

Biodegradación de furfural empleando actinobacterias autóctonas

Furfural biodegradation by indigenous actinobacteria

Presentación: 4 y 5 de Octubre de 2022

Doctoranda:

Macarena Celeste Echeverría

Universidad Tecnológica Nacional – Facultad Regional Resistencia - Argentina
macarenacecheverria@gmail.com

Director/a:

Claudia S. Benimeli

Codirector:

Walter G. Morales

Resumen

Las aguas residuales derivadas de la producción de furfural pueden causar efectos tóxicos en los sistemas vivos si se liberan al medio ambiente sin un tratamiento adecuado. En el presente trabajo se estudió la remoción de diferentes concentraciones de furfural por actinobacterias en sistemas líquidos. Los resultados mostraron que el cultivo para el cual la relación entre la concentración de furfural residual y el crecimiento bacteriano fue mínima, corresponde al consorcio formado por las actinobacterias L9, A12 y M7. Para evaluar la efectividad del proceso de biorremediación se realizaron pruebas de ecotoxicidad. Se obtuvieron incrementos significativos en los bioindicadores ($p < 0,05$) cuando el tratamiento se realizó en consorcio. Los resultados obtenidos sugieren que el consorcio de actinobacterias seleccionado representa una herramienta de biorremediación prometedora para el tratamiento de efluentes que contienen furfural.

Palabras clave: Furfural, Biorremediación, Actinobacterias, Consorcio.

Abstract

Wastewaters derived from furfural production can cause toxic effects on living systems if they are released into the environment without proper treatment. In the present work, the removal of different concentrations of furfural by actinobacteria from liquid systems was studied. The results showed that the culture for which the relationship between the concentration of residual furfural and the bacterial growth was minimal, was the consortium formed by the actinobacteria L9, A12 and M7. In order to evaluate the effectiveness of the bioremediation process, ecotoxicity tests were carried out. Significant increases in the bioindicators ($p < 0.05$) were obtained when the treatment was carried out with consortium. The results obtained suggest that the selected actinobacteria consortium represents a promising bioremediation tool for the treatment of effluents containing furfural.

Keywords: Furfural, Actinobacteria, Bioremediation, Consortium.

Introducción

El furfural es un aldehído heterocíclico, producido en la región del Noreste Argentino (NEA) a partir de aserrín de quebracho detanzado. Este compuesto es utilizado como producto intermedio en la industria química para la fabricación de plásticos, disolventes de pinturas, resinas de furano, fungicidas, adhesivos y como solvente orgánico para la extracción y refinado en la industria del petróleo (Borghei and Hosseini, 2008: 482-488). A pesar de los beneficios económicos de la producción y exportación de furfural, este compuesto provoca efectos tóxicos en los sistemas vivos cuando es liberado de manera inadecuada al medio ambiente (Yan et al., 2011: 22-26).

La biorremediación es una herramienta que consiste en el uso de organismos vivos o parte de ellos, para degradar, remover y/o transformar contaminantes ambientales (Adams et al., 2015: 28-39), representando una estrategia biotecnológica económica y ecoamigable para el tratamiento de ambientes contaminados. Dentro de los organismos empleados en biorremediación, se destacan las actinobacterias, las cuales constituyen un grupo de bacterias Gram positivas y Gram variables, de gran versatilidad metabólica. Si bien estos microorganismos han recibido especial atención a nivel industrial por la producción de enzimas extracelulares y una amplia variedad de metabolitos secundarios de interés farmacológico (antibióticos, antivirales, antitumorales, entre otros), en los últimos años se ha demostrado su importante papel ecológico mediante su capacidad para eliminar compuestos xenobióticos tales como plaguicidas y metales pesados, entre otras sustancias (Alvarez et al., 2017: 41-62). Por estas razones, se espera que las actinobacterias sean agentes eficientes en la biorremediación de matrices contaminadas con furfural.

El presente trabajo tiene como objetivo aislar actinobacterias a partir de ambientes contaminados con furfural y seleccionarlas en base a su capacidad de tolerancia y remoción, puras o en consorcio, para su posible aplicación en tratamientos de efluentes industriales contaminados con furfural.

