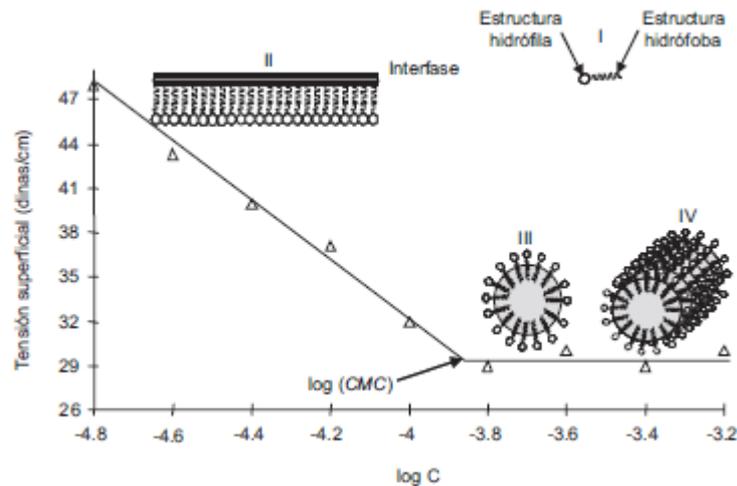


Figura 13. Representación del arreglo de moléculas de un tensioactivo en concentraciones cercanas a la CMC. I: Molécula de tensioactivo. II: Monómeros por debajo de la CMC. III: Micelas por encima de la CMC. IV: Arreglos cilíndricos de micelas a concentraciones mucho mayores a la CMC. (Jiménez Islas et al., 2010).

4.9- Optimización del medio de cultivo para la producción de biosurfactantes

4.9.1.- Concentración de fuente de carbono y temperatura de incubación

Se realizó un diseño central compuesto con el objetivo de determinar un modelo empírico del efecto y las interacciones de dos factores (variables) en la producción de biosurfactantes (respuesta). Dentro de los costos de producción, el de la fuente de carbono puede llegar a suponer hasta el 80 % del total de la materia prima y el costo de los servicios auxiliares para calentar o enfriar el fermentador hasta el 93 % (Ashby et al., 2013). Por ello, las variables seleccionadas fueron temperatura y concentración de glicerol, utilizado como fuente de carbono y energía. Como respuesta se utilizó la concentración de biosurfactante obtenida. En la *Tabla 2* se muestran los rangos de los componentes (Fontes et al., 2010; Silva et al., 2010).

Tabla 2. Rango experimental de las variables independientes para el diseño central compuesto utilizado para optimizar la producción de biosurfactantes.

Factor	Mínimo	Medio	Máximo
Concentración de Sustrato (%v/v)	5	7,5	10
Temperatura (°C)	20	25	30

El diseño central compuesto basado en el número de factores seleccionados se muestra en la *Tabla 3*; se llevaron a cabo 13 experimentos teniendo en cuenta los niveles de los factores allí indicados.

Para el diseño de los experimentos, el análisis de regresión de datos experimentales y los gráficos de relación entre las variables, fue utilizado el software Minitab 19®. Los valores óptimos fueron obtenidos resolviendo la ecuación de regresión y analizando el gráfico de superficie de respuesta. La información obtenida a partir del diseño central compuesto fue sometida a un análisis de varianza (ANOVA) para verificar los errores y la significancia de cada parámetro. El comportamiento del sistema experimental puede ser explicado a partir de una ecuación cuadrática de la forma (Hippolyte et al., 2018; Nickzad et al., 2018).

$$\hat{Y} = b_0 + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_{11} \cdot X_1^2 + b_{22} \cdot X_2^2 + b_{12} \cdot X_1 \cdot X_2$$

donde \hat{Y} es la respuesta, X_1 y X_2 las variables independientes codificadas, b_0 el término de compensación, b_1 y b_2 los efectos lineares, b_{11} y b_{22} los efectos cuadráticos y b_{12} el término de interacción.

Tabla 3. Combinación de los factores para los experimentos llevados a cabo utilizando un diseño central compuesto

Experimento N°	Concentración de Sustrato (%v/v)	Temperatura (°C)
1	7,50	25,00
2	7,50	25,00
3	11,04	25,00
4	5,00	20,00
5	10,00	30,00
6	7,50	25,00
7	5,00	30,00
8	7,50	25,00
9	7,50	25,00
10	7,50	32,07
11	7,50	17,93
12	10,00	20,00
13	3,96	25,00

Los ensayos experimentales, se llevaron a cabo en Erlenmeyers con MSM suplementado con glicerol y fueron mantenidos en un agitador orbital a 135 rpm por 4 días. La concentración de glicerol en el medio y la temperatura del proceso se establecieron de acuerdo con las condiciones de cultivo detalladas en la *Tabla 3*. El inóculo utilizado fue de 3,6 ml del cultivo de *Pseudomonas* sp. *Ag HC* (DO a 600 nm: 0,200). Se tomaron muestras al inicio y a los 4 días de cultivo, y se determinó la concentración de biomasa, pH y valor de la tensión superficial. A la muestra obtenida a los 4 días se le determinó la concentración de biosurfactante a partir de una precipitación ácida.

Teniendo en cuenta la combinación óptima de los factores obtenida a partir del estudio estadístico, se analizó el crecimiento de la cepa y la producción de biosurfactantes a mayor escala. Para ello, se llevó a cabo un ensayo en un biorreactor BioFlo 115 (New Brunswick Scientific Co.) con un vaso encamisado de volumen operativo de 2000 ml. Este sistema se operó a 26,9 °C y 200 rpm por el término de 4 días. Se utilizó MSM suplementado con glicerol como única fuente de carbono y energía a una concentración de 7,6 % v/v y se tomaron muestras diarias para determinar la concentración de biomasa, pH y el valor de la tensión superficial. Se evaluó la concentración de biosurfactantes a partir de una precipitación ácida. Se utilizaron 89 ml de una solución que contenía la cepa *Ag HC* (DO a 600 nm: 0,200) como inóculo y medio de cultivo sin inocular como control.

4.9.2.- Concentración de fuente de nitrógeno y fósforo

La producción de biosurfactantes se ve afectada por múltiples causas, como los componentes del medio de cultivo y ciertos factores ambientales (Gakpe, 2008). En los componentes del medio de cultivo resaltan la fuente de nitrógeno y la de fósforo, además del sustrato, ya que tienen un papel importante en la síntesis de los componentes celulares y de los tensioactivos (Mehdi et al., 2011). Por esto, se llevó a cabo un análisis de las concentraciones óptimas de nitrógeno (NaNO_3) y fósforo (KH_2PO_4) en el medio de cultivo, utilizando como respuesta la concentración de biosurfactantes, utilizando el diseño central compuesto mencionado en el inciso 4.9.1. En la *Tabla 4* se muestran los rangos de los componentes, que fueron determinados en base a valores evaluados previamente para la producción de diversos biosurfactantes por (Francisca et al., 2010; Peekate et al., 2017; Suja et al., 2014).

Los Erlenmeyers con medio MSM suplementado con glicerol (7,6 %v/v) fueron mantenidos en un agitador orbital a 135 rpm y 26,9 °C por 4 días, tiempo en el que se alcanza la etapa de crecimiento estacionario. La concentración de NaNO_3 y de KH_2PO_4 en el medio se establecieron de acuerdo con las condiciones de cultivo (*Tabla 5*). Se utilizó como inóculo para

los ensayos 3,6 ml de una solución con una densidad óptica de 0,200 a 600 nm, que contenía la cepa del microorganismo seleccionado (*Pseudomonas* sp. Ag HC). Se tomaron muestras al inicio y a los 4 días de cultivo, y se determinó la concentración de biomasa, pH y valor de la tensión superficial. A la muestra obtenida a los 4 días se le determinó la concentración de biosurfactante a partir de una precipitación ácida.

Tabla 4. Rango experimental de las variables independientes para el diseño central compuesto utilizado para optimizar la producción de biosurfactantes.

<i>Factor</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Medio</i>	<i>Máximo</i>
<i>C(100):N</i>	3	11,5	20
<i>C(100):P</i>	0,5	2,25	4

C(100):N y *C(100):P* quiere decir que la cantidad de *N* y *P* están indicadas por cada 100 partes de carbono (*C*).

En la *Tabla 5* se presenta el diseño central compuesto formado por un total de 13 experimentos utilizado para determinar el modelo empírico que correlaciona la concentración de las fuentes de nitrógeno y fósforo con la producción de biosurfactantes.

Tabla 5. Combinación de los factores para los experimentos utilizando una matriz CCD

<i>Experimento N°</i>	<i>N</i>	<i>P</i>	<i>NaNO₃ (g/l)</i>	<i>KH₂PO₄ (g/l)</i>
1	0	0	26,162	3,220
2	0	0	26,162	3,220
3	1	1	45,499	6,097
4	1	-1	45,499	0,342
5	0	0	26,162	3,220
6	1	0	45,499	3,220
7	0	0	26,162	3,220
8	0	-1	26,162	0,342
9	-1	1	6,825	6,097
10	-1	0	6,825	3,220
11	-1	-1	6,825	0,342
12	0	1	26,162	6,097
13	0	0	26,162	3,220

Al igual que en el ítem 4.9.1, se utilizó el software estadístico Minitab19® para el diseño de los experimentos, análisis de regresión de los datos experimentales y los gráficos de la relación entre los factores y la respuesta.

Con la combinación óptima de valores de concentración de NaNO_3 y de KH_2PO_4 obtenidos a escala Erlenmeyer, se llevó a cabo un ensayo en un biorreactor BioFlo 115 (New Brunswick Scientific Co.) con un vaso encamisado de volumen operativo de 2000 ml. Este sistema se operó a $26,9\text{ }^\circ\text{C}$ y 200 rpm por el término de 4 días. Se utilizó MSM suplementado con glicerol como única fuente de carbono y energía a una concentración de 7,6 % v/v y se tomaron muestras diarias para determinar la concentración de biomasa, pH y el valor de la tensión superficial. Además, a la muestra extraída a los 4 días se le evaluó la concentración de biosurfactantes a partir de una precipitación ácida. El inóculo utilizado fue de 3,6 ml del cultivo de *Pseudomonas* sp. Ag HC (DO a 600 nm: 0,200) y como control se utilizó una muestra del medio de cultivo sin inocular obtenida antes del inicio del experimento.

Debido a la gran cantidad de espuma observada en cultivos previos, se optó por colectarla y evaluar el contenido de biosurfactantes en ella. Con este objetivo se utilizó una trampa de espuma conectada a una tubuladura en la tapa del reactor cuyo objetivo es el de colectar y acumular la espuma generada. Esta muestra fue analizada de la misma manera que los sobrenadantes de cultivo.

4.9.3.- Evaluación de la producción de biosurfactantes a partir de glicerol clarificado de la industria del biodiesel.

Actualmente, el costo de producción de los biosurfactantes resulta mayor al de los surfactantes sintéticos en general, es por eso por lo que continuamente se evalúan distintas alternativas para disminuirlos y llevar adelante procesos más económicos. Teniendo en cuenta que en la producción de biodiesel se genera alrededor de un 10 % de glicerol entre los productos de la transesterificación y que se producen unos 4,5 millones de toneladas al año de biodiesel (He et al., 2017; MAGYP, 2018), el glicerol clarificado obtenido como co-producto resulta un interesante sustrato para la producción de biosurfactantes. Por ello, se llevó a cabo un ensayo en matraces Erlenmeyers utilizando como única fuente de carbono y energía glicerol clarificado co-producto de la industria del biodiesel (GLYBIO). Las condiciones de cultivo seleccionadas fueron aquellas que resultaron óptimas en los ensayos previos, por lo que se utilizó medio MSM optimizado

suplementado con GLYBIO (7,6 % v/v) como fuente de carbono y energía, a 135 rpm y 26,9 °C por 4 días. El inóculo utilizado fue de 3,6 ml del cultivo de *Pseudomonas* sp. Ag HC (DO a 600 nm: 0,200) y como control se utilizó el medio de cultivo sin inocular. Se tomó una muestra por día y se midió concentración de biomasa, pH y valor de la tensión superficial. Los cultivos se realizaron por triplicado y, al finalizar el ensayo, se procedió a purificar el biosurfactante del cultivo a partir de una precipitación ácida.

4.10.- Análisis por HPLC

El análisis se llevó a cabo en un equipo Shimadzu LC-20AC con inyector manual, horno de columna, bomba cuaternaria y detector de arreglo de diodos (PDA), corriendo con un caudal de 1 ml/min. En todos los casos, el volumen de muestra inyectada fue de 20 μ l.

El método utilizado para la detección del biosurfactante resulta de una modificación a un método publicado previamente (Nielsen et al., 2002). Se utilizó una columna Intersil ODS-3 C18 (30 mm x 1,0 mm x 5 μ m) calefaccionada a 40°C, por la que circuló un gradiente de dos fases móviles: FMA: H₃PO₄ 0,1% en agua pura grado HPLC; y FMB: acetonitrilo (ACN). El gradiente utilizado fue:

Tabla 6. Gradiente de fase móvil utilizado.

<i>Tiempo (min)</i>	<i>FMA (%)</i>	<i>FMB (%)</i>
0	100	0
30	0	100

Los cromatogramas fueron obtenidos a una longitud de onda de 220 nm.

4.11.- Análisis estadístico

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 de la prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.- Análisis de las Muestras de Suelo

La ciudad de Campana se ubica en el Delta del río Paraná, el cual transporta depósitos de sedimentos cuyo destino final será el Río de la Plata. El principal material originario de los suelos es fango fluvial, constituyente del aluvión no consolidado. El relieve característico de la zona tiene como principal factor al régimen fluvial que produce frecuentes inundaciones. Cuando el agua se retira, los sedimentos no depositados se ven retenidos por la vegetación elevando el nivel de las márgenes respecto del interior de las islas y tierra firme, conformando el *albardón perimetral* (Álvarez et al., 2009). Estas zonas presentan suelos con bajo contenido de materia orgánica, valores de pH entre 5 y 6 y relación C/N inferiores a 14 (Hapludoles ácuicos) (Álvarez et al., 2009). Por otro lado, las zonas bajas presentan suelos que se caracterizan por sus valores altos de materia orgánica (hasta 40 %), bajos valores de pH (entre 4 y 5) y relaciones C/N altas, de más de 16 (Haplacuentes aéricos y Haplacuoles hísticos).

En los resultados de los ensayos (ver *Anexo I*) se observó la presencia de un 9,5 % de hidrocarburos totales en una de las muestras únicamente. Con respecto al resto de los resultados, el resultado fue no cuantificable por los protocolos llevados a cabo, indicando una concentración de compuestos orgánicos e hidrocarburos volátiles, semivolátiles despreciable. Esto último puede deberse a la presencia de compuestos de menor masa molecular, de menor punto de ebullición y/o más hidrofílicos que son eliminados por métodos físicos o se dispersan más fácilmente. Por el contrario, en todas las muestras analizadas se detectó la presencia de hidrocarburos poliaromáticos, algo que *a priori* se suponía debido a que generalmente cuando se trata con sitios crónicamente contaminados, los principales compuestos presentes son de naturaleza más recalcitrantes.

5.2.- Aislamiento y Selección de los Microorganismos

A partir de las muestras recolectadas en la refinería se llevaron adelante cultivos para el aislamiento y selección de microorganismos con potencial para la producción de biosurfactantes. Estos se desarrollaron a escala Erlenmeyer y, luego de varios repiques, se pudieron aislar 13 colonias con morfologías diferentes. Cada una de las muestras aisladas fue designada de acuerdo con el lugar de extracción de la muestra (ver apartado 4.1.1.- *Muestras*). En la *Figura 14* se observan los cultivos y placas realizados.

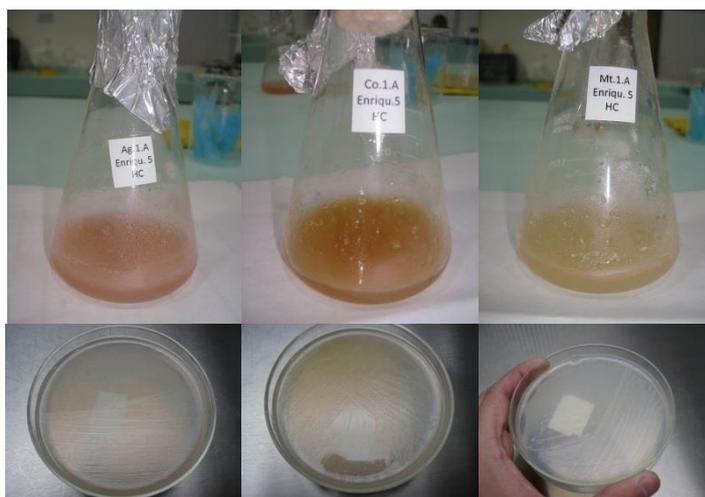


Figura 14. Cultivos de enriquecimiento y placas realizadas con el objetivo de lograr el aislamiento de cepas degradadoras de hidrocarburos.

Las colonias aisladas en placas fueron repicadas en medio líquido a escala Erlenmeyer y se midió la tensión superficial del medio de cultivo, como una medida de la potencial capacidad para producir biosurfactantes que posee cada una. Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla 7*.

Tabla 7. Resultados de las medidas de tensión superficial de las muestras aisladas. Se observa TS promedio, desvío estándar y porcentaje de disminución del valor de TS de cada una de las colonias.

Muestra	<i>Lg</i> <i>HC</i>	<i>Mt</i> <i>HC</i>	<i>Co</i> <i>HC</i>	<i>Ag</i> <i>HC</i>	<i>Tk2</i> <i>HC</i>	<i>Tk1</i> <i>HC</i> A	<i>Tk1</i> <i>HC</i> B	<i>Lg</i> <i>Ag</i> <i>Lag</i>	<i>Mt</i> <i>Ag</i> <i>Lag</i>	<i>Co</i> <i>Ag</i> <i>Lag</i>	<i>Ag</i> <i>Ag</i> <i>Lag</i>	<i>Tk2</i> <i>Ag</i> <i>Lag</i>	<i>Tk1</i> <i>Ag</i> <i>Lag</i>	Control
TS Prom (mN/m)	49,8	46,7	45,0	49,2	50,3	53,9	52,4	65,5	70,8	62,6	69,8	69,8	73,1	75,0
Desvío estándar	3,0	3,2	2,2	5,5	5,9	1,4	2,7	9,2	4,1	13,0	7,1	4,9	1,5	0,6
% Disminución	33,7	37,7	39,9	34,4	28,2	32,9	30,2	12,6	5,6	16,6	7,0	7,0	2,5	0,0

Se puede observar que las cepas que crecieron en medio salino mínimo con hidrocarburos como fuente de carbono (HC) redujeron la tensión superficial del medio en más de un 30 %

(parámetro tomado como valor de referencia para la selección de los microorganismos). Resultados similares a estos fueron hallados en la bibliografía cuando se cultivaron cepas aisladas en sitios crónicamente contaminados con hidrocarburos, utilizando estos como sustrato del medio de cultivo (Zhang et al., 2012). Por otro lado, en aquellas muestras cultivadas con agua de la laguna (AgLag) no se observó una disminución significativa del valor de la tensión superficial.

En relación con los resultados del ensayo en policubeta, se observó una tendencia similar a la descrita anteriormente, aquellas muestras cuya única fuente de carbono fueron hidrocarburos presentaron distorsión óptica, mientras que las cepas cultivadas con agua de la laguna no exhibieron dicha capacidad (*Figura 15*).

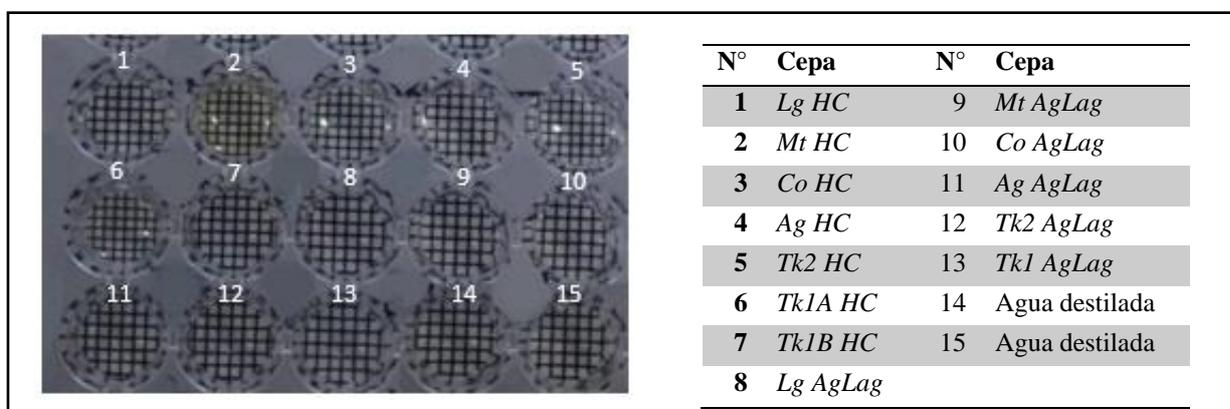


Figura 15. Resultados del estudio en policubeta.