Desarrollo

El aislamiento de actinobacterias se llevó a cabo a partir de muestras de sedimentos obtenidos de las lagunas de estabilización de una planta productora de furfural en la región NEA. Para ello, se realizaron diluciones decimales sucesivas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} de los sedimentos secos y se sembraron las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} en cajas de Petri con medio Caseína Almidón Agar (CAA), suplementado con $10 \mu\text{g/ml}$ de nistatina y $10 \mu\text{g/ml}$ de cicloheximida con el objeto de inhibir el desarrollo de hongos y bacterias Gram negativas (Ravel et al., 1998: 177-184). La siembra se hizo por diseminación en superficie con espátula de Drigalsky, por triplicado. Las placas se incubaron a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 7 días.

Las colonias obtenidas se purificaron en medio Caseína Almidón Agar sin antibióticos, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 7 días, y se seleccionaron de acuerdo con su morfología, color y presencia de pigmentos difusibles según el Manual de Bergey (Lechevalier, 1989).

Para la determinación cualitativa de la tolerancia a furfural de los aislamientos obtenidos se siguió la técnica desarrollada por Amoroso et al. (1998) basada en la inhibición del crecimiento de microorganismos en un medio de cultivo sólido complejo. Las placas se incubaron a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 7 días y se estimó cualitativamente la tolerancia a furfural midiendo el crecimiento de los microorganismos a lo largo de la línea de siembra.

Con el objeto de evaluar la presencia de antagonismo entre las actinobacterias en estudio, se utilizó una modificación de la técnica de Bell et al. (1980); se prepararon cajas de Petri con CAA donde una de las actinobacterias se sembró en el centro de la caja de Petri y se enfrentó transversalmente con los otros microorganismos a ensayar, realizando todas las combinaciones posibles.

Los aislamientos seleccionados fueron utilizados para evaluar su crecimiento en Medio Mínimo (MM) suplementado con furfural (400 y 800 ppm) como única fuente de carbono y energía. Se inoculó una suspensión celular de cada actinobacteria (2 mg/ml) y se incubaron a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, con agitación (200 rpm), durante 96 h. El crecimiento microbiano se determinó por peso seco. La concentración de furfural inicial y residual en los sobrenadantes de los cultivos se determinó por cromatografía líquida de alta

eficacia (HPLC) con un detector UV SPD 20A. Se incluyeron los controles bióticos y abióticos apropiados. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Para evaluar la efectividad del proceso de biorremoción, se llevaron a cabo ensayos de ecotoxicidad empleando especies vegetales. Los ensayos se realizaron empleando semillas de *Raphanus sativus* (rábano). Los biomarcadores evaluados fueron: germinación (%) y longitud de hipocótilos y radículas (cm). Se sembraron 30 semillas en placas de Petri con papel de filtro humedecido con 3 ml de las muestras procedentes de cada tratamiento. Las placas se incubaron en oscuridad, a 25 °C durante 120h (Fuentes et al., 2013). Posteriormente se registró el número de semillas germinadas en cada placa de Petri, y se midió la longitud de hipocótilos y de radículas de las plántulas, empleando una regla con escala milimétrica.

Resultados

A partir de las muestras de sedimentos, se aislaron, de forma preliminar 17 colonias que presentaron características macroscópicas coincidentes al grupo de las actinobacterias (aspecto rugoso, dureza similar al cuero, olor a tierra húmeda, formación de micelio aéreo con presencia de esporos y producción de pigmentos difusibles). Observaciones microscópicas mostraron que seis de estos aislamientos, denominados L1, L4, L6, L9 y L13, contaban con estructura filamentosa coincidente con la del género *Streptomyces*.

Los resultados obtenidos del análisis cualitativo de tolerancia a furfural mostraron abundante crecimiento para los aislamientos L4, L9 y L12, en las concentraciones ensayadas (Figura 1a). El análisis de tolerancia para las actinobacterias *Streptomyces* sp. A2, A5, A6, A12, A14 y M7, demostró abundante crecimiento para *Streptomyces* sp. A12 y M7 (Figura 1b), indicando una alta tolerancia por parte de estos microorganismos a las concentraciones ensayadas de furfural.

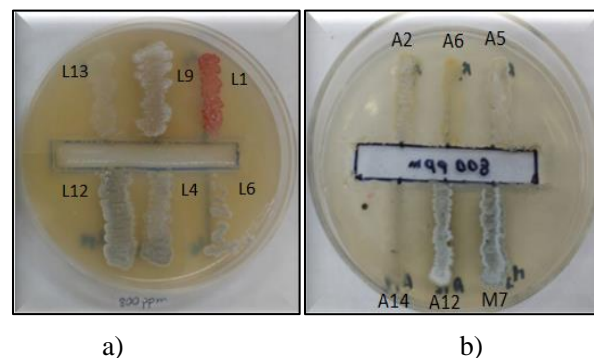


Figura 1: Estudio cualitativo de tolerancia en medio sólido, con 800mg/l de furfural a) aislamientos L1, L4, L6, L9, L12 y L13 b) *Streptomyces* sp. A2, A5, A6, A12, A14 y M7

Al analizar la concentración de furfural en el efluente proveniente del residuo líquido de cola de la columna de destilación de una planta productora de la región, se detectó que la misma era de 790,91 mg/l. En base a esto, se empleó una concentración de furfural correspondiente a aproximadamente la mitad de la observada en los efluentes (418 ± 1 mg/l), a fin de realizar una primera selección de las actinobacterias más eficientes para crecer y remover furfural en medio líquido.

El análisis de crecimiento de las actinobacterias en presencia de furfural demostró que los microorganismos A12 y L9 presentaron los mayores porcentajes, con un aumento de la biomasa de 181% y 118% respectivamente, seguidos de L6 y M7, con un aumento de la biomasa de 106% y 82% respectivamente, a las 96h de incubación. (Figura 2a).

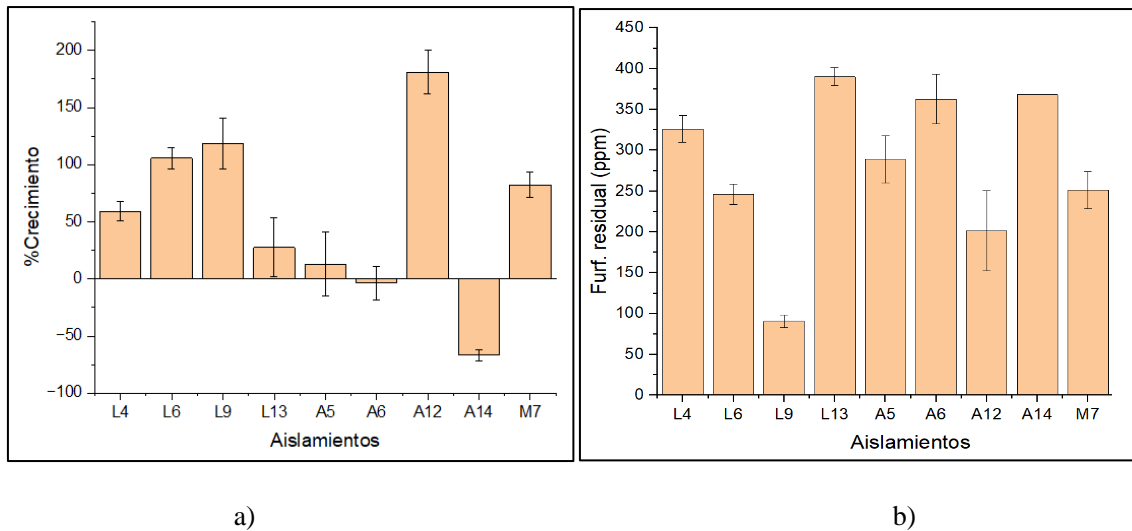


Figura 2: a) Porcentaje de crecimiento bacteriano en MM suplementado con 418 ± 1 mg/L de furfural como única fuente de carbono y energía a las de 96h de incubación b) Concentración de furfural residual en los cultivos bacterianos a las de 96h de incubación

Se evaluó la capacidad de las actinobacterias para remover furfural a partir del medio de cultivo y se encontró que todas presentaron dicha capacidad, observándose concentraciones de furfural residual comprendidas entre 90 y 391 ppm. Cabe destacar que las mínimas concentraciones de furfural residual se detectaron en los sobrenadantes de los cultivos de L9, A12, L6 y M7 (Figura 2b). No se observó disminución en la concentración de furfural en el control abiótico.