En el estudio de emulsificación, se evaluó la capacidad del sobrenadante de cultivo de formar una emulsión frente a 4 fases orgánicas diferentes (aceite de girasol, diésel comercial, kerosene y nafta súper). En base a esto, el sobrenadante de cada una de las 13 colonias se ensayó con cada una de las 4 fases orgánicas, por lo que se analizaron 52 muestras en total de las que sólo 3 lograron mantener la emulsión formada luego de 1 día. De estas 3, ninguna alcanzó el 50 % del parámetro de referencia E_{24} , por lo que se concluye que las muestras aisladas carecen de capacidad emulsificadora. Esto no resulta extraño, ya que diversos autores han reportado una falta de correlación entre la capacidad para formar y mantener emulsiones, y la capacidad tensioactiva de un biosurfactante (Plaza et al., 2006; Willumsen & Karlson, 1997). Como se mencionó en el apartado 4.2 de la introducción, los biosurfactantes se clasifican en compuestos de bajo y alto peso molecular (LMW y HMW). Cada uno de estos grupos posee una característica particular, los primeros poseen buena capacidad tensioactiva y los últimos buena capacidad emulsificadora. En base a esto, los resultados obtenidos nos estarían indicando que los biosurfactantes producidos por las cepas aisladas son moléculas de bajo peso molecular.

En cuanto a la prueba de hemólisis en placas de agar sangre, ninguna de las 13 colonias aisladas exhibió actividad hemolítica significativa al cabo de 48 horas. Debido a que hay biosurfactantes que no poseen actividad hemolítica (Das et al., 2008), la ausencia de hemólisis no implica ausencia de producción de biosurfactantes.

5.3.- Identificación filogenética de los microorganismos

5.3.1.- Tinción de Gram

Se llevó a cabo la tinción de Gram de las colonias aisladas. Los resultados se pueden observar en la *Tabla 8* y en la *Figura 16*.

Tabla 8. Resultados de la tinción de Gram de los microorganismos aislados.

<i>Ag HC</i>	<i>Mt HC</i>	<i>Co HC</i>	<i>Lg HC</i>	<i>Tk1 HC B</i>	<i>Tk1 HC A</i>
Bacilo - Coco Bacilo	Bacilo - Coco Bacilo	Cocos	Bacilo - Coco Bacilo	Coco - Coco Bacilo	Bacilo - Coco Bacilo
Gram Negativo	Gram Negativo	Gram Negativos	Gram Negativo	Gram Positivo	Gram Negativo



Figura 16. Tinción de Gram de la muestra de la cepa *Ag HC* vista en un microscopio óptico con un objetivo de 100x.

5.3.2.- Identificación Bioquímica

Para obtener más información sobre los microorganismos aislados también se realizaron pruebas bioquímicas comerciales (Kits API comerciales) que permitieron obtener perfiles

metabólicos numéricos asociados a distintos géneros de microorganismos. En la *Figura 17* se observan las reacciones colorimétricas (galerías inoculadas) de estos kits para una de las cepas, estas se deben constatar con la base de datos *API WEB* (versión 7.0 para API 20 Strep y API 20 NE, y versión 3.0 para API Coryne).



Figura 17. Reacciones colorimétricas para uno de los microorganismos bajo estudio (*Ag HC*). Arriba: KIT API 20NE y la reacción de la enzima oxidasa a su derecha. Medio: KIT API Coryne. Abajo: KIT API 20 Strep.

Los perfiles numéricos y los resultados obtenidos a partir de ellos se visualizan en la *Tabla 9* y *Tabla 10*, respectivamente.

Tabla 9. Perfiles numéricos hallados a partir de los kits API de identificación de microorganismos.

Método	<i>Ag HC</i>	<i>Mt HC</i>	<i>Co HC</i>	<i>Tk1 HC B</i>	<i>Lg HC</i>	<i>Tk1 HC A</i>
API 20 Strep	0040000/00	0160000/01	0160000/41	4240004/42	0040000/00	2040004/20
	41000	60002	64000	46017	41000	40104
API Coryne	0002000	2010002	4350521	3470721	1000000	3100000
API 20 NE	0047555/01	0447724/04	0447734/04	1463600/14	1000475/10	1040454/31
	47555	67724	77734	73700	46775	40454

Tabla 10. Resultados obtenidos a partir de los ensayos bioquímicos con los diferentes kits API.

Muestra	Ensayo	Resultado
Ag HC	API 20 Strep	85% identidad respecto de <i>Gemella morbillorum</i> .
	API Coryne	Identificación no válida.
Mt HC	API 20 NE	99,9% identidad respecto de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .
	API 20 Strep	63,4 % identidad respecto de <i>Gemella haemolysans</i> (24 hs de incubación).
Co HC	API Coryne	Identificación dudosa, 62 % identidad respecto de <i>Arcanobacterium bernardiae</i> .
	API 20 NE	99,8 % identidad respecto de <i>Sphingomonas paucimobilis</i> .
Tk 1 HC B	API 20 Strep	63,1 % identidad respecto de <i>Gemella haemolysans</i> (4hs). Perfil inaceptable (24 hs).
	API Coryne	Perfil inaceptable.
Lg HC	API 20 NE	Perfil inaceptable.
	API 20 Strep	Perfil inaceptable.
Tk 1 HC A	API Coryne	Identificación dudosa, 98,6 % identidad respecto de <i>Cellulomonas spp./Microbacterium spp.</i>
	API 20 NE	94,2 % (24 hs) y 83,1 % (48 hs) identidad respecto de <i>Sphingomonas paucimobilis</i> .
Lg HC	API 20 Strep	56 % (4 hs) y 85 % (24 hs) identidad respecto de <i>Gemella morbillorum</i> .
	API Coryne	Identificación dudosa, 93,8 % identidad respecto de <i>Corynebacterium propinquum</i> .
Tk 1 HC A	API 20 NE	Identificación no válida (24 hs). 39,2 % identidad respecto de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (48 hs).
	API 20 Strep	Identificación dudosa, 54,5 % identidad respecto de <i>Aerococcus urinae</i> (24 hs).
Tk 1 HC A	API Coryne	Identificación dudosa, 83,3 % identidad respecto de <i>Corynebacterium propinquum</i> .
	API 20 NE	Perfil con baja discriminación, 52,6 % identidad respecto de <i>Pseudomonas stutzeri</i> (24 hs). Identidad dudosa, 64,3 % identidad respecto de <i>Plesiomonas shigelloides</i> (48 hs).

5.3.3.- Identificación genética

Se comparó las secuencias obtenidas de la amplificación del ARNr16s de los microorganismos aislados, en donde se obtuvieron secuencias de alrededor de 1400 nucleótidos y se las comparó con 3 bases de datos diferentes. Se encontró que las cepas aisladas correspondientes a Ag HC, Mt HC, Lg HC y Tk1 HC B pertenecen al género *Pseudomonas*, y Tk1 HC A al *Cellulosimicrobium*. La muestra Co HC no pudo ser identificada genéticamente ya que la secuenciación de su material genético arrojó resultados compatibles con la presencia de más de un tipo de microorganismo.

Según las bases de datos de EZBioCloud y SeqMatch RDP, los resultados obtenidos se observan en la Tabla 11:

Tabla 11. Resultados obtenidos a partir del análisis del ARNr16s de las cepas aisladas

Muestra	Resultado	Grupo al que pertenecería según Mulet et al., 2010.
Ag HC	99,3 % identidad respecto de <i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 (T) (AF468452)	<i>P. fluorescens</i>
Mt HC	99,6 % de identidad respecto de <i>Pseudomonas kunmingensis</i> (HL22-2(T)) (JQ246444) (EZBioCloud)	<i>P. oleovorans</i> , <i>P. stutzeri</i> o <i>P. aeruginosa</i>
Lg HC	99,86 % de identidad respecto de <i>Pseudomonas veronii</i> (CIP 104663 (T)) (AF0644660)	<i>P. fluorescens</i>
Tk 1 HC B	100 % de identidad respecto de <i>Pseudomonas panipatensis</i> (Esp-1(T)) (EF424401)	<i>P. aeruginosa</i>
Tk 1 HC A	99,7 % de identidad respecto de <i>Cellulosimicrobium funkei</i> (ATCC BAA-886 (T)) (AY501364).	No corresponde

5.4.- Selección de microorganismos potencialmente productores de biosurfactantes

Se observó que en el caso particular de la cepa de *Pseudomonas* sp. Ag HC, de los resultados de la tinción de Gram, identificación bioquímica y filiación genética fueron consistentes entre sí. Sumado a esto, demostró una buena capacidad para disminuir la tensión superficial del medio de cultivo cuando se la hizo crecer utilizando hidrocarburos como único sustrato (Tabla 7), manteniendo estas propiedades luego de 6 meses en criopreservación. Por todo ello, *Pseudomonas* sp. Ag HC fue la seleccionada para continuar con los estudios. En la Figura 18 se ven dos imágenes de la cepa Ag HC tomadas con un microscopio electrónico de barrido (SEM), las cuales fueron obtenidas en el Centro de Microscopías Avanzadas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires.

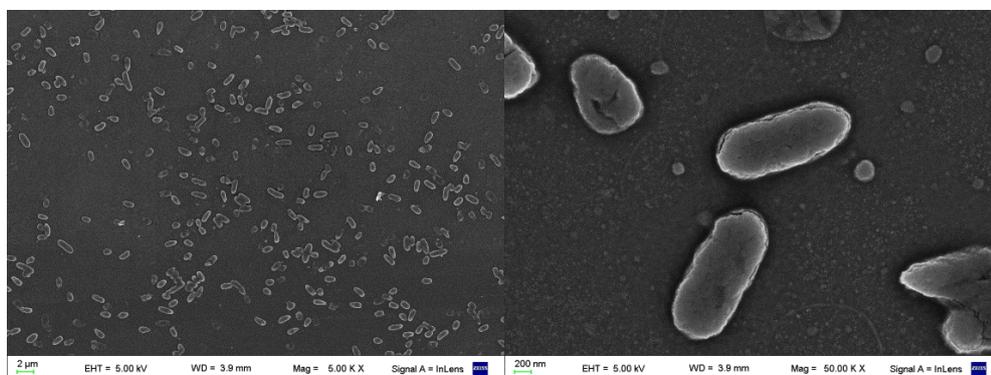


Figura 18. Fotografías tomadas con un microscopio electrónico de barrido (SEM), luego de un tratamiento superficial con oro.

5.5.- Resistencia a antibióticos

Con el fin de obtener más información acerca del perfil metabólico de la cepa en estudio, se llevaron a cabo ensayos de resistencia a diferentes tipos de antibióticos. Esto nos permitirá, en un futuro, estudiar la presencia de genes que confieran resistencia a estos compuestos y a su vez estén relacionado con la metabolización de compuestos derivados del petróleo.

En la *Figura 19* se observa inhibición del crecimiento de la cepa frente a 5 de los 11 antibióticos ensayados: Minociclina, Meropenem, Ciprofloxacina, Imipenem y Piperacilina + Tazobactama. Estos resultados se obtuvieron a partir de la comparación de los diámetros experimentales de los halos con los estandarizados en la bibliografía (EUCAST, 2023), y se muestran en la *Tabla 12*.



Figura 19. Ensayo de resistencia a antibióticos de *Pseudomonas* sp. Ag HC. Se observa el halo de inhibición del crecimiento frente a Minociclina, Meropenem, Ciprofloxacina, Imipenem y Piperacilina + Tazobactama.

A partir de la secuenciación del ARN16s se determinó que la cepa Ag HC posee un 99,3 % de identidad respecto de *Pseudomonas koreensis*. De acuerdo con Ryan K, 2004, el género *Pseudomonas* sp. es uno de los pocos que posee resistencia a los antibióticos beta-lactámicos, como la penicilina y sus derivados, cefalotina, etc., y es sensible frente a cefalosporinas, antibióticos carbapenémicos y monobactámicos. Esto se ve reflejado en los resultados obtenidos, ya que la cepa AgHC resultó ser resistente a ampicilina, eritromicina, cefalotina, vancomicina y penicilina, mientras que evidenció sensibilidad frente a minociclina, meropenem, ciprofloxacina, imipenem, piperacilina-tazobactam. Estudios con cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, productoras de biosurfactantes, han demostrado que poseen un perfil de resistencia a antibióticos similar al hallado en nuestros estudios (Jiménez et al., 2015).

Tabla 12. Resultados observados a partir del ensayo de resistencia a antibióticos con *Pseudomonas* sp. Ag HC.

Antibióticos	Ag HC
Minociclina 30 µg	Sensible
Ampicilina 10 µg	Resistente
Eritromicina 15 µg	Resistente
Meropenem 10 µg	Sensible
Ampicilina 10 µg Sulbactama 10 µg	Resistente
Cefalotina 30 µg	Resistente
Ciprofloxacina 5 µg	Sensible
Vancomicina 30 µg	Resistente
Imipenem 10 µg	Sensible
Penicilina 10 U	Resistente
Piperacilina 100 µg Tazobactam 10 µg	Sensible

5.6.- Producción de biosurfactantes con *Pseudomonas* sp. AgHC a escala Erlenmeyer

En una primera instancia se llevaron a cabo estudios para evaluar la síntesis de biosurfactantes por parte de la cepa de *Pseudomonas* sp. Ag HC, donde se tuvieron en cuenta como variables directamente implicadas a la temperatura de incubación y la concentración de hidrocarburos como única fuente de carbono y energía. Los rangos de temperatura utilizados en los ensayos fueron seleccionados de acuerdo con la bibliografía consultada y al clima de la zona. A continuación, a modo de ejemplo, se muestran los cultivos a 29 °C luego de 6 días (*Figura 20*).



Figura 20. Cultivo a 29 °C luego de 6 días de cultivo en MSM suplementado con HC. Izquierda: 2 % v/v HC. Medio: 4,5 % v/v HC. Derecha: 6 % v/v HC.

Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 21*, *Figura 22*, *Tabla 13* y *Tabla 14*.

Tabla 13. Disminución de TS en función de la temperatura y concentración de HC

[HC]	2 %	4,50 %	6 %
Temperatura			
21 °C	0,89	6,44	6,64
25 °C	-0,23	7,92	10,16
29 °C	3,4	7,25	7,38

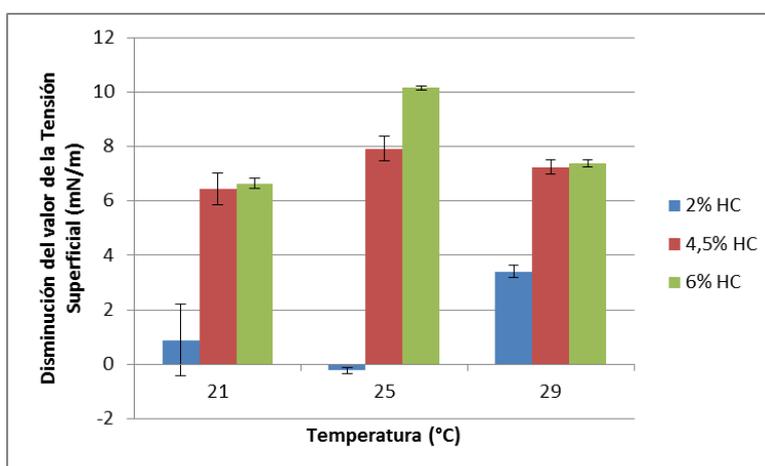


Figura 21. Disminución de TS en función de la temperatura y concentración de HC

En la *Figura 21* se puede observar que la mayor disminución en el valor de la tensión superficial sucedió cuando la cepa fue incubada a 25 °C con una concentración 6 % v/v de fuente de carbono. En este caso, la disminución en la tensión superficial fue de 48,44 mN/m \pm 0,03 mN/m hasta 38,29 mN/m \pm 0,15 mN/m. Sumado a esto, una correlación entre concentración de fuente de

carbono y disminución del valor de la tensión superficial a cada temperatura fue observada. La explicación a este fenómeno podría deberse a la síntesis de biosurfactantes, en donde se podría plantear que, ante una gran concentración de una fuente de carbono insoluble, el microorganismo debe producir gran cantidad de biosurfactantes para mantener una biodisponibilidad adecuada y poder degradarla. Sumado a esto, dado que la presencia de los hidrocarburos afectan la tensión superficial del agua (solvente del MSM) haciendo que esta propiedad disminuya su valor, podría estar sucediendo que a mayor concentración de hidrocarburos, su impacto en la tensión superficial sea mayor (Mesa et al., 2019).

En la *Figura 22* se puede observar el perfil de concentración de biomasa (expresado como PS) respecto de la temperatura de cultivo y de la concentración de HC.

Tabla 14. Concentración de biomasa (PS) en función de la temperatura y concentración de HC

[HC]	2 %	4,50 %	6 %
Temperatura			
21 °C	0,0998	0,2427	0,3831
25 °C	0,1071	0,1844	0,3025
29 °C	0,2317	0,4715	0,4858

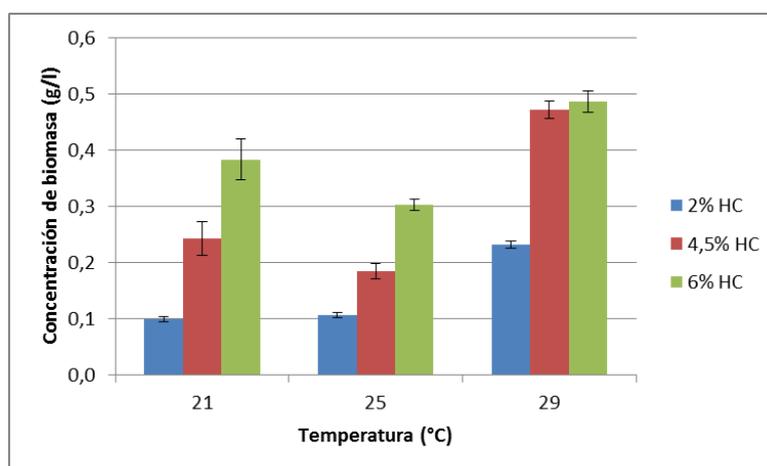


Figura 22. Concentración de biomasa (PS) en función de la temperatura y concentración de HC

En cuanto a la biomasa, se pudo observar que la mayor producción se obtuvo cuando la *Pseudomonas sp. Ag HC* se cultivó a 29 °C con una concentración de HC del 6 % v/v, obteniéndose una concentración de 0,4858 g/l ± 0,0082 g/l. El comportamiento del microorganismo frente a las

condiciones ensayadas nos permite inferir que el empleo de HC como única fuente de carbono constituye un factor limitante del crecimiento. El valor de pH final de cada uno de los cultivos fue mayor a medida que la disminución en el valor de la tensión superficial y producción de biomasa fueron mayores. El perfil de pH en función de la temperatura y concentración de HC se muestra en la *Figura 23*. Con respecto al estudio de distorsión óptica de cada muestra, se observó que, a mayor concentración de fuente de carbono, mayor es la distorsión producida por el sobrenadante de cultivo libre de células (*Figura 24*). Esto guarda relación con los resultados que se muestran en la *Figura 21*.

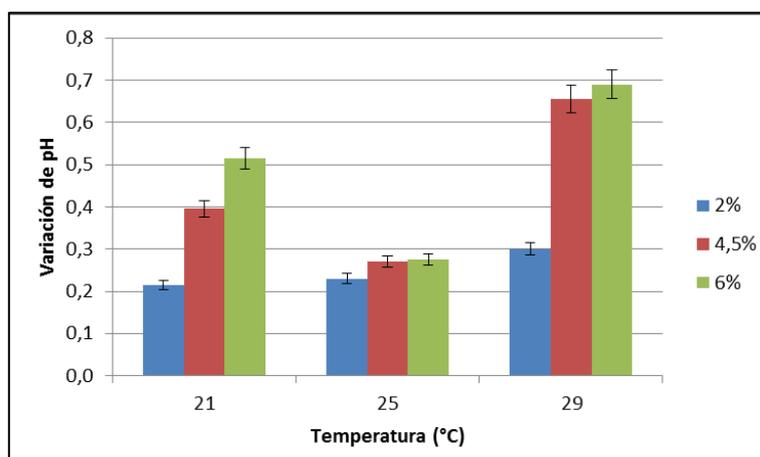


Figura 23. Variación en el valor de pH del cultivo en función de la temperatura y concentración de HC.

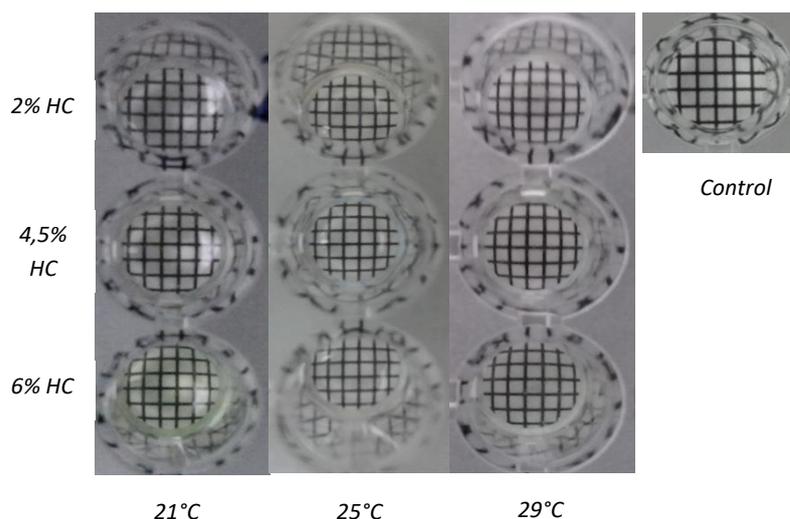


Figura 24. Ensayo en policubeta del sobrenadante de cultivo

A partir de estos resultados, se evaluó el comportamiento del microorganismo seleccionado en un cultivo a escala biorreactor de laboratorio. Para ello se seleccionó la mejor condición obtenida respecto de la tensión superficial, ya que puede ser la óptima para la producción de biosurfactantes. El sistema utilizado se muestra en la *Figura 25*.



Figura 25. Biorreactor y sistema de control utilizado para el cultivo del microorganismo (*BioFlo 115*, *New Brunswick Scientific Co.*).