Como criterio para seleccionar las actinobacterias más eficientes se determinó la relación entre la concentración de furfural residual y el crecimiento bacteriano. Se eligieron los microorganismos para los cuales esta relación fue mínima, ya que la misma se obtenía frente a concentraciones de furfural residual bajas o bien frente a elevada producción de biomasa. Al aplicar dicho criterio, se observó que los cultivos para los cuales esta relación fue mínima corresponden a las actinobacterias L9, A12, L6 y M7. Estos microorganismos fueron seleccionados para estudios posteriores por considerarse los más eficientes con respecto a su crecimiento y capacidad de remoción de furfural.

A fin de evaluar la capacidad de crecimiento y remoción del contaminante en una concentración análoga a la del efluente real, se trabajó con MM suplementado con una concentración inicial promedio de furfural de 807 ± 10 mg/l.

Además, mediante ensayos en medio CAA, se descartó la presencia de reacciones antagónicas entre las actinobacterias L9, A12 y M7, a fin de evaluar tales microorganismos en cultivos puros y mixtos.

Al evaluar la relación entre la concentración de furfural residual y el crecimiento bacteriano, se observó que la misma fue mínima para el consorcio formado por las actinobacterias L9, A12 y M7. Por ello, se seleccionó a este consorcio microbiano para estudios posteriores.

Se realizaron ensayos de ecotoxicidad en los sobrenadantes de los tratamientos con cultivos de las actinobacterias en MM contaminados con furfural. En los mismos se encontraron aumentos significativos en los bioindicadores analizados (% de germinación, longitud de radículas e hipocótilos) ($p < 0,05$) en los sobrenadantes procedentes del cultivo mixto L9-A12-M7 y de los cultivos puros de *Streptomyces* sp. A12 y M7, en relación con los bioindicadores obtenidos en los sobrenadantes sin inocular.

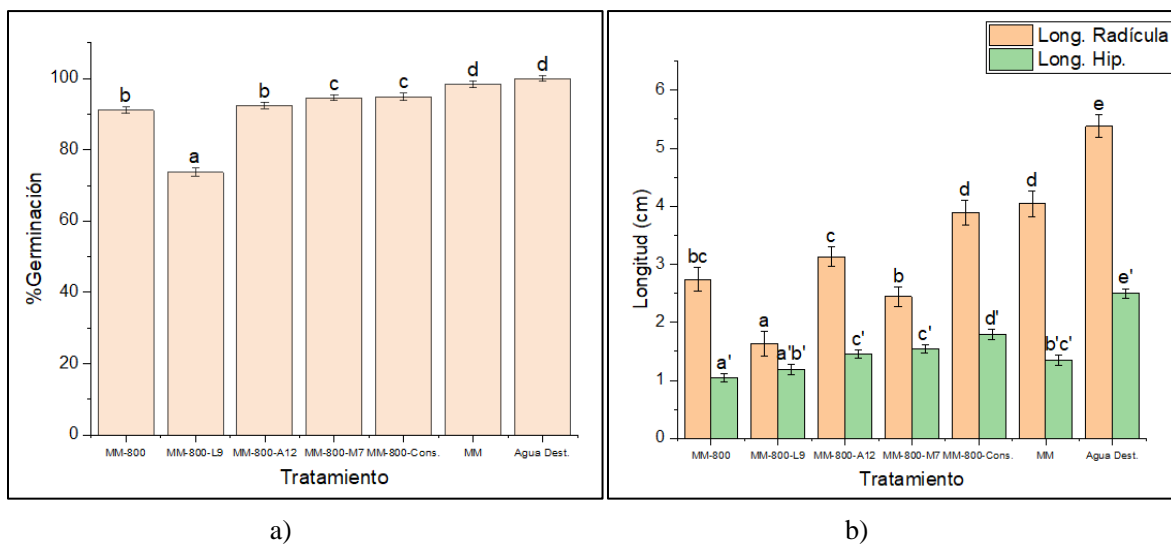


Figura 3: a) Porcentaje de germinación de *R. sativus* b) Longitud de hipocótilos y radículas de *R. sativus*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos y sus respectivos controles ($p < 0,05$)