El cultivo se llevó a cabo durante 7 días, y se monitorearon las siguientes variables de proceso (*Figura 26*):

- i. pH: se configuró a un valor inicial de $7,00 \pm 0,02$ y, a lo largo del cultivo aumentó hasta $8,26 \pm 0,05$.
- ii. Temperatura: se estableció a 25 °C (cultivo isotérmico). Esta variable se controló en función del caudal de agua que circuló por la camisa.
- iii. Velocidad de Agitación: se estableció a un valor de $200\text{ rpm} \pm 1\text{ rpm}$.
- iv. Oxígeno Disuelto en el Medio de Cultivo: Se monitoreó esta variable a lo largo del cultivo. Se observó una disminución en su valor en conjunto con el progreso del cultivo. Esto se corresponde con el aumento de biomasa en el reactor.

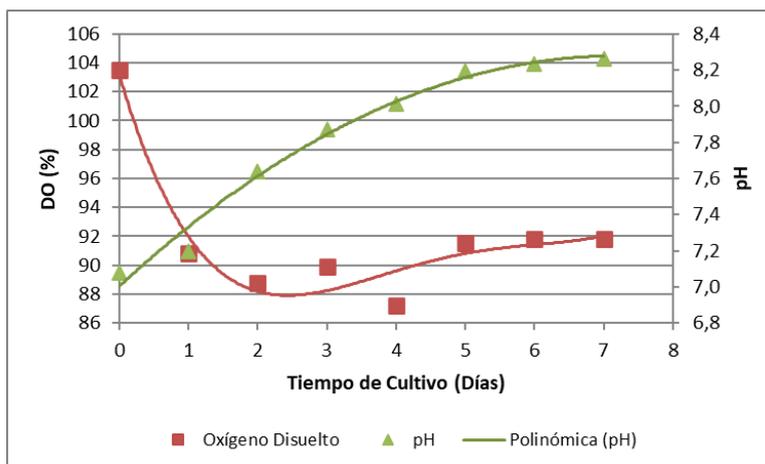


Figura 26. Variables de proceso en el cultivo en biorreactor: pH y Oxígeno disuelto (%). Se mantuvieron constantes la velocidad de agitación (200 rpm) y la temperatura (25°C).

A partir de los datos de concentración de oxígeno disuelto se determinó el valor del coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}) del sistema, cuyo valor fue $0,0085 \text{ s}^{-1}$. En la *Figura 27* se muestra la variación de oxígeno disuelto durante el ensayo.

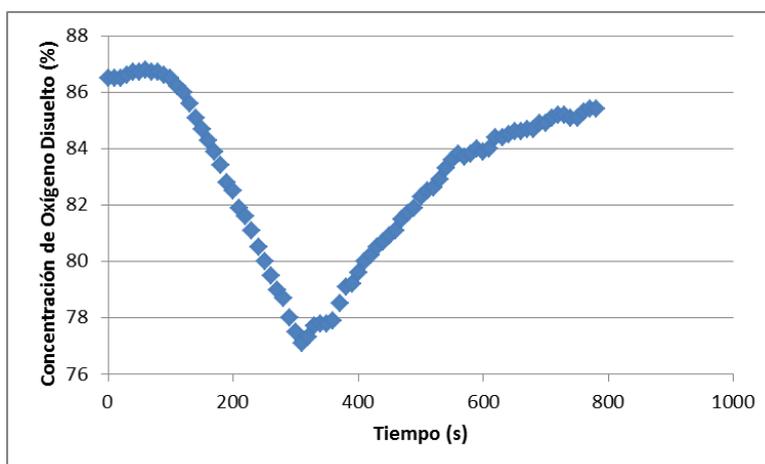


Figura 27. Concentración de oxígeno disuelto durante la medición del K_{La} .

En la *Figura 28* se observa la concentración de biomasa y el valor de la tensión superficial del sobrenadante de cultivo en función del tiempo. Respecto de la biomasa, se observó un perfil de crecimiento típico de un cultivo en batch, con cada una de sus etapas. Se observó una pequeña fase de latencia inicial, una fase de crecimiento exponencial entre el día 1 y el día 4, y una fase estacionaria desde el día 4 al final del cultivo. La concentración de biomasa final obtenida fue de $0,698 \text{ g/l}$. Con respecto a la medición de la tensión superficial, se observó un aumento progresivo

hasta un valor final de $45,71 \text{ mN/m} \pm 0,08 \text{ mN/m}$, mayor a la inicial y a la del control (medio de cultivo suplementado con el sustrato antes de ser inoculado). Estos resultados podrían deberse al cambio en la configuración del sistema ya que, en el biorreactor, el agitador se encuentra sumergido en el medio de cultivo y produce la ruptura de las gotas del hidrocarburo utilizado como sustrato. De esta forma, hay mayor área superficial de contacto entre las fases, este se encuentra más biodisponible para el microorganismo y no necesitaría producir biosurfactantes, ya que el principal modo de consumo de hidrocarburos por parte de la cepa sería el consumo directo (Angeles et al., 2017). Otras posibilidades serían que el microorganismo haya sufrido un proceso de adaptación al sustrato utilizado o que, debido al estrés producido por alguna característica del sistema (esfuerzos de corte, por ejemplo), se afecte o inhiba la producción del tensioactivo. Una consecuencia de esto último puede observarse en Kachrimanidou et al., 2022, donde un cambio en la escala de producción modifica el perfil de producción de compuestos tensioactivos.

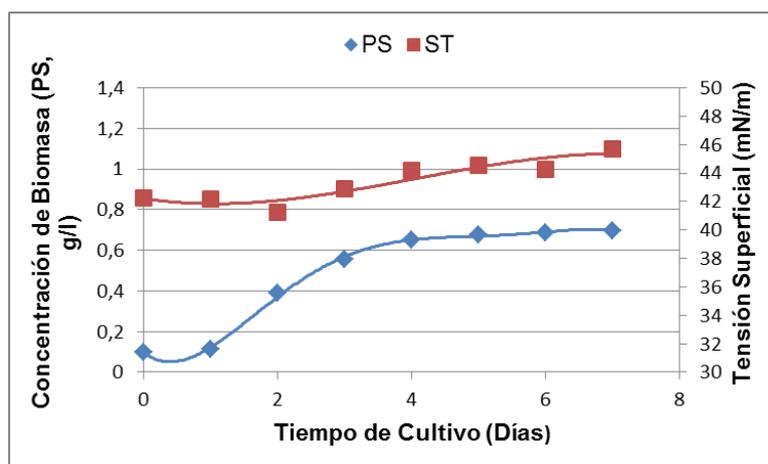


Figura 28. Tensión superficial del sobrenadante de cultivo y concentración de biomasa en función del tiempo de cultivo.

5.7.- Evaluación de fuentes de carbono alternativas para la producción de biosurfactantes: glucosa y glicerol

Se evaluó el crecimiento de la cepa *Pseudomonas* sp. *AgHC* utilizando como fuentes de carbono glucosa y glicerol y, con ello, la producción de biosurfactantes. En una primera etapa se utilizaron las fuentes de carbono nombradas con el objetivo de partir con una buena concentración de biomasa, seguida de una etapa en la que se quiso observar la producción de biosurfactantes con

hidrocarburos como sustrato. Los resultados obtenidos en la primera etapa se observan en la *Tabla 15* y la *Figura 29*.

Tabla 15. Resultados de la 1^{ra} etapa de cultivo.

Fuente de Carbono	Glucosa			Glicerol		
Tiempo Cultivo (d)	0	1	2	0	1	2
PS (g/l)	N/D	0,172	1,286	N/D	0,048	0,092
ST (mN/m)	66,98	61,74	25,10	61,10	61,20	27,84
Δ ST (mN/m)	-12,75	-9,06	21,64	7,20	-3,60	33,64

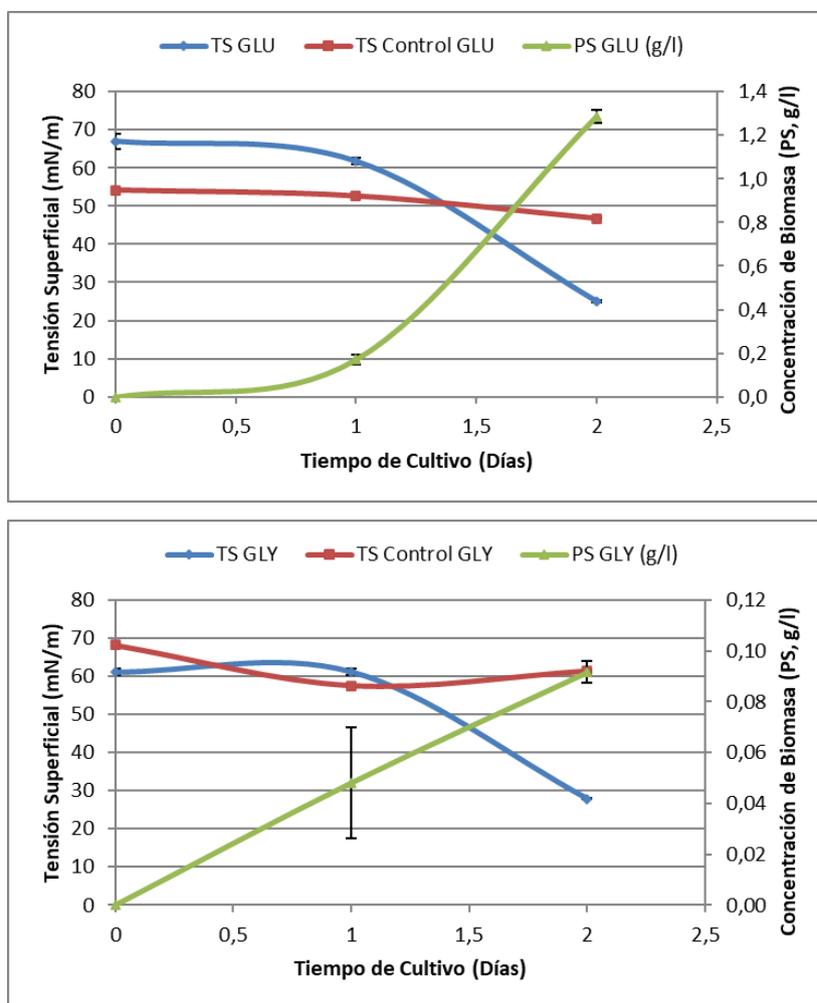


Figura 29. Resultados de la 1^{ra} etapa del cultivo. Se observa concentración de biomasa y TS del cultivo y control en función del tiempo de cultivo. Fuentes de carbono utilizadas: Arriba, glucosa; Abajo, glicerol.

La cepa fue capaz de crecer en ambas fuentes de carbono. Cuando se utilizó glucosa, al segundo día la cepa alcanzó una concentración de biomasa de $1,29 \text{ g/l} \pm 0,06 \text{ g/l}$, tres veces mayor que cuando fue inoculada con medio de cultivo con HC como fuente de carbono y energía. Con respecto a la tensión superficial, se observa una disminución significativa en el valor de esta entre el día 1 y 2 respecto del control, para cada uno de los sustratos. A los 2 días 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, lo que representa una disminución del 46,3 % y 54,7 % respecto de cada uno de los controles. Estos resultados son comparables a los publicados por Cooper & Goldenberg, 1987 y Silva et al., 2010. Además, muestran una mejora sustancial frente a los obtenidos cuando HC fue la fuente de carbono, donde el mínimo valor de tensión superficial obtenido fue de $38,29 \text{ mN/m}$.

Con respecto a la segunda etapa de cultivo, los resultados obtenidos se observan en la *Tabla 16* y en la *Figura 30*.

Tabla 16. Resultados de la 2^{da} etapa de cultivo. Inóculo proveniente de glucosa con HC e inóculo proveniente de glicerol con HC

Fuente de Carbono	Glucosa - HC				Glicerol - HC			
	2	3	4	5	2	3	4	5
Tiempo Cult. (d)	2	3	4	5	2	3	4	5
PS (g/l)	0,1857	0,2770	0,4398	0,4257	0,0324	0,3128	0,3835	0,3517
ST (mN/m)	43,53	44,55	43,13	41,29	43,87	45,53	43,34	41,65
Δ ST (mN/m)	0,63	1,21	0,93	2,04	0,29	0,23	0,72	1,68

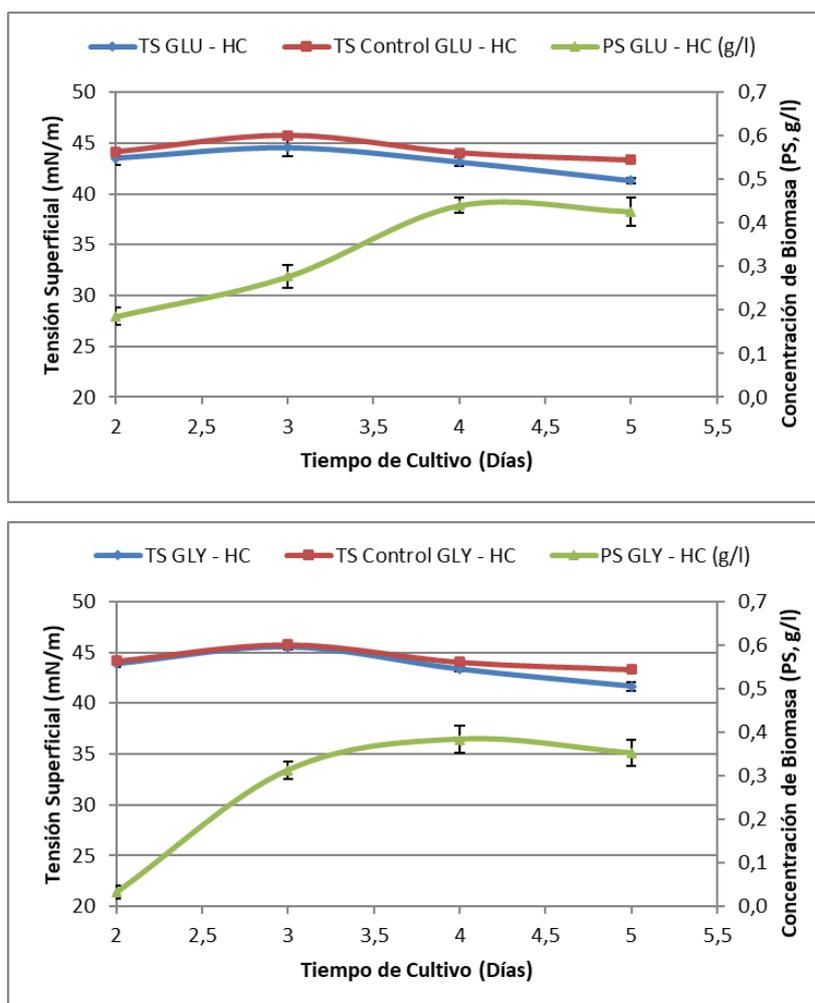


Figura 30. Resultados de la 2^{da} etapa del cultivo. Se observa la concentración de biomasa y TS del cultivo y del control en función del tiempo de cultivo. Fuentes de carbono utilizadas: Arriba, glucosa y luego HC; Abajo, glicerol y luego HC.

En esta segunda etapa del cultivo, se observó crecimiento del microorganismo luego de haberlo transferido a MSM suplementado con HC. Se lograron concentraciones finales de biomasa de $0,43 \text{ g/l} \pm 0,07 \text{ g/l}$ en el caso en que se utilizó glucosa seguido de HC y $0,35 \text{ g/l} \pm 0,06 \text{ g/l}$ en el caso en que se utilizó glicerol seguido de HC. Estos resultados muestran un aumento en la concentración de biomasa respecto de los resultados obtenidos para el cultivo de la cepa utilizando HC como sustrato ($0,18 \text{ g/l}$) en una única etapa. Con respecto al valor de TS, se observó que en el cultivo no hubo diferencias significativas con respecto a la TS del control durante todo el experimento. Llegado al día 4 y 5 de cultivo se observó una pequeña disminución, alcanzando valores finales de $41,29 \text{ mN/m} \pm 0,61 \text{ mN/m}$ y $41,65 \text{ mN/m} \pm 0,90 \text{ mN/m}$ (control: $43,33 \text{ mN/m} \pm 0,08 \text{ mN/m}$) cuando las fuentes de carbono fueron glucosa–HC y glicerol–HC respectivamente. La disminución en el valor de la TS obtenida resultó ser despreciable cuando se lo cultiva con HC,

esto podría sugerir que el microorganismo no se encuentra produciendo biosurfactantes debido a la adaptación metabólica a dicha fuente de carbono. De acuerdo con los resultados obtenidos de ambas etapas, tanto la glucosa como el glicerol podrían ser sustratos adecuados para llevar adelante la producción de biosurfactantes con la cepa *AgHC*, debido a que los valores de TS en ambos casos resultaron significativamente menores que los obtenidos para el cultivo con HC como única fuente de carbono (Das et al., 2009; Jain et al., 2013). Dado que el costo del sustrato es uno de los que más influye dentro de los costos de proceso, se planteó continuar los estudios utilizando glicerol como único sustrato. Al ser el principal co-producto de la industria del biodiesel, su costo resulta varias veces menor que el de la glucosa, producto de la gran oferta disponible (Banat et al., 2014).

5.8.- Evaluación de la producción de biosurfactantes utilizando glicerol como fuente de carbono

Se utilizó MSM suplementado con glicerol como única fuente de carbono y energía durante todo el proceso y se observó un crecimiento del microorganismo desde el inicio hasta el final, alcanzándose una concentración de $0,77 \text{ g/l} \pm 0,12 \text{ g/l}$ a las 96 h. En la *Figura 31* se observa la curva de crecimiento. En este caso, la velocidad específica de crecimiento se calculó a partir de la ecuación cinética del proceso y arrojó un resultado de:

$$\mu = 0,017h^{-1}$$

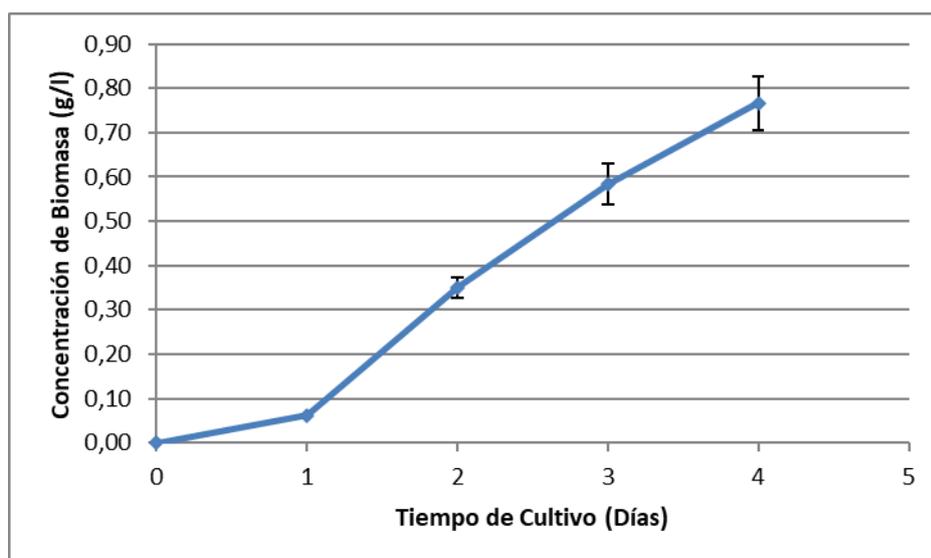


Figura 31. Curva crecimiento de biomasa en función del tiempo.

Respecto de la estimación de la producción de biosurfactantes, se observó una disminución en el valor de la tensión superficial del sobrenadante de cultivo en el tiempo que duró el proceso. Los valores de tensión superficial disminuyeron desde $67,33 \text{ mN/m} \pm 0,13 \text{ mN/m}$ al comienzo hasta $26,23 \text{ mN/m} \pm 0,01 \text{ mN/m}$ al final del proceso, lo que, respecto del control, representa una disminución del 57,89 %. (Figura 32). A la muestra obtenida al día 4 se le aplicó una técnica de precipitación en medio ácido para obtener el biosurfactante a partir del sobrenadante del medio de cultivo. Esta técnica requiere pocos insumos y es de fácil aplicación con un buen rendimiento del biosurfactante purificado. Como resultado, se pudo obtener una concentración máxima de biosurfactante de $0,11 \text{ g/l}$ y un rendimiento de producto en función de la biomasa (Y_{PX}) de $0,09 \text{ g/l} \pm 0,02 \text{ g/l}$. A este precipitado se lo sometió a un proceso de diluciones seriadas en agua destilada con el objetivo de evaluar la concentración micelar crítica del mismo. A cada una de estas diluciones se le determinó el valor de la tensión superficial, información que se observa en la Figura 33. En esta gráfica, el punto para el cual la pendiente de la curva de tensiones superficiales frente al logaritmo natural de la concentración de biosurfactante posee un cambio abrupto en su valor, corresponde al de la CMC. Esto es, la mínima concentración a partir de la cual las moléculas de biosurfactante se agregan formando micelas. Teniendo en cuenta esto, resulta importante destacar que la mayor disminución del valor de la tensión superficial se observa entre el comienzo (día 0) y los 2 días de cultivo, por lo que se podría decir que entre el día 1 y el día 2 se estaría alcanzando la CMC del biosurfactante (Figura 32).

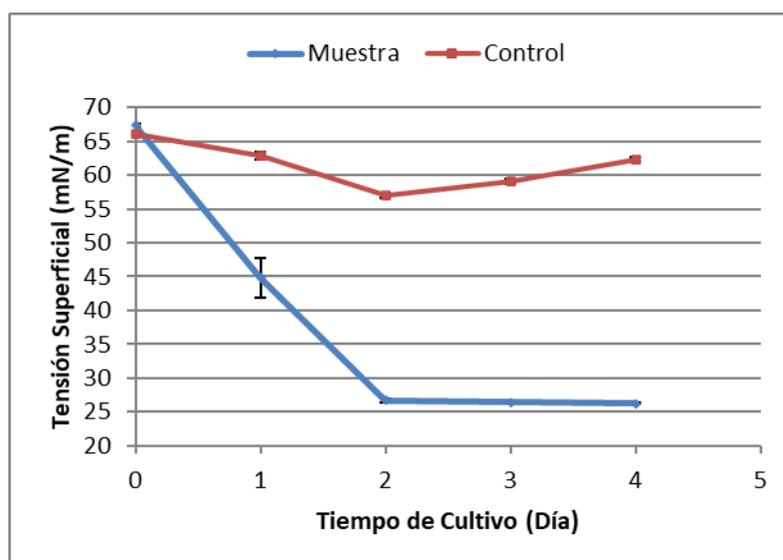


Figura 32. Valores de tensión superficial en función del tiempo.

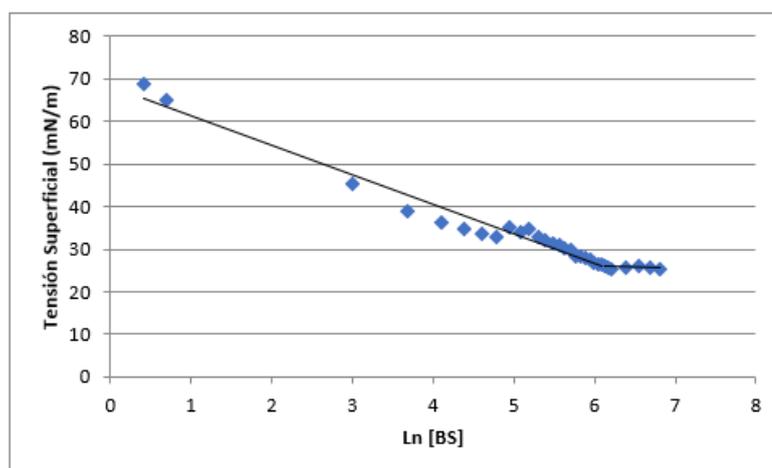


Figura 33. Perfil de tensión superficial en función de la concentración de biosurfactante para la obtención del valor de CMC del tensioactivo producido por *Ag HC*.

La concentración mínima para la cual se forman espontáneamente micelas de un tensioactivo en una disolución es un parámetro fundamental para su caracterización. A partir de los datos experimentales (*Figura 33*) se calculó la CMC del compuesto producido por la cepa *Ag HC*, para la cual se obtuvo un valor de 452,21 mg/l. A esta concentración se halló un valor de tensión superficial de 26,05 mN/m \pm 0,05 mN/m. Este valor es comparable al obtenido por Hultberg et al., 2010 para el biosurfactante producido por *P. koreensis*.

5.9.- Optimización del medio de cultivo de *Pseudomonas sp. Ag HC*

5.9.1.- Concentración de sustrato y temperatura

Con el objetivo de optimizar la producción de biosurfactantes a partir del crecimiento de la cepa *AgHC*, se realizó un análisis de regresión múltiple utilizando una metodología de superficie de respuesta (RSM) para ajustar la función de respuesta a los datos experimentales en el medio de cultivo y evaluar la influencia de las dos variables seleccionadas. Cabe destacar que las mismas fueron seleccionadas debido a que impactan directamente en los procesos metabólicos de los microorganismos y, en consecuencia, en la producción de biosurfactantes (Darvishi et al., 2011; Ghasemi et al., 2019). Las combinaciones de las temperaturas y concentraciones de sustrato y sus resultados se observan en la *Tabla 17*. Allí se puede observar que la mejor condición de las ensayadas, teniendo en cuenta la producción de biosurfactantes, resulta la combinación de los valores medios de cada variable, los que se encuentran en 25 °C y 7,5 %v/v.

Tabla 17. Combinación de variables ensayadas para optimizar la producción de biosurfactantes a partir del cultivo de *Ag HC*. Se muestran también la concentración de biomasa alcanzada en cada caso y el rendimiento de producto en biomasa.

Temperatura (°C)	Conc. de Sustrato (%v/v)	Conc. de Biosurfactante (g/l)	Conc. de Biomasa (g/l)	Rendimiento (Y _{PK})
17,9	7,50	0,14074	0,71204	0,19766
20,0	5,00	0,13259	0,96792	0,13699
20,0	10,00	0,18278	0,54604	0,33473
25,0	3,96	0,17685	0,78604	0,22499
25,0	7,50	1,64870	2,73333	0,60318
25,0	7,50	0,89815	1,36854	0,65628
25,0	7,50	0,95352	1,35979	0,70122
25,0	7,50	1,69204	1,65646	1,02148
25,0	7,50	2,20630	1,32708	1,66252
25,0	11,03	0,26593	1,16146	0,22896
30,0	5,00	1,04296	1,12042	0,93087
30,0	10,00	1,13056	1,19583	0,94541
32,1	7,50	0,77704	1,29729	0,59897

La utilización de la RSM para estimar los parámetros óptimos condujo a una relación empírica entre la concentración de biosurfactante y las variables. El polinomio que mejor ajusta dichos datos es el siguiente:

$$Y = -16,18 + 0,939 \cdot X_1 + 1,337 \cdot X_2 - 0,01751 \cdot X_1^2 - 0,0896 \cdot X_2^2 - 0,0007 \cdot X_1 \cdot X_2$$

donde *Y* es la concentración de biosurfactante, *X₁* la temperatura y *X₂* la concentración de sustrato.

La evaluación del modelo empírico fue realizada utilizando ANOVA. En la *Figura 34* se puede observar que este posee reproducibilidad de los datos experimentales (error: 1,48813), obteniéndose un buen ajuste de estos ($R^2 = 73,31\%$). Se considera que un valor cercano al 75% de este parámetro indica un buen ajuste por parte del modelo y este puede utilizarse para describir adecuadamente la producción de biosurfactantes. Sumado a esto, el valor de *S* ($S = 0,461075$) está indicando que el modelo obtenido predice de forma adecuada la producción de biosurfactantes. Respecto de los términos del polinomio, la regresión para la respuesta fue significativa al 95% del nivel de confianza, por lo que aquellos términos con $p < 0,05$ son los que afectan

significativamente a la respuesta: *temperatura*² y *concentración de sustrato*², siendo el último de los dos el más importante en este sentido.

Response Surface Regression: Concentración Bi versus Temperatura. Concentración Su

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	5	4,08683	0,81737	3,84	0,054
Linear	2	0,95870	0,47935	2,25	0,175
Temperatura	1	0,94936	0,94936	4,47	0,072
Concentración Sustrato	1	0,00933	0,00933	0,04	0,840
Square	2	3,12814	1,56407	7,36	0,019
Temperatura*Temperatura	1	1,35002	1,35002	6,35	0,040
Concentración Sustrato*Concentración Sustrato	1	2,17716	2,17716	10,24	0,015
2-Way Interaction	1	0,00035	0,00035	0,00	0,969
Temperatura*Concentración Sustrato	1	0,00035	0,00035	0,00	0,969
Error	7	1,48813	0,21259		
Lack-of-Fit	3	0,27147	0,09049	0,30	0,827
Pure Error	4	1,21666	0,30417		
Total	12	5,57496			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,461075	73,31%	54,24%	31,21%

Figura 34. Análisis de la varianza para la concentración de biosurfactante

Para que el modelo obtenido explique de forma adecuada los resultados experimentales, los residuos (diferencia entre la respuesta observada y la predicha por el modelo) deben poder verse como una muestra aleatoria con una distribución normal con media igual a cero y varianza constante. Para ello, la muestra de residuos debe cumplir con 3 supuestos: normalidad, varianza constante e independencia de los resultados respecto del orden en que se obtuvieron. De los resultados observados en la *Figura 35* se puede afirmar que estos supuestos se cumplen, por lo que se podría afirmar que el modelo puede ser utilizado para analizar la producción de biosurfactantes a partir del cultivo de la cepa *Ag HC* utilizando glicerol como fuente de carbono y energía.

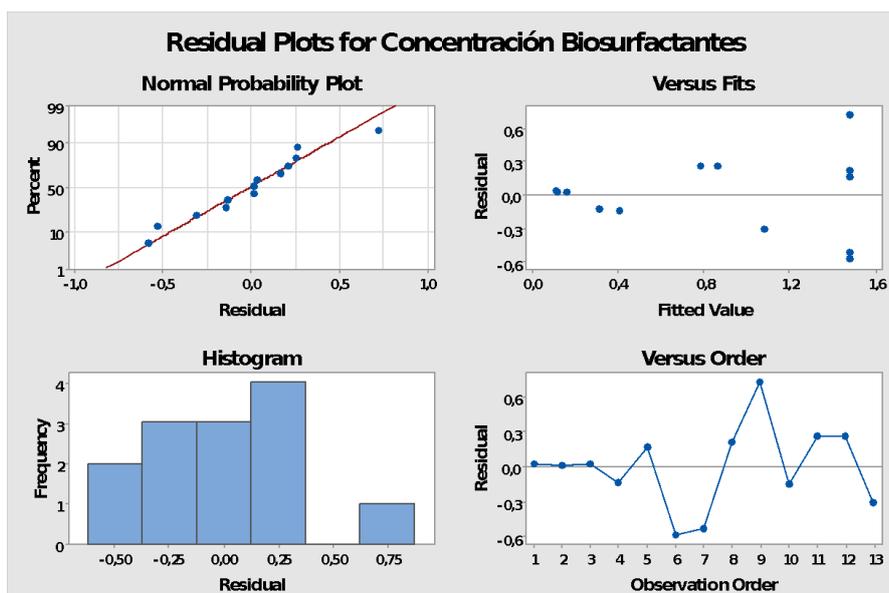


Figura 35. Gráficos de residuos para la producción de biosurfactantes

En la *Figura 36* se observa el gráfico de superficie y en la *Figura 37* el de contorno de la producción de biosurfactantes, en donde se puede ver la interacción entre la temperatura y la concentración de sustrato. Cuando observamos el gráfico de superficie se aprecia que la producción máxima del biosurfactante se obtiene en condiciones cercanas a los valores medios de los factores (temperatura y concentración de sustrato) y que, si se aumentan o disminuyen estos valores, la producción del tensioactivo decae con cierta rapidez. En el gráfico de contorno se observa la interacción entre las variables, por lo que se hace necesario encarar la optimización a través de métodos estadísticos de un medio de cultivo.

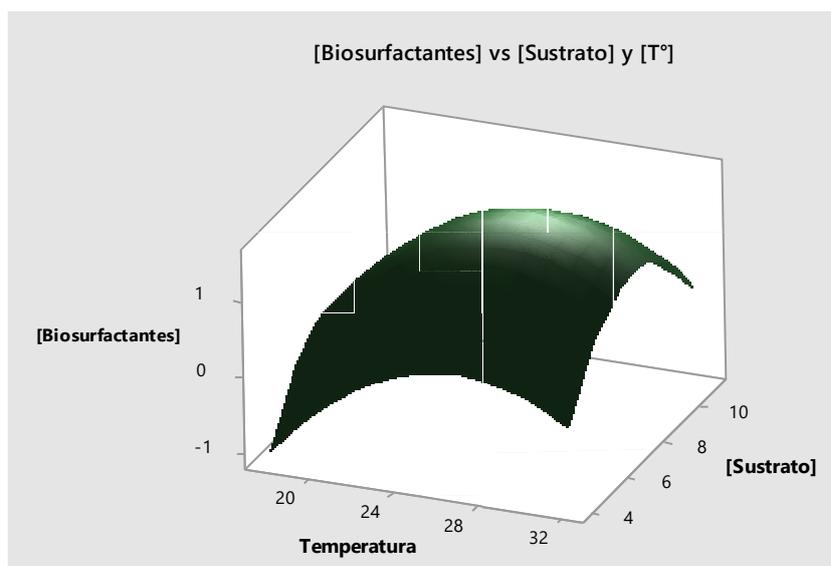


Figura 36. Gráfico de superficie de la concentración de biosurfactante en función de la temperatura y la concentración de sustrato.

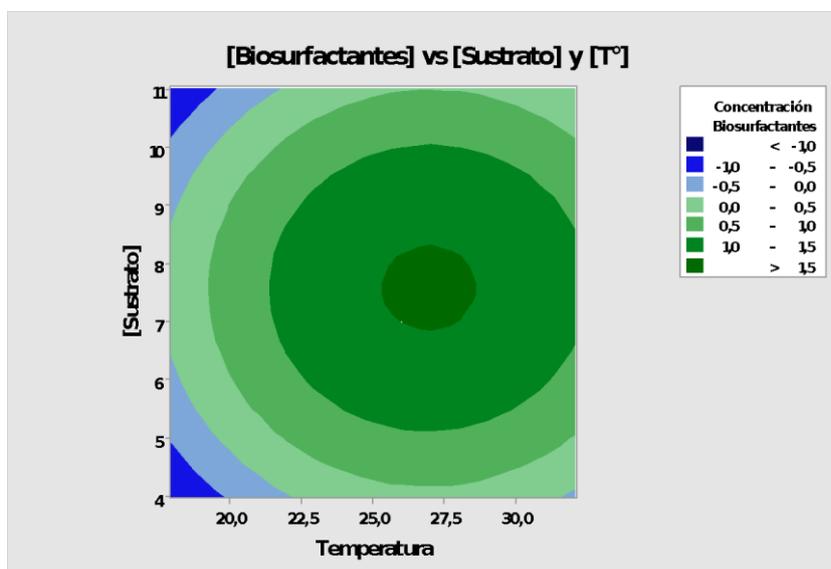


Figura 37. Gráfico de contorno de la concentración de biosurfactante en función de la temperatura y la concentración de sustrato.

A partir del diseño experimental realizado y en base a los resultados obtenidos por el modelo planteado, se puede decir que la combinación que hace óptima la producción de biosurfactantes en el intervalo de valores evaluado para los factores es 26,9 °C y 7,6 % de glicerol,

y la máxima producción de biosurfactantes es de 1,55 g/l. Esto puede observarse a partir de realizar la maximización del polinomio del modelo matemático (*Figura 38*).

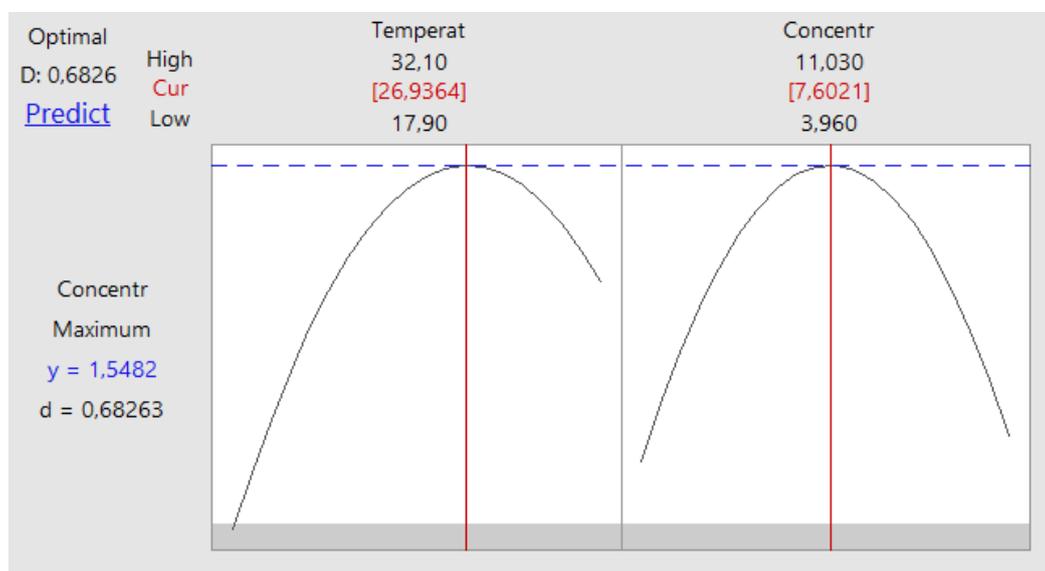


Figura 38. Maximización del polinomio de ajuste de los valores experimentales. Los valores de cada factor que maximizan la producción de biosurfactantes se observan en color rojo.

Con los valores óptimos de las variables se llevó a cabo el cultivo en biorreactor, observándose que la cepa *AgHC* ha sido capaz de crecer en las condiciones de proceso, alcanzando una concentración final de biomasa de 0,965 g/l a los 4 días de cultivo. Se observó, además, un incremento progresivo en el valor del pH desde el inicio hasta el final del ensayo, desde un valor de 7,04 hasta 8,41. Además, a partir del 2^{do} día, se pudo advertir la producción de espuma en la parte superior del reactor (*Figura 39*). Estos resultados se condicen con lo observado en el cultivo de diferentes microorganismos para la producción de biosurfactantes en estudios realizados por Bongartz et al., 2023; Doheim, 2014.



Figura 39. Izquierda: Esquema experimental utilizado. Derecha: A los 4 días de cultivo se observa gran producción de espuma por sobre el medio de cultivo.

Respecto del valor de la tensión superficial, se ha observado una pequeña disminución de la misma hasta un valor de 55,46 mN/m al 4to día de cultivo y se estimó la producción de biosurfactantes a partir de una técnica de doble precipitación ácida con HCl, a partir de la cual se obtuvo una concentración de 0,03 g/l de biosurfactante. En la *Figura 40* se observan los resultados obtenidos para el proceso que difieren de los obtenidos a escala Erlenmeyer, esto puede deberse a que las células y los compuestos tensioactivos se ven arrastrados por la espuma cuando ésta se presenta, por lo que la falta de disminución de la tensión superficial del medio de cultivo puede ser consecuencia de este fenómeno (Bages-Estopa et al., 2018). Así mismo, también puede deberse al cambio en la escala del cultivo ya que, cuando se lleva a cabo, muchos factores pueden afectar al proceso de producción, la geometría del reactor, el tipo de agitador y la velocidad de este, y los esfuerzos de corte a los que se encuentra sometido el agente biológico. En nuestra situación particular, en el cultivo de la cepa *Pseudomonas* sp. Ag HC, se pudo visualizar que la velocidad de agitación del proceso podría ser uno de dichos factores, ya que en la bibliografía consultada se trabaja a muy variados valores que van desde 180 rpm (Eraqi et al., 2016) hasta 600 rpm (Borges et al., 2015), cuando se cultivan microorganismos, más específicamente del género *Pseudomonas* sp., demostrando que afecta a la tensión superficial del medio y, junto a esto, a la producción de biosurfactantes (Santos et al., 2014).

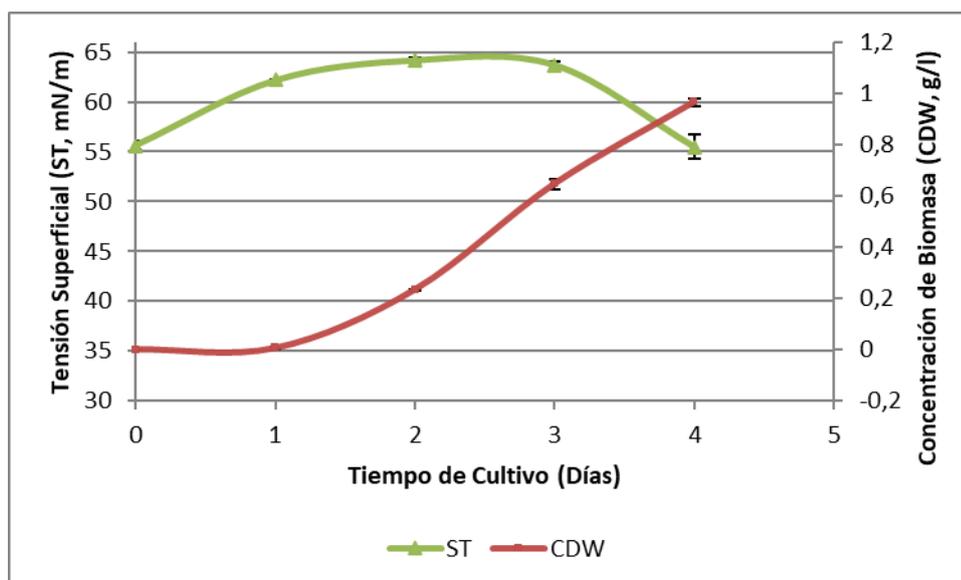


Figura 40. Tensión superficial y concentración de biomasa obtenida en función del tiempo para el ensayo en biorreactor.

5.9.2.- Concentración de Nitrógeno y Fósforo

Continuando con la optimización del medio de cultivo, se estudió el efecto de la concentración de nitrógeno y fósforo en la producción de biosurfactantes utilizando un análisis de regresión múltiple con el que se ajustó la función de respuesta a los resultados experimentales obtenidos y se examinó la influencia de las dos variables seleccionadas. Las combinaciones de variables ensayadas y los correspondientes resultados se muestran en la *Tabla 18*, en donde se puede observar una variación considerable en la respuesta determinada por las variables independientes (concentración de nitrógeno y fósforo). En los experimentos 3,4 y 6, donde se utiliza la mayor concentración de fuente de nitrógeno, la concentración de biomasa y biosurfactante fueron despreciables, y la tensión superficial del sobrenadante de cultivo superior a la del control (45,93 mN/m). Es decir, a medida que aumenta la concentración de fuente de nitrógeno, disminuye la producción de biomasa, por lo que se podría decir que la fuente de nitrógeno resulta un factor que influye considerablemente en el crecimiento de *Pseudomonas* sp. *Ag HC*. Esto se correlaciona con lo hallado en Rashedi et al., 2006, donde se ve que altas concentraciones de nitrógeno son desfavorables para el crecimiento y la producción de biosurfactantes.