Conclusiones

A partir de sitios contaminados con furfural, se aislaron seis microorganismos con características macro y microscópicas correspondientes a las actinobacterias. Los seis aislamientos presentaron tolerancia a furfural en medio sólido. Seis cepas de *Streptomyces* sp., aisladas a partir de suelos y sedimentos altamente contaminados de las provincias de Tucumán y Santiago del Estero, presentaron tolerancia a furfural en medio sólido. De las actinobacterias evaluadas en los ensayos en MM suplementado con 418 ± 1 mg/l de furfural, se seleccionó el aislamiento L9 y las cepas *Streptomyces* sp. A12 y M7, por presentar el mínimo valor de la relación furfural residual/% de crecimiento. Los aislamientos y cepas seleccionadas fueron utilizadas puras y en cultivo mixto en ensayos posteriores a mayores concentraciones de furfural (807 ± 10 mg/l). El cultivo mixto, formado por las actinobacterias L9, A12 y M7, fue el más eficiente con respecto a su crecimiento y capacidad de remoción de furfural por presentar la mínima relación entre la concentración de furfural residual y el crecimiento bacteriano, bajo estas condiciones. Los ensayos de ecotoxicidad muestran un aumento significativo ($p < 0,05$) en los bioindicadores para los tratamientos con cultivos puros de *Streptomyces* sp. A12 y M7, y cultivo mixto L9-A12-M7, respecto al sistema líquido sin tratar con las actinobacterias, indicando de este modo, que los efectos tóxicos causados por el furfural fueron revertidos por el tratamiento de biorremediación utilizando estos microorganismos.

Los resultados obtenidos sugieren que las actinobacterias estudiadas, en cultivos puros o mixtos, representan una herramienta de biorremediación prometedora para el tratamiento de efluentes contaminados con furfural.

Referencias

- Adams, GO, Fufeyin, PT, Okoro, SE y Ehinomen, I. (2015). "Biorremediación, bioestimulación y bioaumento: una revisión". Revista internacional de biorremediación ambiental y biodegradación, 3 (1), 28-39.
- Alvarez, A., Saez, JM, Costa, JSD, Colin, VL, Fuentes, MS, Cuozzo, SA, ... & Amoroso, MJ (2017). "Actinobacteria: investigación actual y perspectivas para la biorremediación de pesticidas y metales pesados". Chemosphere, 166, 41-62.

- Amoroso, M. J., Castro, G., Carlino, F., Romero, N. C., Hill, R., & Oliver, G. (1998). "Screening of actinomycetes isolated from Salí river tolerant to heavy metal". *J. Gen. Appl. Microbiol*, 44, 29-32.
- Bell, DK, Wells, HD y Markham, CR (1982). "Antagonismo in vitro de especies de *Trichoderma* contra seis patógenos fúngicos de plantas". *Fitopatología*, 72 (4), 379-382.
- Borghei, SM y Hosseini, SN (2008). "Comparación de la degradación de furfural por diferentes métodos de fotooxidación". *Revista de ingeniería química*, 139 (3), 482-488.
- Fuentes, MS, Briceño, GE, Saez, JM, Benimeli, CS, Diez, MC, & Amoroso, MJ (2013). "Eliminación mejorada de una mezcla de plaguicidas por cultivos individuales y consorcios de cepas de *Streptomyces* libres e inmovilizadas". *Investigación BioMed Internacional*, 2013 .
- Lechevalier, H. A. (1989). "A practical guide to generic identification of actinomycetes". *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 4, 2344-2347.
- Ravel, J., Amoroso, MJ, Colwell, RR y Hill, RT (1998). "Actinomicetos resistentes al mercurio de la bahía de Chesapeake". *Cartas de microbiología FEMS*, 162 (1), 177-184.
- Yan, BH, Yang, HJ, Wei, JH y Luo, L. (2011). "Aislamiento de aguas residuales de curtiduría y caracterización de cepas bacterianas involucradas en la degradación de surfactantes no iónicos". En *Investigación de Materiales Avanzados* (Vol. 183, pp. 22-26). Publicaciones Trans Tech Ltd.