La mejor condición fue obtenida en el experimento 11, en donde los factores se hallan en sus valores mínimos (6,825 g/l de NaNO_3 y 0,342 g/l KH_2PO_4) y la concentración de biosurfactantes alcanzó 0,48 g/l. Si se considera la producción de biomasa, la mejor combinación

se obtiene en el experimento 10, seguido de los experimentos 11 y 9. En todos ellos la biomasa se encuentra en valores significativamente mayores a los de los demás. En cambio, si consideramos la disminución del valor de la tensión superficial y tenemos en cuenta los valores de concentración de nitrógeno, se observa una correlación entre ellos, cuando la concentración de nitrógeno es baja, también lo es el valor de la tensión superficial. Esto está relacionado con lo hallado en la bibliografía, donde se ha demostrado que concentraciones crecientes de fuente de nitrógeno afectan negativamente la producción de biosurfactantes. Esto explicaría la tendencia de los resultados obtenidos, cuando menor es la concentración de nitrógeno menor es la tensión superficial del medio de cultivo, favoreciendo la producción de biosurfactantes a partir de la cepa *AgHC* (Sivapathasekaran et al., 2010).

En la *Tabla 18* se observa una correlación entre producción de biomasa y biosurfactante, por un lado, y el valor de la tensión superficial del sobrenadante de cultivo por otro: en los experimentos donde la cepa *Ag HC* no fue capaz de crecer adecuadamente, la producción de biosurfactante fue muy baja y no se observa una disminución significativa del valor de la tensión superficial. Es para destacar que estos resultados estarían sugiriendo que el compuesto tensioactivo producido se encuentra asociado completa o parcialmente al crecimiento, algo que no se había observado previamente. Es decir, el biosurfactante podría ser un compuesto producto del metabolismo celular de la cepa *Ag HC* que se produce ante una variación en las concentraciones de las fuentes de nitrógeno y fosforo (Persson et al., 1988).

La utilización de la RSM para estimar los parámetros óptimos condujo a una relación empírica entre la concentración de biosurfactante y los factores. La ecuación cuadrática polinómica que mejor ajusta dichos datos es el siguiente:

$$BS = 0,549 - 0,0165.N - 0,2014.P - 0,000396.N.N + 0,0182.P.P + 0,00666.N.P$$

donde *BS* es la concentración de biosurfactante, *N* la concentración de nitrógeno (NaNO_3) y *P* la concentración de fósforo (KH_2PO_4).

Tabla 18. Combinación de variables ensayadas para optimizar la producción de biosurfactantes a partir del cultivo de *Pseudomonas* sp. Ag HC. Se muestran también la concentración de biomasa alcanzada en cada caso y la tensión superficial del sobrenadante de cultivo.

Experimento N°	N	P	Concentración Biosurfactante (g/l)	Tensión Superficial (mN/m)	Concentración de Biomasa (g/l)
1	0	0	0,10778	26,75	1,03063
2	0	0	0,05167	26,55	1,10500
3	1	1	0,02778	53,21	0,28062
4	1	-1	0,04611	49,98	0,07187
5	0	0	0,11667	28,25	1,21188
6	1	0	0,03444	50,53	0,23687
7	0	0	0,16667	27,89	1,28688
8	0	-1	0,16056	25,05	1,22625
9	-1	1	0,06778	26,55	1,86000
10	-1	0	0,10111	25,58	1,91188
11	-1	-1	0,48222	24,06	1,90438
12	0	1	0,14389	26,70	1,48375
13	0	0	0,19000	28,44	1,23875

Este modelo cuadrático para la producción de biosurfactantes fue evaluado a través de un análisis de ANOVA (*Figura 41*), donde se observa que el modelo resulta significativo para predecir la producción de biosurfactantes a partir del análisis de la concentración de nitrógeno y fosforo en el medio de cultivo. En la *Figura 41* se puede observar que el modelo tendría una buena reproducibilidad de los datos experimentales (error: 0,037477), que posee un buen ajuste de los datos experimentales ($R^2 = 77,73\%$) y que predice de forma adecuada la respuesta observada ($S = 0,0731700$). Además, se observan los términos que afectan significativamente la respuesta (aquellos para los que $p < 0,05$), siendo el término lineal de concentración de nitrógeno el más importante en este sentido.

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	5	0,130783	0,026157	4,89	0,030
Linear	2	0,082768	0,041384	7,73	0,017
N	1	0,049101	0,049101	9,17	0,019
P	1	0,033667	0,033667	6,29	0,041
Square	2	0,008789	0,004394	0,82	0,478
N*N	1	0,002258	0,002258	0,42	0,537
P*P	1	0,008616	0,008616	1,61	0,245
2-Way Interaction	1	0,039226	0,039226	7,33	0,030
N*P	1	0,039226	0,039226	7,33	0,030
Error	7	0,037477	0,005354		
Lack-of-Fit	3	0,025784	0,008595	2,94	0,162
Pure Error	4	0,011693	0,002923		
Total	12	0,168260			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,0731700	77,73%	61,82%	0,00%

Figura 41. Análisis de la varianza para el modelo de superficie de respuesta para la producción de biosurfactante a partir de *Pseudomonas* sp.

Para que el modelo obtenido explique de forma adecuada los resultados experimentales, los residuos (diferencia entre la respuesta observada y la predicha por el modelo) deben poder verse como una muestra aleatoria con una distribución normal con media igual a cero y varianza constante. Para ello, la muestra de residuos debe cumplir con 3 supuestos: normalidad, varianza constante e independencia de los resultados respecto del orden en que se obtuvieron. A partir de los resultados que se observan en la *Figura 42*, se puede afirmar que estos supuestos se cumplen y, por lo tanto, que el modelo puede ser utilizado para analizar la producción de biosurfactantes en función de la concentración de nitrógeno y fósforo en el medio de cultivo, a partir del cultivo de la cepa *Ag HC* asilada de un sitio crónicamente contaminado en Campana, Buenos Aires, utilizando glicerol como fuente de carbono y energía.

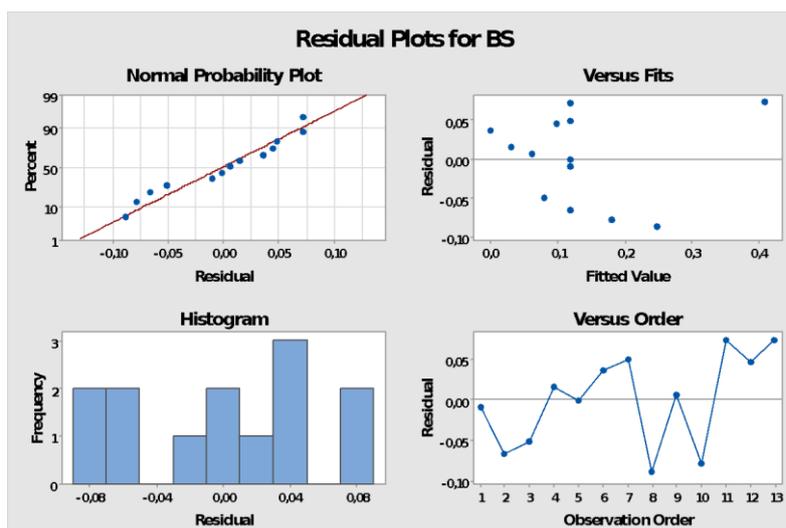


Figura 42. Gráficos de residuos para la producción de biosurfactantes

En la *Figura 43* se observa el gráfico de superficie y en la *Figura 44* el de contorno, de la producción de biosurfactantes. En estos se puede visualizar claramente cómo la interacción entre la concentración de nitrógeno y la concentración de fósforo afectan la producción de biosurfactantes por parte de la cepa. La interacción entre variables se hace más evidente cuando alguno de los factores se mantiene en su nivel más bajo, ya que un pequeño cambio en el otro produce un gran cambio en la concentración de tensioactivo. Cuando ambos se encuentran en sus valores mínimos, se obtiene la máxima producción de biosurfactantes y, a medida que se aumenta la concentración de los factores, la producción de tensioactivo decae con cierta rapidez hasta que se alcanza una zona donde este aumento no la afecta significativamente (zona azul en la *Figura 44*).

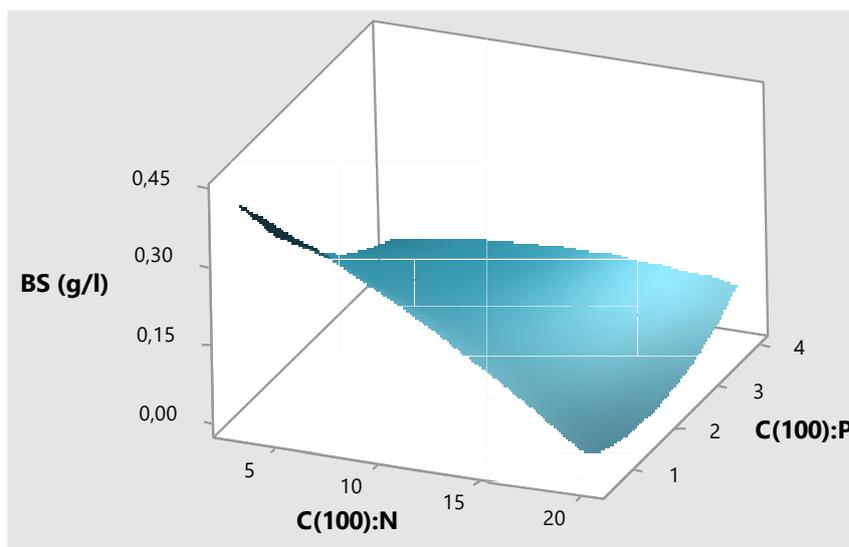


Figura 43. Gráfico en 3 dimensiones de la concentración de biosurfactante en función de la concentración de N y la de P. C(100):N y C(100):P indican las partes de N y P por cada 100 partes de carbono en el medio de cultivo, respectivamente

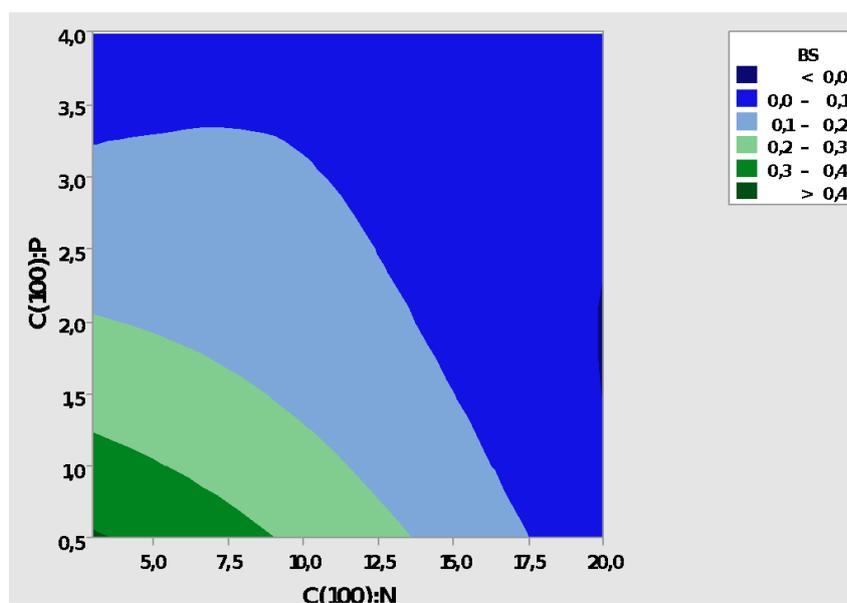


Figura 44. Gráfico de contorno de la concentración de biosurfactante en función de la concentración de N y la de P. C(100):N y C(100):P indican las partes de N y P por cada 100 partes de carbono en el medio de cultivo, respectivamente

A partir del diseño experimental realizado y en base a los resultados obtenidos por el modelo planteado, se puede decir que la combinación que hace óptima la producción de biosurfactantes en el intervalo de valores evaluado para los factores es 100:3 (C:N) y 100:0,5 (C:P),

y la máxima producción de biosurfactantes predicha por este es de 0,41 g/l. Esto puede observarse a partir de realizar la maximización del polinomio del modelo matemático (*Figura 45*).

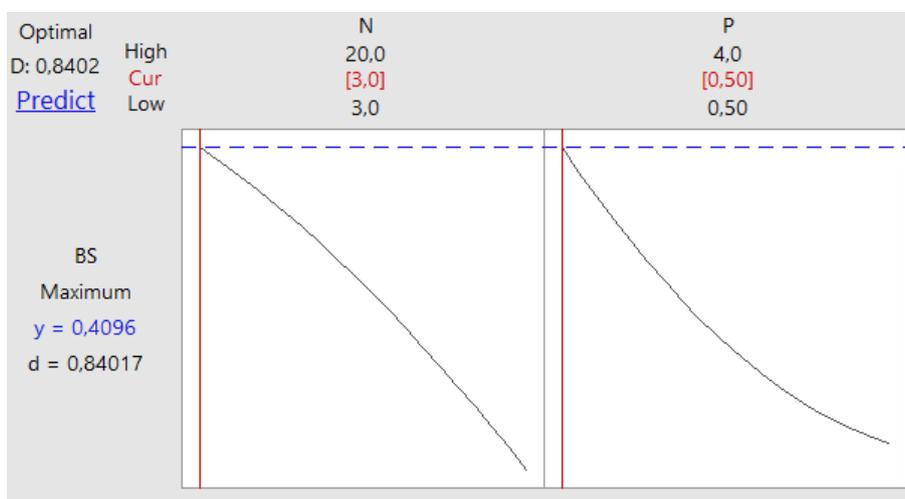


Figura 45. Maximización del polinomio de ajuste de los valores experimentales. Los valores de cada factor que maximizan la producción de biosurfactantes se observan en color rojo.

De esta forma, los valores óptimos hallados fueron de: 7,6 %v/v de glicerol, 6,825 g/l de NaNO_3 , 0,342 g/l KH_2PO_4 y 26,9 °C; los cuales se utilizaron para formular el medio de cultivo MSM optimizado, a escala biorreactor de laboratorio de 2 litros a partir de la utilización de glicerol como única fuente de carbono. En este se observó que el microorganismo ha sido capaz de crecer en las condiciones de proceso alcanzando una concentración final de biomasa en el medio de cultivo de 0,398 g/l a los 4 días. Además, se observó un incremento progresivo en el valor del pH del cultivo desde el inicio hasta el final del ensayo, desde un valor de 7,07 hasta 8,24 al final del proceso.

Debido a que en ensayos previos se había observado una baja actividad tensioactiva en el medio de cultivo y la producción de gran cantidad de espuma sobre la mezcla de reacción en la parte superior del reactor, se adaptó a la configuración de este una trampa de espuma cuya función principal es la de remover la misma y captarla para analizar si contiene biosurfactantes (*Figura 46*). Esto se fundamentó en que el biosurfactante se podría encontrar disuelto en la película que forma la espuma y, por ello, no se estarían observando la presencia de este compuesto en el medio de cultivo. Por esto, el día 4 (día final) se pudo llevar a cabo el análisis de dos muestras, el medio de cultivo y la espuma captada. Cuando se analizó la muestra de espuma, se observó una cantidad significativamente mayor de biomasa respecto de la presente en el medio de cultivo líquido,

producto del arrastre, alcanzando un valor de 2,636 g/l frente a los 0,398 g/l presentes en el medio líquido. Con respecto al valor de la tensión superficial, no se observó disminución a lo largo del tiempo en la muestra del medio de cultivo, de hecho, el perfil de tensión superficial sufrió un leve aumento y al final del proceso disminuyó hasta valores cercanos a los del control (59,14 mN/m). Por el contrario, cuando se midió la tensión superficial de la muestra de espuma se observó un valor de 24,79 mN/m, lo que representa una disminución del 58,08 % respecto del control. Además, a dichas muestras se les determinó la producción de biosurfactantes a partir de una técnica de doble precipitación ácida con HCl. Allí se observó una concentración significativamente superior de precipitado en la muestra de espuma respecto de la muestra de medio de cultivo: 15,116 g/l versus 0,03 g/l. En la *Tabla 19* se observan los resultados obtenidos para el proceso.



Figura 46. Izquierda: Se observa la espuma producida por el cultivo de la cepa *Ag HC*. Derecha: Se observa la configuración experimental con la trampa de espuma.

Tabla 19. Concentración de biosurfactante, tensión superficial y concentración de biomasa obtenida en función del tiempo para el ensayo en biorreactor.

Día N°	CDW (g/l)	ST (mN/m)	BS (g/l)
0	N/D	58,68	N/D
1	N/D	61,13	N/D
2	0,070	65,97	N/D
3	0,190	61,12	N/D
4	Medio de Cultivo	0,398	61,30
	Espuma	2,636	24,79

La remoción *in situ* de la espuma generada en el proceso supone una ventaja operativa ya que permite llevar a cabo la separación del biosurfactante de forma sencilla (en una sola etapa y sin la utilización de solventes orgánicos), obteniéndose un producto de alta pureza (Santos et al., 2016).

5.10.- Evaluación de la producción de biosurfactantes a partir de glicerol clarificado de la industria del biodiesel

Se llevó a cabo el ensayo a escala Erlenmeyer usando glicerol co-producto del biodiesel (GLYBIO) como sustrato y utilizando concentraciones de 6,825 g/l NaNO₃ y 0,343 g/l KH₂PO₄ como fuentes de nitrógeno y fósforo, previamente optimizados. Este sustrato contiene ciertas impurezas provenientes del proceso productivo, por lo que se evaluó cómo se ve afectado el crecimiento y producción de biosurfactantes respecto de la utilización de glicerol grado analítico. Debido a que el costo de este resulta significativo en el del proceso de producción, la potencial utilización de GLYBIO como sustrato impactaría positivamente en los costos globales. En el cultivo de la cepa *Ag HC* utilizando GLYBIO como sustrato en el medio optimizado se observó crecimiento y producción de biosurfactante. Se obtuvo una concentración de biomasa de $3,22 \pm 0,06$ g/l, lo que resulta un incremento del 61,3 % respecto de la biomasa obtenida en el cultivo con glicerol grado analítico. También se observó una disminución significativa de la tensión superficial del medio de cultivo desde el día 0 hasta el día 4 de cultivo, desde un valor de $45,64 \pm 1,32$ mN/m hasta un valor de $24,89 \pm 0,18$ mN/m (Figura 47), lo que resulta en un 53,2 % de disminución respecto del control (medio optimizado suplementado con GLYBIO sin inocular). Estos resultados se condicen con los obtenidos cuando la cepa fue cultivada en glicerol grado analítico ($24,88 \pm 0,07$ mN/m). Por último, respecto de la producción de biosurfactante, este se precipitó a partir de la muestra del día 4 de cultivo y el valor obtenido fue de $0,05 \pm 0,01$ g/l. Este valor se encuentra en el rango del obtenido para el cultivo con glicerol analítico, que fue de $0,08 \pm 0,02$ g/l. Además, es similar a aquellos obtenidos en trabajos previos para cultivos de *Pseudomonas* sp., donde se trabajó con glicerol producto de la transesterificación de aceite de soja y se obtuvieron concentraciones de biomasa y valores de tensión superficial de 3,2 g/l y 27,65 mN/m (Pandey et al., 2020); o en cultivos de *Bacillus subtilis* ATCC6633 donde se trabajó con glicerol del mismo origen y se observaron concentraciones de biomasa y de biosurfactante de 1,69 g/l y 0,158 g/l (Sousa et al., 2014).

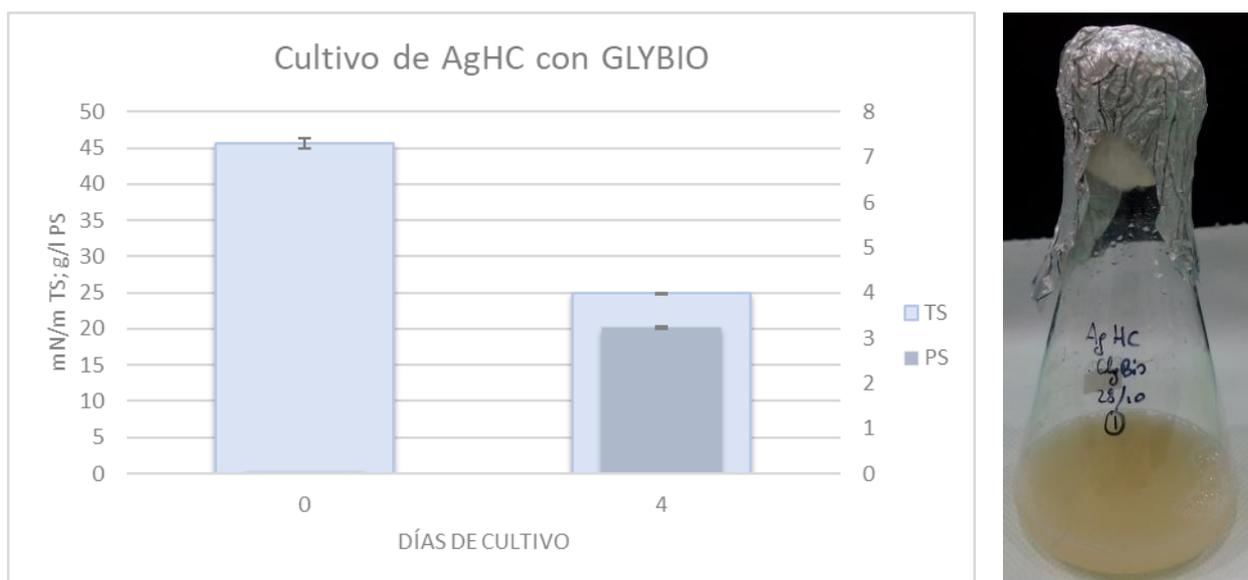


Figura 47. Izquierda: Gráfico que muestra la tensión superficial y concentración de biomasa al inicio y final del cultivo. Derecha: Muestra de *AgHC* cultivada durante 4 días.

5.11.- Análisis por HPLC

Se puso a punto un método para identificar y poder realizar un seguimiento de la producción de biosurfactantes en el medio de cultivo de *AgHC*. Para ello, se realizaron modificaciones al método de identificación publicado en Nielsen et al., 2002. Primeramente, se analizaron los componentes del medio de cultivo por separado para identificar el perfil de cada uno de ellos, estos son: agua destilada, el MSM, una solución de glicerol analítico 7,6% en agua destilada. Luego, se analizaron diversas muestras de sobrenadante del medio de cultivo de la cepa *Ag HC* cultivada con 7,6% de glicerol grado analítico como sustrato. En la *Figura 48* se observan los cromatogramas correspondientes a las corridas experimentales.

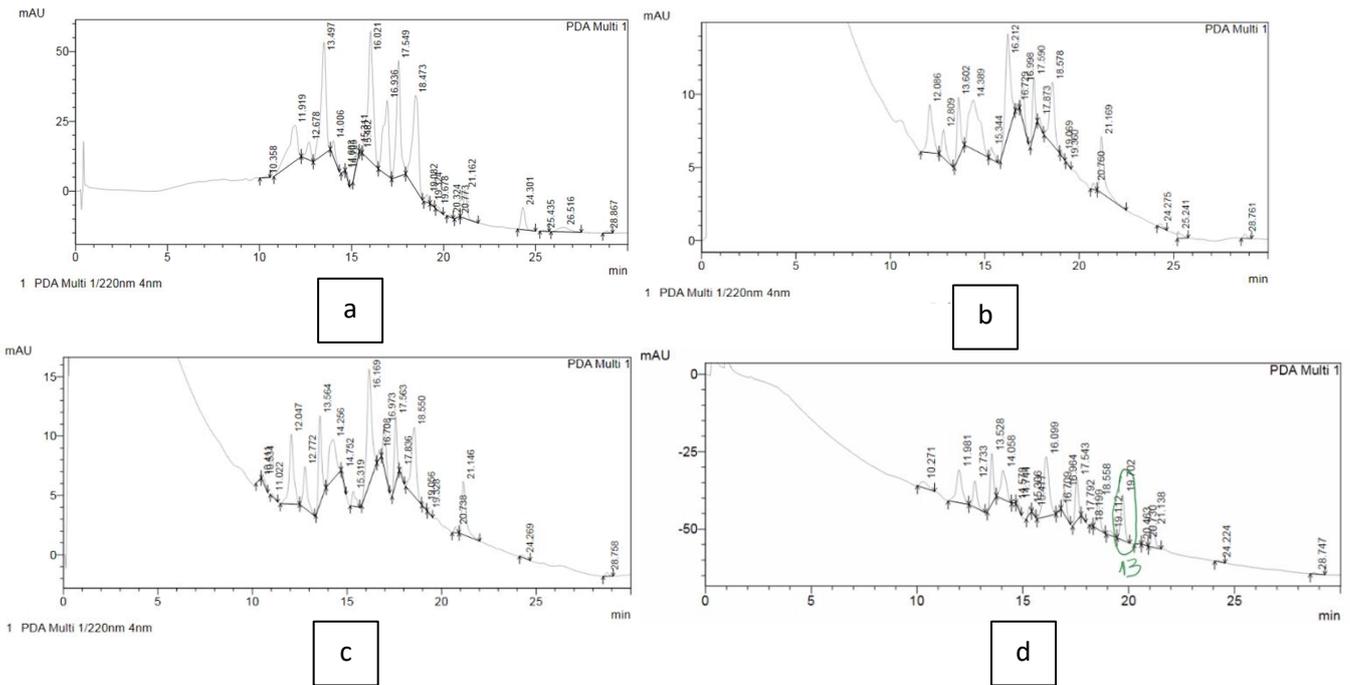


Figura 48. Cromatogramas obtenidos a 220nm. **a:** agua; **b:** medio salino mínimo; **c:** solución de glicerol grado analítico 7,6%; **d:** muestra del sobrenadante de cultivo que contiene el biosurfactante.

A partir del análisis de los cromatogramas obtenidos en las corridas experimentales, se identificó un pico correspondiente a un tiempo de retención de 19,7 minutos (*Figura 48 d*) que no se observa al comienzo del cultivo ni en las corridas correspondientes a los componentes del medio. Este pico se observa apreciablemente en las corridas de HPLC de las muestras de cultivo a partir del día 3 y posee un 10,2% del total del área del cromatograma. Por todo lo mencionado, podemos concluir que el pico observado a los 19,7 min de la corrida es el que indicaría la presencia de biosurfactantes.

CONCLUSIONES



6.- Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. Se logró aislar seis cepas de microorganismos nativos del predio de la empresa Pobater S.A., en la ciudad de Campana, Provincia de Buenos Aires, que demostraron tener capacidad para degradar hidrocarburos como única fuente de carbono y energía.
2. De las cepas aisladas, *Pseudomonas* sp. Ag HC resultó ser efectiva en cuanto a su capacidad para disminuir la tensión superficial cuando fue cultivada utilizando glucosa y glicerol, demostrando presentar gran potencial de síntesis de biosurfactantes. En particular, cuando se utilizó glicerol, los resultados obtenidos fueron comparables a los reportados en la literatura.
3. El compuesto tensioactivo pudo ser separado del medio de cultivo a partir del empleo de una técnica de precipitación ácida con HCl y se pudo determinar su concentración micelar crítica, observando que estos resultados coincidieron con los hallados en las referencias.
4. A partir de la optimización del medio de cultivo de *Pseudomonas* sp. Ag HC a escala Erlenmeyer mediante el empleo de la metodología estadística de superficie de respuesta, se pudo establecer que las condiciones óptimas de crecimiento y síntesis de biosurfactantes de la cepa fueron 7,6 %v/v de glicerol, 26,9 °C de temperatura, 6,825 g/l de NaNO₃ y 0,343 g/l de fósforo (KH₂PO₄).
5. Se evaluó la influencia del cambio de escala en la producción de biomasa y biosurfactante, llevando a cabo el proceso en un biorreactor de 2 litros de volumen operativo. En base a los resultados, una configuración de reactor que incluya una trampa de espuma para la separación *in situ* del producto se plantea como una excelente alternativa para la producción del biosurfactante utilizando *Pseudomonas* sp. Ag HC como agente biológico.
6. Se logró llevar a cabo el crecimiento y observar la producción de biosurfactantes por parte de la cepa *Pseudomonas* sp. Ag HC en glicerol de origen biológico, co-producto de la industria del biodiesel (GLYBIO). Estos resultados arrojaron datos preliminares y

prometedores ya que implican el desarrollo de un bioproceso integrado, aprovechando la utilización de un coproducto como sustrato para producir un bien con mayor valor agregado y mejorando el manejo de los residuos.

7. Se investigó y desarrolló un método en HPLC que permitiría detectar el biosurfactante en el medio de cultivo. De acuerdo con los resultados preliminares obtenidos, este método permite determinar y, con un estándar adecuado, permitiría cuantificar la concentración de biosurfactantes en el medio de cultivo a medida que el organismo se encuentra en producción.

TRABAJO A FUTURO

7.- Trabajo a futuro

La perspectiva del trabajo a futuro será continuar con las líneas del plan original, planteando el objetivo de la identificación molecular de la producción de biosurfactantes por cepas aisladas de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos, destinados al tratamiento biológico de los mismos, a través de cromatografía acoplada a espectrometría de masas. Las cepas microbianas empleadas en este proyecto han sido previamente aisladas de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos en la zona del polo petroquímico Zárate-Campana, Pcia. de Buenos Aires, específicamente en la Refinería RHASA (hoy Pobater S.A.), con la cual la FRD-UTN posee un convenio específico de trabajo. Así mismo, en paralelo se continuará con la puesta a punto de la técnica de HPLC para la identificación y cuantificación del biosurfactante en el medio de cultivo a partir de la utilización de un estándar adecuado. Continuando con las detecciones cromatográficas, se está trabajando en el desarrollo que de una técnica de HPLC que involucre el análisis en cuanto al grado de pureza del glicerol biológico, co-producto de la industria del biodiesel, con el objetivo de analizar cómo afectan al crecimiento concomitantemente a la producción de biosurfactantes las distintas impurezas presentes en este sustrato, ya que las mismas variarían lote a lote. De esta manera, a través de estos estudios, se buscará realizar transferencia de las tecnologías desarrolladas, las cuales incluirá brindar un servicio innovador e integral de biorremediación destinado al sector público y empresas privadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abramovitch, R. A., Bangzhou, H. U. A. N. G., & Abramovitch, D. A. (1999). *IN SITU DECOMPOSITION OF PCBs IN SOIL USING MICROWAVE ENERGY*. 38(10), 2227–2236.
- Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., Ehinomen, I., & Biology, E. (2015). Bioremediation , Biostimulation and Bioaugmentation : A Review. *Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation*, 3(1), 28–39. <https://doi.org/10.12691/ijebb-3-1-5>
- Agrawal, N., Verma, P., & Shahi, S. K. (2018). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (phenanthrene and pyrene) by the ligninolytic fungi *Ganoderma lucidum* isolated from the hardwood stump. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0197-5>
- Ahmad, Z., Crowley, D., Arshad, M., Imran, M. (2015). Biosurfactants and Bioemulsifiers for Treatment of Industrial Wastes. In R. Chandra (Ed.), *Advances in Biodegradation and Bioremediation of Industrial Waste*.
- Ahmadnezhad, Z., Vaezihir, A., Schüth, C., & Zarrini, G. (2020). Combination of zeolite barrier and bio sparging techniques to enhance efficiency of organic hydrocarbon remediation in a model of shallow groundwater. *Chemosphere*, 128555. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128555>
- Aitken, M. D., Stringfellow, W. T., Nagel, R. D., Kazunga, C., & Chen, S. (1998). Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Canadian Journal of Microbiology*, 752(7400), 743–752.
- Al-wahaibi, Y., Joshi, S., Al-bahry, S., & Elshafie, A. (2014). Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.022>
- Alvarez, P., & Illman, W. (2006). Introduction to bioremediation. In *Bioremediation and natural attenuation: Process fundamentals and mathematical models* (pp. 1–23).
- Álvarez, R., Leavy, S., & Marino, M. (2009). Zonas Agroecológicas Homogéneas Buenos Aires Norte. *INTA*. issn: 1851-6955
- Alvarez, V. M., Guimarães, C. R., Jurelevicius, D., de Castilho, L. V. A., de Sousa, J. S., da Mota, F. F., Freire, D. M. G., & Seldin, L. (2020). Microbial enhanced oil recovery potential of surfactin-producing *Bacillus subtilis* AB2.0. *Fuel*, 272(March), 117730. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117730>
- Alves, A., Tomás, J., Fernandes, V., Alvim-ferraz, C. M., & Delerue-matos, C. (2010). Remediation of soils combining soil vapor extraction and bioremediation : Benzene. *Chemosphere*, 80, 823–828. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.06.036>
- Amani, F., Student, P., Akbar, A., Sinegani, S., Ebrahimi, F., & Nazarian, S. (2019). Biodegradation of Chlorpyrifos and Diazinon Organophosphates by Two Bacteria Isolated from Contaminated Agricultural Soils. *Biological Journal of Microorganism*, 7(28), 27–39. http://bjm.ui.ac.ir/article_22826_6a3890dee1b08c8e1efa308998666dab.pdf
- Angeles, O., Medina-Moreno, S. A., Jiménez-González, A., Coreño-Alonso, A., & Lizardi-Jiménez, M. A. (2017). Predominant mode of diesel uptake: Direct interfacial versus emulsification in multiphase bioreactor. *Chemical Engineering Science*, 165, 108–112. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2017.02.046>
- Arroyo, M. (2008). Nuevas fuentes de energía para un futuro sostenible. ¿Petróleo caro o protección del medio? *Scripta Nova. Revista Electrónica de Geografía y Ciencias Sociales*,

- XII(270 (9)). <https://doi.org/ISSN: 1138-9788>
- Ashby, R. D., McAloon, A. J., Solaiman, D. K. Y., Yee, W. C., & Reed, M. (2013). A process model for approximating the production costs of the fermentative synthesis of sophorolipids. *Journal of Surfactants and Detergents*, 16(5), 683–691. <https://doi.org/10.1007/s11743-013-1466-0>
- Ayeni, A. O., Oyekunle, D. T., Adegbite, O., Alagbe, E., & Ejekwu, O. (2019). Physico-chemical remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Journal of Physics: Conference Series*, 1299(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1299/1/012121>
- Bages-Estopa, S., White, D. A., Winterburn, J. B., Webb, C., & Martin, P. J. (2018). Production and separation of a trehalolipid biosurfactant. *Biochemical Engineering Journal*, 139, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.006>
- Baltz, R. H., Miao, V., Wrigley, S. K., & Miao, V. (2005). Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics. *Natural Products Report*, 22(6), 717–741.
- Bamforth, S., Manning, D., Singleton, I. (2005). *Naphtalene Transformation By The Pseudomonas At An Elevated pH*.
- Bamforth, S. M., & Singleton, I. (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons : current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 736(October 2004), 723–736. <https://doi.org/10.1002/jctb.1276>
- Banat I, Satpute S, Cameotra S, Patil R, N. N. (2014). *Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants production*. 5(December), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00697>
- Banat, I. M. (1997). Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 47–64.
- Basumatary, M., Das, S., Gogoi, M., Das, I., Charingia, D., & Borah, D. (2020). Evaluation of pilot scale in-vitro and ex-situ hydrocarbon bioremediation potential of two novel indigenous strains of *Bacillus vallismortis*. *Bioremediation Journal*, 24(2–3), 190–203. <https://doi.org/10.1080/10889868.2020.1799928>
- Bezza, F. A., & Nkhalambayausi Chirwa, E. M. (2016). Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. *Chemosphere*, 144, 635–644. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.027>
- Blaise, C., Gideon, C., & Okpokwasili, C. (2011). Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *3Biotech*, 1(3), 117–138. <https://doi.org/10.1007/s13205-011-0014-8>
- Bongartz, P., Karmainski, T., Meyer, M., Linkhorst, J., Tiso, T., Blank, L. M., & Wessling, M. (2023). A novel membrane stirrer system enables foam-free biosurfactant production. *Biotechnology and Bioengineering*, 120(5), 1269–1287. <https://doi.org/10.1002/bit.28334>
- Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74.
- Borges, W. S., Moura, A. A. O., Filho, U. C., Cardoso, V. L., & Resende, M. M. (2015). OPTIMIZATION OF THE OPERATING CONDITIONS FOR RHAMNOLIPID PRODUCTION USING SLAUGHTERHOUSE-GENERATED INDUSTRIAL FLOAT AS SUBSTRATE. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 32(02), 357–365.
- BP. (2022). BP Statistical Review of World Energy 2022,(71st edition). *Bp*, 1–60. <https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2022-full-report.pdf>

- Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G. A., Uad, I., & González-López, J. (2009). Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Science of the Total Environment*, 407(12), 3634–3640. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.07.008>
- Carberry, J. B., & Wik, J. (2015). COMPARISON OF EX SITU AND IN SITU BIOREMEDIATION OF UNSATURATED SOILS CONTAMINATED BY PETROLEUM. *Journal of Environmental Science and Health , Part A : Toxic / Hazardous Substances and Environmental Engineering*, January 2015, 37–41. <https://doi.org/10.1081/ESE-100105726>
- Carrillo, P. G., Mardaraz, C., & Giuliett, A. M. (1996). Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 12, 62–64.
- Cavcic, M. (2022). *Oil & gas firms' profits set to smash records reaching \$834 billion in 2022, Rystad says*. <https://www.offshore-energy.biz/oil-gas-firms-profits-set-to-smash-records-reaching-834-billion-in-2022-rystad-says/>
- CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment). (2010). Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health: Polycyclic aromatic hydrocarbons. *Canadian Environmental Quality Guidelines*, 19. <https://ccme.ca/en/res/polycyclic-aromatic-hydrocarbons-2010-canadian-soil-quality-guidelines-for-the-protection-of-environmental-and-human-health-en.pdf>
- Center, H. S. R. (2003). Environmental Impacts of the Petroleum Industry. *Environmental Update*, 12.
- Chandran, P., & Das, N. (2014). Biosurfactant Production and Diesel Oil Degradation By Yeast Isolated From Petroleum. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 2(December 2010), 6942–6953.
- Chen, C., Baker, S. C., & Darton, R. C. (2007). The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *Journal of Microbiological Methods*, 70, 503–510. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.06.006>
- Chrysanthis, P. K., Raghuram, S., & Ramamritham, K. (1991). PROTOCOLO DE KYOTO DE LA CONVENCION MARCO DE LAS NACIONES UNIDAS SOBRE EL CAMBIO CLIMATICO. *Proceedings of the ACM SIGMOD International Conference on Management of Data*, 61702, 108–117. <https://doi.org/10.1145/115790.115803>
- Cooper, D. G., & Goldenberg, B. G. (1987). Surface-Active Agents from Two Bacillus Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), 224 LP – 229. <http://aem.asm.org/content/53/2/224.abstract>
- Coulon, F., Pelletier, E., Gourhant, L., Delille, D. (2005). Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil. *Chemosphere*, 58, 1439–1448. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.007>
- Crisafi, F., Giuliano, L., Yakimov, M. M., Azzaro, M., & Denaro, R. (2016). Isolation and degradation potential of a cold-adapted oil/PAH-degrading marine bacterial consortium from Kongsfjorden (Arctic region). *Rendiconti Lincei*, 27, 261–270. <https://doi.org/10.1007/s12210-016-0550-6>
- Darvishi, P., Ayatollahi, S., Mowla, D., & Niazi, A. (2011). Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(2), 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.01.011>

- Das, P., Mukherjee, S., & Sen, R. (2008). Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(July 2007), 1675–1684. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03701.x>
- Das, P., Mukherjee, S., & Sen, R. (2009). Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. *Bioresource Technology*, *100*(2), 1015–1019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.015>
- Daverey, A., Pakshirajan, K., & Sumalatha, S. (2011). Sophorolipids production by *Candida bombicola* using dairy industry wastewater. *Clean Technology and Environmental Policy*, *13*, 481–488.
- Desai, A., & Vyas, P. (2006). Petroleum and Hydrocarbon Microbiology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *73*(2), 291–296. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0599-8>
- Diccionario de la Real Academia Española*. (2023). <https://dle.rae.es/petróleo>
- Ding, R., Wu, X. C., Qian, C. D., Teng, Y., Li, O., Zhan, Z. J., & Zhao, Y. H. (2011). Isolation and identification of lipopeptide antibiotics from *Paenibacillus elgii* B69 with inhibitory activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiology*, *49*(6), 942–949. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-1153-7>
- Doheim, M. M. (2014). Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity. *Egyptian Journal of Petroleum*, *23*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2014.02.001>
- Doran, P. M. (2013). *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press - Elsevier.
- Dos Santos, A. S., Pereira, N., & Freire, D. M. G. (2016). Strategies for improved rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *PeerJ*, *2016*(5), 1–16. <https://doi.org/10.7717/peerj.2078>
- Ebadi, A., Khoshkholgh Sima, N. A., Olamaee, M., Hashemi, M., & Ghorbani Nasrabadi, R. (2017). Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Journal of Advanced Research*, *8*(6), 627–633. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.06.008>
- Energías de mi País*. (2023). <https://energiasdemipais.educ.ar/transiciones-energeticas-y-complementariedad/>
- Eraqi, W. A., Yassin, A. S., Ali, A. E., & Amin, M. A. (2016). Utilization of Crude Glycerol as a Substrate for the Production of Rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology Research International*, *2016*.
- EUCAST. (2023). *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. www.eucast.org
- Falciglia, P. P., Lumia, L., Giustra, M. G., Gagliano, E., Roccaro, P., Vagliasindi, F. G. A., & Di Bella, G. (2020). Remediation of petrol hydrocarbon-contaminated marine sediments by thermal desorption. *Chemosphere*, *260*, 127576. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127576>
- Festa, S., Coppotelli, B. M., & Morelli, I. S. (2016). Comparative bioaugmentation with a consortium and a single strain in a phenanthrene-contaminated soil: Impact on the bacterial community and biodegradation. *Applied Soil Ecology*, *98*, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.08.025>
- Fontes, G. C., Filomena, P., Amaral, F., Nele, M., Alice, M., & Coelho, Z. (2010). Factorial Design to Optimize Biosurfactant Production by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2010*, 8. <https://doi.org/10.1155/2010/821306>

- Francisca, C., Michelon, M., Medeiros, J. F. De, Kalil, S. J., André, C., & Burkert, V. (2010). Production of a rhamnolipid-type biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* LBM10 grown on glycerol. *African Journal of Biotechnology*, 9(53), 9012–9017.
- Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., & Smyth, T. J. P. (2010). Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 617–627. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900162>
- Freeman, D. J., & Cattell, F. C. R. (1990). Woodburning as a Source Of Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Science and Technology*, 24(10), 1581–1585.
- Frutos, F. J. G., Escolano, O., García, S., Babín, M., & Fernández, M. D. (2010). Bioventing remediation and ecotoxicity evaluation of phenanthrene-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1–3), 806–813. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.098>
- Gakpe, P. K. R. and E. (2008). Rahman , K . S . M . and Gakpe , E . (2008) ' Production , characterisation and applications of biosurfactants - Review ', *Biotechnology*, 7(2), 360–370.
- Garcia-choa, F., & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes : An overview. *Biotechnology Advances*, 27(2), 153–176. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>
- Gautam K, T. V. (2006). Microbial Surfactants : A Review. *Journal of Oleo Science*, 55(4), 155–166.
- George, S., & Jayachandran, K. (2013). Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel *Pseudomonas aeruginosa* D. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/jam.12069>
- Ghasemi, A., Moosavi-Nasab, M., Setoodeh, P., Mesbahi, G., & Yousefi, G. (2019). Biosurfactant Production by Lactic Acid Bacterium *Pediococcus dextrinicus* SHU1593 Grown on Different Carbon Sources: Strain Screening Followed by Product Characterization. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41589-0>
- Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T. K., & Ahn, Y. (2016). Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. *Frontiers in Microbiology*, 7(August). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369>
- Gibson, D., Koch, J., Kallio, R. (1968). Oxidative Degradation Of Aromatic Hydrocarbons By Microorganisms. I. Enzymatic Formation Of Catechol From Benzene. *Biochemistry*, 7, 2653–2661.
- Gidudu, B., Mudenda, E., & Chirwa, E. M. N. (2020). Biosurfactant produced by *serrati* sp. And its application in bioremediation enhancement of oil sludge. *Chemical Engineering Transactions*, 79(November 2019), 433–438. <https://doi.org/10.3303/CET2079073>
- Godoy, P., Reina, R., Calderón, A., Wittich, R. M., García-Romera, I., & Aranda, E. (2016). Exploring the potential of fungi isolated from PAH-polluted soil as a source of xenobiotics-degrading fungi. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(20), 20985–20996. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7257-1>
- Gomes, H. I., Dias-ferreira, C., & Ribeiro, A. B. (2012). Electrokinetic remediation of organochlorines in soil : Enhancement techniques and integration with other remediation technologies. *Chemosphere*, 87(10), 1077–1090. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.037>

- Gonçalves, Í. W. L. de F. A. P. L. J. A. M. L. C. G. F. L. V. M. M. M. H. B. de S. L. R. B. (2015). Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils.pdf. *Catalysis Today*, 255, 10–15.
- Goswami, L., Arul Manikandan, N., Pakshirajan, K., & Pugazhenth, G. (2017). Simultaneous heavy metal removal and anthracene biodegradation by the oleaginous bacteria *Rhodococcus opacus*. *3 Biotech*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0597-1>
- Greenhouse effect*. (2021). Department of Agriculture, Water and the Environment - Australian Government. <https://www.environment.gov.au/climate-change/climate-science-data/climate-science/greenhouse-effect>
- Guarino, C., Spada, V., & Sciarrillo, R. (2017). Assessment of three approaches of bioremediation (Natural Attenuation, Landfarming and Bioaugmentation – Assisted Landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. *Chemosphere*, 170, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.165>
- Guntupalli, S., Thunuguntla, V. B. S. C., Santha Reddy, K., Issac Newton, M., Rao, C. V., & Bondili, J. S. (2016). Enhanced Degradation of Carcinogenic PAHs Benzo (a) Pyrene and Benzo (k) Fluoranthene by a Microbial Consortia. *Indian Journal of Science and Technology*, 9(35). <https://doi.org/10.17485/ijst/2016/v9i35/93590>
- Guo, J., & Wen, X. (2021). Performance and kinetics of benzo(a)pyrene biodegradation in contaminated water and soil and improvement of soil properties by biosurfactant amendment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207(August 2020), 111292. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111292>
- Gurjar, J., & Sengupta, B. (2015). Production of surfactin from rice mill polishing residue by submerged fermentation using *Bacillus subtilis* MTCC 2423. *Bioresource Technology*, 189, 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.013>
- Hajibagheri, F., Hashemi, A., Lashkarbolooki, M., & Ayatollahi, S. (2018). Investigating the synergic effects of chemical surfactant (SDBS) and biosurfactant produced by bacterium (*Enterobacter cloacae*) on IFT reduction and wettability alteration during MEOR process. *Journal of Molecular Liquids*, 256(2017), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.02.020>
- Hassan, A., Pariatamby, A., Ahmed, A., Auta, H. S., & Hamid, F. S. (2019). Enhanced Bioremediation of Heavy Metal Contaminated Landfill Soil Using Filamentous Fungi Consortia: a Demonstration of Bioaugmentation Potential. *Water, Air, and Soil Pollution*, 230(9). <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4227-5>
- Hausmann, R., & Syldatk, C. (2015). Types and Classification of Microbial Surfactants. In N. Kosaric & F. V. Sukan (Eds.), *Biosurfactants: Production and Utilization - Processes, Technologies, and Economics* (1st editio, pp. 327–360). CRC Press.
- He, Q. (Sophia), McNutt, J., & Yang, J. (2017). Utilization of the residual glycerol from biodiesel production for renewable energy generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71(December 2016), 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.110>
- Hippolyte, M. T., Augustin, M., Hervé, T. M., & Robert, N. (2018). Application of response surface methodology to improve the production of antimicrobial biosurfactants by *Lactobacillus paracasei* subsp . *tolerans* N2 using sugar cane molasses as substrate. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(48). <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0234-4>
- Ho, Y., Jackson, M., Yang, Y., Mueller, J. G., & Pritchard, P. H. (2000). Characterization of fluoranthene- and pyrene-degrading bacteria isolated from PAH-contaminated soils and

- sediments. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24, 100–112.
- Honda, M., & Suzuki, N. (2020). Toxicities of polycyclic aromatic hydrocarbons for aquatic animals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4). <https://doi.org/10.3390/ijerph17041363>
- Hultberg M, Alsberg T, Khalil S, A. B. (2010). Suppression of disease in tomato infected by *Pythium ultimum* with a biosurfactant produced by *Pseudomonas koreensis*. *BioControl*, 55, 435–444. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9261-6>
- IRNEA. (2022). Renewable Power Generation Costs in 2021. In *International Renewable Energy Agency*. https://www.irena.org/-/media/Files/IRENA/Agency/Publication/2018/Jan/IRENA_2017_Power_Costs_2018.pdf
- ITOPF. (2014). *EFFECTS OF OIL POLLUTION ON THE MARINE ENVIRONMENT*.
- Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M., & Alexandridis, P. (2020). Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 275, 102061. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>
- Jain, R. M., Mody, K., Joshi, N., Mishra, A., & Jha, B. (2013). Production and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium, *Klebsiella* sp.: Evaluation of different carbon sources. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108, 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.03.002>
- Jemil, N., Hmidet, N., Ben Ayed, H., & Nasri, M. (2018). Physicochemical characterization of *Enterobacter cloacae* C3 lipopeptides and their applications in enhancing diesel oil biodegradation. *Process Safety and Environmental Protection*, 117, 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.05.018>
- Jia, J., Zhao, S., Hu, L., Wang, Y., Yao, L., Liu, Y., & Yuan, Z. (2016). Removal efficiency and the mineralization mechanism during enhanced bioventing remediation of oil-contaminated soils. *Polish Journal of Environmental Studies*, 25(5), 1955–1963. <https://doi.org/10.15244/pjoes/63411>
- Jiménez Islas, D., Medina Moreno, S. A., & Gracida Rodríguez, J. N. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensioactivos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 26(1), 65–84.
- Jiménez, T. J., Noyola, A. J., Romero, R. Y., Barrera, R. M., Román, R., Ledezma Jesús Carlos, R., Sanchez, A. A., Aradillas, V. J., & México, G. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to antibiotics and heavy metals, producing biosurfactant, pyocyanin and biofilm from surfaces hospital environment. 45(4), 36–45.
- Johnsen, A. R., Wick, L. Y., & Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.015>
- Jones, W. (1997). Biosurfactants_bioavailability and bioremediation. *Global Environmental Biotechnology*, 379–391.
- Jove, P., Olivella, M. A., Camarero, S., Caixach, J., Planas, C., Cano, L., & De Las Heras, F. X. (2016). Fungal biodegradation of anthracene-polluted cork: A comparative study. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 51(1), 70–77. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.1079114>
- Kachrimanidou, V., Alimpoumpa, D., Papadaki, A., Lappa, I., Alexopoulos, K., & Kopsahelis, N. (2022). Cheese whey utilization for biosurfactant production: evaluation of bioprocessing strategies using novel *Lactobacillus* strains. *Biomass Conversion and*

- Biorefinery*, 4621–4635. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02767-9>
- Kanally, R. A., & Harayama, S. (2000). Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2059–2067.
- Kasai, E., Harjanto, S., Terui, T., Nakamura, T., & Waseda, Y. (2000). *Thermal remediation of PCDD / Fs contaminated soil by zone combustion process*. 41.
- Kastner, M., Breuer-Jammali, M., Mahro, B. (1998). Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of PAHs and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(64), 359–362.
- Kingston, P. F. (2002). Long-term Environmental Impact of Oil Spills Introduction: Origin and Nature of Oil. *Spill Science & Technology Bulletin*, 7(02), 53–61. https://ac.els-cdn.com/S1353256102000518/1-s2.0-S1353256102000518-main.pdf?_tid=b81283af-98a6-49e0-8c8e-10b94d798aad&acdnat=1520686956_5418ce2eb4e1816d6d0eb33af139e5ad
- Kiran, G. S., Priyadharsini, S., Sajayan, A., Priyadharsini, G. B., Poulose, N., & Selvin, J. (2017). Production of lipopeptide biosurfactant by a marine *Nesterenkonia* sp. and its application in food industry. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01138>
- Kirk, & Othmer. (2000). *Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/0471238961>
- Komilis, D. P., Vrohidou, A. E. K., & Voudrias, E. A. (2010). Kinetics of aerobic bioremediation of a diesel-contaminated sandy soil: Effect of nitrogen addition. *Water, Air, and Soil Pollution*, 208(1–4), 193–208. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0159-9>
- Kumar, M., Leon, V., De Sisto Materano, A., Ilzins, O., Galindo-Castro, I., & Fuenmayor, S. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. IR1.pdf. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 203–212.
- Labianca, C., De Gisi, S., Picardi, F., Todaro, F., & Notarnicola, M. (2020). Remediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated site by soil vapor extraction: A full-scale case study. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/app10124261>
- Lu, Q., Chen, K., Long, Y., Liang, X., He, B., Yu, L., & Ye, J. (2019). Benzo(a)pyrene degradation by cytochrome P450 hydroxylase and the functional metabolism network of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Hazardous Materials*, 366(July 2018), 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.12.004>
- Madueño, L., Coppotelli, B. M., & Morelli, I. S. (2009). Efecto de la inoculación de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA sobre la composición de un consorcio bacteriano degradador de fenantreno. *Revista Argentina de Microbiología*, 41(2), 65–72.
- MAGYP. (2018). *Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina*. https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/observatorio_bioeconomia/indicadores/06/index.php
- Mandri, T., & Lin, J. (2007). Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, 6(January), 23–27.
- Marchand, C., St-Arnaud, M., Hogland, W., Bell, T. H., & Hijri, M. (2017). Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 116, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.09.030>
- Marin, A., Sturbrin, L., & Kababe, Y. (2014). Capacidades de innovación. *Desarrollo*

- Económico*, 54(212), 132–160. <https://doi.org/10.2307/j.ctv1k03s10.11>
- Marks, P., Wujcik, W., & Loncar, A. (1994). *Remediation technologies screening matrix and reference guide* (Issue October).
- Marqués, A. M., Pinazo, A., Farfan, M., Aranda, F. J., Teruel, J. A., Ortiz, A., Manresa, A., & Espuny, M. J. (2009). The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. *Chemistry and Physics of Lipids*, 158(2), 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.01.001>
- Martínez Álvarez, L. M., Ruberto, L. A. M., Lo Balbo, A., & Mac Cormack, W. P. (2017). Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils in cold regions: Development of a pre-optimized biostimulation biopile-scale field assay in Antarctica. *Science of the Total Environment*, 590–591, 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.204>
- Mason, B. (1992). EPA Preparation of Soil Sampling Protocols : Sampling Techniques and Strategies. *Environmental Protection Agency (US)*, July.
- Massa, V., Infantino, A., Radice, F., Orlandi, V., Tavecchio, F., Giudici, R., Conti, F., Urbini, G., Di Guardo, A., & Barbieri, P. (2009). Efficiency of natural and engineered bacterial strains in the degradation of 4-chlorobenzoic acid in soil slurry. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63(1), 112–115. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.07.006>
- Matcott, J., Baylis, S., & Clarke, R. H. (2019). The influence of petroleum oil films on the feather structure of tropical and temperate seabird species. *Marine Pollution Bulletin*, 138(September 2017), 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.11.010>
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., & Venkateswarlu, K. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants : A critical perspective. *Environment International*, 37(8), 1362–1375. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.06.003>
- Mehdi, S., Dondapati, J. S., & Rahman, P. K. S. M. (2011). Influence of nitrogen and phosphorus on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 using glycerol as carbon source. *Biotechnology*, 10(2), 183–189. <https://doi.org/10.3923/biotech.2011.183.189>
- Mesa, L., Falcón, J., Ruiz, Y., Arias, R., & Pérez, J. (2019). MONITORING OF WATER POLLUTION BY HYDROCARBONS IN THE MIRROR OF BAY OF. *Revista Boliviana de Química*, 36(4), 157–172.
- Mishra, M., Singh, S. K., & Kumar, A. (2021). Environmental factors affecting the bioremediation potential of microbes. In *Microbe Mediated Remediation of Environmental Contaminants* (pp. 47–58). INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821199-1.00005-5>
- Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M., & Sayadi, S. (2011). Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 111(3), 525–536. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05071.x>
- Mohamed, M. S. M., El-Arabi, N. I., El-Hussein, A., El-Maaty, S. A., & Abdelhadi, A. A. (2020). Reduction of chromium-VI by chromium-resistant *Escherichia coli* FACU: a prospective bacterium for bioremediation. *Folia Microbiologica*, 65(4), 687–696. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00771-y>
- Moreno, J. D., Rodríguez S, J. L., Poznyak, T., Chairez, I., & Dorantes-Rosales, H. J. (2020). Effect of the type of soil on dimethyl phthalate degradation by ozone. *Journal of Environmental Management*, 270(May). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110863>

- Moshtagh, B., Hawboldt, K., & Zhang, B. (2021). Biosurfactant production by native marine bacteria (*Acinetobacter calcoaceticus* P1-1A) using waste carbon sources: Impact of process conditions. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 99(11), 2386–2397.
- Moya Ramírez, I., Tsaousi, K., Rudden, M., Marchant, R., Jurado Alameda, E., García Román, M., & Banat, I. M. (2015). Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. *Bioresource Technology*, 198, 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.012>
- Mulet, M., Lalucat, J., & García-valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*, 12, 1513–1530. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x>
- Mulligan, C. (2014). Characterization, Production And Applications Of Lipopeptides. In A. M. Catherine N. Mulligan, Sanjay K. Sharma (Ed.), *Biosurfactants: Research Trends and Applications*.
- Mulligan, C. N. (2009). Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14(5), 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.06.005>
- Nair, A. S., Al-Bahry, S., & Sivakumar, N. (2020). Co-production of microbial lipids and biosurfactant from waste office paper hydrolysate using a novel strain *Bacillus velezensis* ASN1. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 10(2), 383–391. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00420-6>
- Nickzad, A., Guertin, C., & Eric, D. (2018). *Culture Medium Optimization for Production of Rhamnolipids by Burkholderia glumae*. 2(49). <https://doi.org/10.3390/colloids2040049>
- Nielsen, T. H., Sørensen, D., Tobiasen, C., Andersen, J. B., Christophersen, C., Givskov, M., & Sørensen, J. (2002). Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the sugar beet rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3416–3423. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3416-3423.2002>
- Nitschke, M., Costa, S. G. V. A. O., Haddad, R., Gonc, L. A. G., Eberlin, M. N., & Contiero, J. (2005). Oil Wastes as Unconventional Substrates for Rhamnolipid Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. *Biotechnology Progress*, 3, 1562–1566.
- Obayori, O. S., Ilori, M. O., Adebusoye, S., & Oyetibo, G. O. (2008). Pyrene-degradation potentials of *Pseudomonas* species isolated from polluted tropical soils. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24(November). <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9790-7>
- Oil and petroleum products explained*. (2021). U.S. Energy Information Administration. <https://www.eia.gov/energyexplained/oil-and-petroleum-products/>
- Olivera, N. L., & Nievas, M. L. (2009). *Biosurfactants and their uses in the petroleum industry and hydrocarbon pollution remediation*.
- ONU. (2006). Manual del Protocolo de Montreal relativo a las sustancias que agotan la Capa de Ozono. In *Medidas de control*.
- Organization of the Petroleum Exporting Countries. (2022). *OPEC Annual Statistical Bulletin 2022 57th edition*. 96.
- Ossai, I. C., Ahmed, A., Hassan, A., & Hamid, F. S. (2020). Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology and*

- Innovation*, 17. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100526>
- Oualha, M., Al-Kaabi, N., Al-Ghouti, M., & Zouari, N. (2019). Identification and overcome of limitations of weathered oil hydrocarbons bioremediation by an adapted *Bacillus sorensis* strain. *Journal of Environmental Management*, 250(May), 109455. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109455>
- Pacwa-Płociniczak, M., Czapla, J., Płociniczak, T., & Piotrowska-Seget, Z. (2019). The effect of bioaugmentation of petroleum-contaminated soil with *Rhodococcus erythropolis* strains on removal of petroleum from soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169(August 2018), 615–622. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.081>
- Pandey, B., Upadhyay, S. K., & Singh, L. K. (2020). Bioconversion of crude glycerol to biosurfactant using *Pseudomonas aeruginosa* in a bioreactor under optimized conditions. *International Journal of New Innovations in Engineering and Technology Bioconversion*, 13(3), 77–86.
- Panjiar, N., Mattam, A. J., Jose, S., Gandham, S., & Velankar, H. R. (2020). Valorization of xylose-rich hydrolysate from rice straw, an agroresidue, through biosurfactant production by the soil bacterium *Serratia nematodiphila*. *Science of the Total Environment*, 729. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138933>
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C., & Deka, S. (2017). Characterization of biosurfactant produced during degradation of hydrocarbons using crude oil as sole source of carbon. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00279>
- Peekate, P. L., Abu, G. O., & Harcourt, P. (2017). Optimizing C : N Ratio , C : P Ratio , and pH for Biosurfactant Production by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Advances in Microbiology*, 7(June), 1–14. <https://doi.org/10.9734/JAMB/2017/38199>
- Peele, A., Venkateswarulu, T. C., & Tammineedi, J. (2018). Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum*, 4(3), 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007>
- Pele, M. A., Ribeaux, D. R., Vieira, E. R., Souza, A. F., Luna, M. A. C., Rodríguez, D. M., Andrade, R. F. S., Alviano, D. S., Alviano, C. S., Barreto-Bergter, E., Santiago, A. L. C. M. A., & Campos-Takaki, G. M. (2019). Conversion of renewable substrates for biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 and enhancing the removal of diesel oil from marine soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, 38, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.12.003>
- Pepper, I. L., Gerba, C. P., & Gentry, T. J. (2015). Global Emerging Microbial Issues in the Anthropocene Era. In *Environmental Microbiology: Third Edition* (pp. 677–688). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00001-6>
- Persson, A., Österberg, E., & Dostalek, M. (1988). Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 378: growth and product characteristics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 1–4. <https://doi.org/10.1007/BF00258342>
- Pickett, P. D., Kasprzak, C. R., Siefker, D. T., Abel, B. A., Dearborn, M. A., & McCormick, C. L. (2018). Amphoteric, Sulfonamide-Functionalized “polysoaps”: CO₂-Induced Phase Separation for Water Remediation. *Macromolecules*, 51(21), 9052–9059. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.8b01613>
- Plaza, G., Zjawiony, I., & Banat, I. M. (2006). Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science & Engineering*, 50, 71–77.

- <https://doi.org/10.1016/j.petro.2005.10.005>
- Poi, G., Aburto-Medina, A., Mok, P. C., Ball, A. S., & Shahsavari, E. (2017). Large scale bioaugmentation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons using a mixed microbial consortium. *Ecological Engineering*, 102, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.01.048>
- Power Technology*. (2023). www.power-technology.com
- Puente: Soluciones Financieras*. (2021). <https://www.puente.net/cotizaciones/commodity/EBV14>
- Rabelo de Sousa, J., da Costa Correia, J. A., Lima de Almeida, J. G., Rodrigues, S., Loiola Pessoa, O. D., Melo, V. M., & Barros Gonçalves, L. R. (2011). Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production of biosurfactant by *P. aeruginosa* MSIC02. *Process Biochemistry*, 46, 1831–1839.
- Radice, M., Marín, M., Giovanakis, M., Vay, C., Almuzara, M., Limansky, A., Casellas, J. M., Famiglietti, A., Quinteros, M., Bantar, C., Galas, M., Pupko, J. K., Nicola, F., Pasterán, F., Soloaga, R., & Gutkind, G. (2011). Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en los bacilos gram negativos no fermentadores de importancia clínica: Recomendaciones de la subcomisión de antimicrobianos de la sociedad argentina de bacteriología. *Revista Argentina de Microbiología*, 43(2), 136–153.
- Rahmeh, R., Akbar, A., Kumar, V., Al-Mansour, H., Kishk, M., Ahmed, N., Al-Shamali, M., Boota, A., Al-Ballam, Z., Shajan, A., & Al-Okla, N. (2021). Insights into Bacterial Community Involved in Bioremediation of Aged Oil-Contaminated Soil in Arid Environment. *Evolutionary Bioinformatics*, 17. <https://doi.org/10.1177/11769343211016887>
- Ranju, S., Singh, N. S., Dhingra, N., & Parween, T. (2020). Bioremediation of Oil-Spills from ShoreLine Environment. In M. Oves, M. Ansari, M. Zain Khan, M. Shahadat, & I. M.I. Ismail (Eds.), *Modern Age Waste Water Problems*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-08283-3_13
- Rashedi, Hamid; Mazaheri Assadi, Mahnaz; Jamshidi, Esmail; Bonakdarpour, B. (2006). Optimization of the Production of Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* HR Isolated from an Iranian Southern Oil Well. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 25(1), 25–30.
- Riser-Roberts, E. (1998). *Remediation of Petroleum-Contaminated Soils: Biological, Physical and Chemical Processes*. <http://dx.doi.org/10.1201/9781420050578>
- Rocha e Silva, N. M. P., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2014). Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.005>
- Rodrigues, J. L. M., Kachel, C. A., Aiello, M. R., Quensen, J. F., Maltseva, O. V., Tsoi, T. V., & Tiedje, J. M. (2006). Degradation of aroclor 1242 dechlorination products in sediments by *Burkholderia xenovorans* LB400(ohb) and *Rhodococcus* sp. strain RHA1(fcb). *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2476–2482. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2476-2482.2006>
- Rodri, A., Font, X., & Gea, T. (2019). *Use of wastes for sophorolipids production as a transition to circular economy : state of the art and perspectives*. 3. <https://doi.org/10.1007/s11157-019-09502-3>

- Romero, I. C., Sutton, T., Carr, B., Quintana-Rizzo, E., Ross, S. W., Hollander, D. J., & Torres, J. J. (2018). Decadal Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mesopelagic Fishes from the Gulf of Mexico Reveals Exposure to Oil-Derived Sources. *Environmental Science and Technology*, 52(19), 10985–10996. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02243>
- Ryan K, R. C. (2004). *Sherrys Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases* (4th ed.). McGraw-Hill.
- Saimmai, A., Kaewrueng, J., & Maneerat, S. (2012). Used lubricating oil degradation and biosurfactant production by SC-9 consortia obtained from oil-contaminated soil. *Annals of Microbiology*, 62(4), 1757–1767. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0434-7>
- Samanta, S. K., Chakraborti, A. K., & Jain, R. (1999). Degradation of phenanthrene by different bacteria : evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 98–107.
- Santos, D. K. F., Brandão, Y. B., Rufino, R. D., Luna, J. M., Salgueiro, A. A., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2014). Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(3), 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.02.004>
- Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 1–31. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>
- Sekhon, K. K., Khanna, S., & Cameotra, S. S. (2011). Enhanced biosurfactant production through cloning of three genes and role of esterase in biosurfactant release. *Microbial Cell Factories*, 10, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-49>
- Semple, K., Morriss, A., & Paton, G. (2003). Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science*, 54(4), 809–818. <https://doi.org/doi:10.1046/j.1351-0754.2003.0564.x>
- Seo, J., Keum, Y., & Li, Q. X. (2009). Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6, 278–309. <https://doi.org/10.3390/ijerph6010278>
- Shah, M. U. H., Moniruzzaman, M., Sivapragasam, M., Talukder, M. M. R., Yusup, S. B., & Goto, M. (2019). A binary mixture of a biosurfactant and an ionic liquid surfactant as a green dispersant for oil spill remediation. *Journal of Molecular Liquids*, 280, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.02.049>
- Sharma, S., Verma, R., & Pandey, L. M. (2019). Crude oil degradation and biosurfactant production abilities of isolated *Agrobacterium fabrum* SLAJ731. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21(July), 101322. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101322>
- Shigenaka, G. (2014). Twenty-Five Years After the Exxon Valdez Oil Spill : *National Oceanic and Atmospheric Administration Scientific Support, Monitoring and Research*, 78.
- Silva, M. J., Soares, S. A. R., Santos, I. D. F., Pepe, I. M., Teixeira, L. R., Pereira, L. G., Silva, L. B. A., & Celino, J. J. (2020). Optimization of the photocatalytic degradation process of aromatic organic compounds applied to mangrove sediment. *Heliyon*, 6(10), e05163. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05163>
- Silva S, Farias C, Rufino R, Luna J, S. L. (2010). Glycerol As Substrate For The Production Of Biosurfactant By *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79, 174–183.

- Singh, P., Patil, Y., & Rale, V. (2019). Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 126(1), 2–13. <https://doi.org/10.1111/jam.14057>
- Sivagami, K., Padmanabhan, K., Joy, A. C., & Nambi, I. M. (2019). Microwave (MW) remediation of hydrocarbon contaminated soil using spent graphite – An approach for waste as a resource. *Journal of Environmental Management*, 230(May 2018), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.071>
- Sivapathasekaran, C., Mukherjee, S., & Sen, R. (2010). Optimization of a Marine Medium for Augmented Biosurfactant Production. In *International Journal of Chemical Reactor Engineering* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.2202/1542-6580.2231>
- Smith, A. E., Hristova, K., Wood, I., Mackay, D. M., Lory, E., Lorenzana, D., & Scow, K. M. (2005). Comparison of biostimulation versus bioaugmentation with bacterial strain PM1 for treatment of groundwater contaminated with methyl tertiary butyl ether (MTBE). *Environmental Health Perspectives*, 113(3), 317–322. <https://doi.org/10.1289/ehp.6939>
- Smulek, W., Sydow, M., Zabielska-Matejuk, J., & Kaczorek, E. (2020). Bacteria involved in biodegradation of creosote PAH – A case study of long-term contaminated industrial area. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 187(October 2019). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109843>
- Sousa, M. De, Dantas, I. T., Kamilly, A., Felix, N., Ana, B. D. S., Maria, V., Melo, M., Rocha, L., & Gonçalves, B. (2014). *Crude Glycerol from Biodiesel Industry as Substrate for Biosurfactant Production by Bacillus subtilis ATCC 6633*. 57(April), 295–301.
- Srivastava, S., & Kumar, M. (2019). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A sustainable approach. In *Sustainable Green Technologies for Environmental Management* (pp. 111–139). https://doi.org/10.1007/978-981-13-2772-8_6
- Stapleton, R. D., Savage, D. C., Sayler, G. S., & Stacey, G. (1998). Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons in an Extremely Acidic Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4180–4184.
- Steinbu, A. (2010). Application Of Rhodococcus In Bioremediation Of Contaminated Environments. In *Biology of Rhodococcus, Microbiology Monographs*.
- Straube, W., Nestler, C., Hansen, L., Ringleberg, D., Pritchard, P., Jones-Mehehan, J. (2003). Remediation of Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs) through Landfarming with Biostimulation and Bioaugmentation. *Acta Biotechnologica*, 23, 179–196.
- Stroud, J. L., Paton, G. I., & Semple, K. T. (2007). Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: Implications for biodegradation and bioremediation. *Journal of Applied Microbiology*, 102(5), 1239–1253. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03401.x>
- Suja, F., Rahim, F., Raihan, M., Hambali, N., Razali, M. R., Khalid, A., & Hamzah, A. (2014). Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.03.006>
- Sun, Y., Liu, L., Zeng, J., Wu, Y., & Lin, X. (2020). Enhanced cometabolism of benzo(a)anthracene by the lignin monomer vanillate is related to structural and functional responses of the soil microbiome. *Soil Biology and Biochemistry*, 149(November 2019), 107908. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107908>
- Tahseen, R., Afzal, M., Iqbal, S., Shabir, G., Khan, Q. M., Khalid, Z. M., & Banat, I. M. (2016).

- Rhamnolipids and nutrients boost remediation of crude oil-contaminated soil by enhancing bacterial colonization and metabolic activities. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 115, 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.08.010>
- Tao, W., Lin, J., Wang, W., Huang, H., & Li, S. (2020). Biodegradation of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons by the thermophilic bioemulsifier-producing *Aeribacillus pallidus* strain SL-1. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 189(November), 109994. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109994>
- Taylor, P., Brook, T. R., Stiver, W. H., & Zytner, R. G. (2010). *Soil and Sediment Contamination : An International Biodegradation of Diesel Fuel in Soil Under Various Nitrogen Addition Regimes Biodegradation of Diesel Fuel in Soil Under Various Nitrogen Addition*. September 2013, 37–41.
- Tiwari, J., Gandhi, D., Sivanesan, S., Naoghare, P., & Bafana, A. (2020). Remediation of different nitroaromatic pollutants by a promising agent of *Cupriavidus* sp. strain a3. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205(November 2019), 111138. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111138>
- Torres-Farradá, G., Manzano-León, A. M., Rineau, F., Ramos Leal, M., Thijs, S., Jambon, I., Put, J., Czech, J., Guerra Rivera, G., Carleer, R., & Vangronsveld, J. (2019). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by native *Ganoderma* sp. strains: identification of metabolites and proposed degradation pathways. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(17), 7203–7215. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09968-9>
- TREIA. (2023). www.treia.org
- Tursi, A., De Vietro, N., Beneduci, A., Milella, A., Chidichimo, F., Fracassi, F., & Chidichimo, G. (2019). Low pressure plasma functionalized cellulose fiber for the remediation of petroleum hydrocarbons polluted water. *Journal of Hazardous Materials*, 373(September 2018), 773–782. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.04.022>
- Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., & de Carvalho, C. C. C. R. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22(2), 231–241. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>
- US Energy Information Administration, i. (2022). *Oil and petroleum products explained*. <https://www.eia.gov/energyexplained/oil-and-petroleum-products/use-of-oil.php#:~:text=We use petroleum products to,intermediate and end-user goods>.
- Uyttebroek, M., Ortega-Calvo, J. J., Breugelmans, P., & Springael, D. (2006). Comparison of Mineralization of Solid-Sorbed Phenanthrene by Polycyclic Comparison of mineralization of solid-sorbed phenanthrene by polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) -degrading *Mycobacterium* spp . and *Sphingomonas* spp . *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(June 2014), 829–836. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0337-2>
- Velasco, G. (2010). *Posibles causas del accidente de la plataforma Deepwater Horizon*.
- Verma, M., & Haritash, A. K. (2019). Degradation of amoxicillin by Fenton and Fenton-integrated hybrid oxidation processes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(1), 102886. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.102886>
- Volke Sepúlveda, T., & Velasco, J. A. (2002). *Tecnologías de Remediación para Suelos Contaminados*. 64.
- Von Lau, E., Gan, S., Ng, H. K., & Poh, P. E. (2014). Extraction agents for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil in soil washing technologies. *Environmental Pollution*, 184, 640–649. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.09.010>

- Walter, V., Sylđatk, C., Hausmann, R. (2010). Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. In R. Sen (Ed.), *Biosurfactants* (pp. 1–13). Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.
- Walworth, J., Pond, A., Snape, I., Rayner, J., Ferguson, S., & Harvey, P. (2007). Nitrogen requirements for maximizing petroleum bioremediation in a sub-Antarctic soil. *Cold Regions Science and Technology*, 48(2 SPEC. ISS.), 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.coldregions.2006.07.001>
- Whang, L., Liu, P. G., Ma, C., & Cheng, S. (2008). Application of biosurfactants , rhamnolipid , and surfactin , for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials*, 151, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.063>
- Willumsen, P. A., & Karlson, U. (1997). Screening of bacteria , isolated from PAH-contaminated soils , for production of biosurfactants and bioemulsifiers. . . *Biodegradation*, 7, 415–423.
- Wong, J. W. C., Lai, K. M., Wan, C. K., & Fang, M. (2002). Isolation and Optimization of PAH-Degradative Bacteria from Contaminated Soil for PAHs Bioremediation. *Water, Air and Soil Pollution*, 139, 1–13.
- Wu, F., Guo, C., Liu, S., Liang, X., Lu, G., & Dang, Z. (2019). Pyrene Degradation by *Mycobacterium gilvum*: Metabolites and Proteins Involved. *Water, Air, and Soil Pollution*, 230(3). <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4115-z>
- Wu, M., Wu, J., Zhang, X., & Ye, X. (2019). Effect of bioaugmentation and biostimulation on hydrocarbon degradation and microbial community composition in petroleum-contaminated loessal soil. *Chemosphere*, 237, 124456. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124456>
- Wu, S., Liu, G., Zhou, S., Sha, Z., & Sun, C. (2019). Characterization of antifungal lipopeptide biosurfactants produced by marine bacterium *Bacillus* sp. CS30. *Marine Drugs*, 17(4). <https://doi.org/10.3390/md17040199>
- Xu-xiang, Z., Shu-pei, C., Cheng-jun, Z. H. U., & Shi-lei, S. U. N. (2006). Microbial PAH-Degradation in Soil : Degradation Pathways and Contributing Factors *. *Pedosphere*, 16(2001), 555–565.
- Yang, C. F., Liu, S. H., Su, Y. M., Chen, Y. R., Lin, C. W., & Lin, K. L. (2019). Bioremediation capability evaluation of benzene and sulfolane contaminated groundwater: Determination of bioremediation parameters. *Science of the Total Environment*, 648, 811–818. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.208>
- Ye, J., Yin, H., Qiang, J., Peng, H., & Qin, H. (2011). Biodegradation of anthracene by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Hazardous Materials*, 185(1), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.015>
- Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & Mcinerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.001>
- Zhang X., Xu D., Zhu C., Lundaa T., S. K. (2012). Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Chemical Engineering Journal*, 209, 138–146.
- Zhao, T., Yu, Z., Zhang, J., Qu, L., & Li, P. (2018). Low-thermal remediation of mercury-contaminated soil and cultivation of treated soil. *Environmental Science and Pollution*

- Research*, 25(24), 24135–24142. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2387-2>
- Zhou, L., Li, H., Zhang, Y., Han, S., & Xu, H. (2016). Sphingomonas from petroleum-contaminated soils in Shenfu, China and their PAHs degradation abilities. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.001>
- Zhou, Q., & Hua, T. (2004). Bioremediation: A review of applications and problems to be resolved. *Progress in Natural Science*, 14(11), 937–944. <https://doi.org/10.1080/10020070412331344601>
- Zitrides, T. (1978). Mutant Bacteria Overcome Growth Inhibition In Industrial Waste Facility. *Industrial Waste*, 24, 42–44.

TRABAJOS PUBLICADOS Y PRESENTACIONES

Los resultados presentados en esta tesis han dado lugar a los siguientes trabajos científicos:

– ***Publicaciones en revistas científicas***

Optimization of biomass production by autochthonous *Pseudomonas* sp. MT1A3 as strategy to apply bioremediation *in situ* in a chronically hydrocarbon-contaminated soil. Conde Molina D, Liporace F, Quevedo C. 3 Biotech., **12**:118. (2022).

Isolation of microorganisms from areas contaminated with hydrocarbons close to urbanized areas, for the application of bioremediation strategies. Liporace F, Conde Molina D, Quevedo C, Odobez S. Brazilian Journal of Development. v. 5, n. 6, p. 4660-4674, jun. 2019. ISSN 2525-8761.

Development of bioremediation strategies based on the improvement of biomass production from isolated strains in hydrocarbon contaminated soils and their application in bioremediation technologies. Conde Molina D., Liporace F., Quevedo C. Brazilian Journal of Development., v. 5, n. 7, p. 10708-10727, jul. 2019. ISSN. 2525-8761.

Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Liporace F, Conde Molina D, Quevedo C. Boletín 218 de la Asociación Argentina de Microbiología. Pag. 22:26. Noviembre 2017.

Estudio de cepa autóctona aislada de suelos contaminados con hidrocarburos para su utilización en tecnologías de biorremediación. Conde Molina D, Liporace F, Quevedo C. Boletín 219 de la Asociación Argentina de Microbiología. Pag. 23:26. Febrero 2018.

– ***Presentaciones en Congresos Científicos como autor***

Aislamientos de microorganismos a partir de áreas crónicamente contaminadas con hidrocarburos cercanas a zonas urbanizadas, para la aplicación de estrategias de biorremediación. Liporace F, Conde Molina D, Quevedo C, Odobez S. Sustentabilidad Urbana. 14° Jornada Urbenere e 2° Jornada Cires. Diciembre 2018. Victoria, Brasil. ISBN: 978- 989-20-8422-0

Optimización de bioprocesos integrados a partir de cepas aisladas de áreas crónicamente contaminadas con hidrocarburos para la obtención de biosurfactantes. Liporace F, Conde Molina D, Giuletti A, Quevedo C. Congreso de Ingeniería de Procesos y Productos 2016. Abril 2016. Rosario, Santa Fe, Argentina

Estimation of biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. growing on three different substrates. Liporace F, Conde Molina D, Vázquez S, Giuletti A, Quevedo C. Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular. Noviembre 2015. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Biocell 39 (Suppl. 2) 2015.

Biosurfactant production for bioremediation through bioaugmentation: a native strain culture optimization”. Liporace F, Conde Molina D, Giuletti A, Quevedo C. Ebc-vi. 6th European Bioremediation Conference. Julio 2015. Chania, Creta, Grecia.

“Isolation of microorganisms from a hydrocarbon-contaminated environment and its application in biosurfactant production”. Liporace F, Olivera J, Giuletti A, Quevedo C. 16th International Biotechnology Symposium and Exhibition. Septiembre 2014. Fortaleza, Brasil.

“Isolation of microorganisms for biosurfactant production”. Liporace F, Olivera J, Giuletti A, Quevedo C. 16th European Congress on Biotechnology. Julio 2014, Edimburgo, Escocia.

“Isolation of biosurfactant-producing microorganisms at the petrochemical area of Campana”. Liporace F, Martinez G, Quevedo C, Giuletti A. 48th Annual Meeting Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology. Noviembre 2012. Mendoza, Argentina. Biocell 36 (Suppl.) 2012, pag. 97.

– ***Presentaciones de poster a Congresos Científicos como co-autor***

Biodegradación de hidrocarburos por la acción de *Pseudomonas* sp. *MTIA3*, aislada de suelos crónicamente contaminados. Conde Molina D, Liporace F, Giuletti A, Quevedo C. XI Simposio Nacional de Biotecnología. Septiembre 2017. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

Bioremediation strategies based on a native strain isolated from sites contaminated with hydrocarbons. Conde Molina D, Liporace F, Vázquez S, Merini L, Giuletti A, Quevedo C. 52th Annual Meeting Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology. Noviembre 2016. Córdoba, Argentina. Biocell 40 (Suppl. 1) 2016, pag. 78.

Evaluation of a native strain isolated from chronically hydrocarbon-contaminated sites. Conde Molina D, Liporace F., Giullieti AM, Quevedo C. 5th International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering. ISBN-978-607-9023-45-4. Julio 2016. Universidad Nacional de General San Martín, Buenos Aires, Argentina.

Estudio de cepas autóctonas de áreas crónicamente contaminadas con hidrocarburos para su aplicación en biorremediación. Conde Molina D, Liporace F, Vázquez S, Quevedo C. III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Noviembre de 2015. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

ANEXO

CENTRO DE INVESTIGACIONES
TOXICOLÓGICAS S.A.



Buenos Aires, 17/07/2012

INFORME ANALITICO 166937

Solicitado por: DRA GIULIETTI ANA MARIA FFYB. UBA

Dirección: JUNIN 956 - CAPITAL

Tipo de muestra: SUELO

Identificación: .1 - Mt.2 - UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA NACIONAL

Fecha de recepción: 25/06/2012

Resultados

PARAMETROS	RESULTADO	UNIDAD	METODO ANALITICO	LIMITE DE CUANTIFICACION
Hidrocarburos Totales	9,5	%	EPA 9071	0,05 %
GRO	No Cuantificable		EPA 8015	1 mg/kg
DRO	No Cuantificable		EPA 8015	0,01 %

• Se observan abundantes Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos y Ácidos Grasos.

El análisis se refiere a la muestra remitida.

Este protocolo sólo puede ser reproducido íntegramente con la autorización escrita del CENTRO DE INVESTIGACIONES TOXICOLÓGICAS S.A.

Dr. Juan B. Alberdi
CIT
C/ JUNIN 956 - CAPITAL

Página 1 de 1

AV. JUAN B. ALBERDI 2086 - TEL. 4613-1100 / 4612-6912 - FAX 4913-3707 - e-mail: info@citba.com.ar
(C1496GSS) BUENOS AIRES - ARGENTINA

CENTRO DE INVESTIGACIONES
TOXICOLÓGICAS S.A.



Buenos Aires, 17/07/2012

INFORME ANALITICO 166938

Solicitado por: DRA GIULIETTI ANA MARIA

Dirección: JUNIN 956 - CAPITAL

Tipo de muestra: SUELO

Identificación: 2 - Co.2 - UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA NACIONAL

Fecha de recepción: 25/06/2012

Resultados

PARAMETROS	RESULTADO	UNIDAD	METODO ANALITICO	LIMITE DE CUANTIFICACION
Hidrocarburos Totales	No Cuantificable		EPA 9071	0,05 %
GRO	No Cuantificable		EPA 8015	1 mg/kg
DRO	No Cuantificable		EPA 8015	0,01 %

- Se observan abundantes Hidrocarburos Polaromáticos.

El análisis se refiere a la muestra remitida.

Este protocolo sólo puede ser reproducido íntegramente con la autorización escrita del CENTRO DE INVESTIGACIONES TOXICOLÓGICAS S.A.

Página 1 de 1

AV. JUAN B. ALBERDI 2986 - TEL. 4613-1100 / 4612-6912 - FAX 4613-3707 - e-mail: info@citas.com.ar
(C1486GSS) BUENOS AIRES - ARGENTINA