

[UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA NACIONAL]



[FACULTAD REGIONAL DELTA]

***Aislamiento de Microorganismos a Partir
de Sitios Crónicamente Contaminados
para la Producción de Biosurfactantes***

Ing. Franco Andrés Liporace

*Tesis para optar por el título de Magister en Procesos
Biotecnológicos*

Directora: Dra. Carla Verónica Quevedo

Campana, Abril 2018

Agradecimientos	4
Resumen	5
1.-Introducción.....	7
1.1.- Problemática Ambiental Petrolera.....	8
1.1.1.- El Petroleo Como Fuente de Energía	8
1.1.2.- Fuentes de Energía Alternativas	9
1.1.3.- ¿Por Qué Las Fuentes De Energía No Renovables, Petroleo En Particular, Se Encuentran Tan Ampliamente Difundidas y Utilizadas?	10
1.1.4.- Inconvenientes Surgidos A Partir De La Utilización De Petroleo Y Sus Derivados Como Fuente De Energía	11
1.2.- Remediación De Suelos Contaminados Con Petróleo Y Sus Derivados.....	13
1.2.1.- Estrategias De Remediación.....	13
1.2.2.- Remediación In-Situ Y Ex-Situ	14
1.2.3.- Tipo De Tratamiento	14
1.3.- Procesos De Biorremediación	16
1.3.1.- Tipos De Biorremediación	16
1.3.1.1.- Bioaugmentaci�n	17
1.3.1.2.- Bioestimulación	18
1.4.- Biosurfactantes	18
1.4.1.- Características Y Aplicaciones De Los Biosurfactantes.....	18
1.4.2.- Estructura, Modo De Acción Y Clasificación De Los Biosurfactantes	19
1.4.2.1.- Biosurfactantes De Bajo Peso Molecular	20
1.4.2.2.- Biosurfactantes De Alto Peso Molecular	23
1.5.- Hidrocarburos Presentes En El Suelo De La Destilería. Degradación De Hidrocarburos	24
1.5.1.- Hidrocarburos Poliaromáticos	25
1.5.2.- Microorganismos Degradadores De HPA.....	26
1.5.3.- Biodegradación De HPA-Factores Que Afectan Al Proceso.....	30
1.5.3.1.- Temperatura	30
1.5.3.2.- pH.....	31
1.5.3.- Nutrientes	31
1.5.3.4.- Biodisponibilidad	32
1.5.3.5.- Oxígeno.....	32
1.6.- Problemática Regional	33
2.- Objetivos	36
2.1.- Objetivo General	37
2.2.- Objetivos Específicos	37
3.- Materiales Y Métodos.....	38
3.1.- �rea De Estudio	39
3.1.1.- Características Generales Del Suelo De La Región Y Toma De Muestras	39
3.1.1.1.- Tipo De Suelo	39
3.1.1.2.- Toma De Muestra Y Almacenamiento	39
3.1.1.3.- Análisis Fisioc�micos De Las Muestras.....	41
3.2.- Medios De Cultivo.....	42
3.3.- Aislamiento Y Selección De Los Microorganismos	42
3.3.1.- Aislamiento De Los Microorganismos.....	42
3.3.2.- Selección De Los Microorganismos Potencialmente Productores De Biosurfactantes	43
3.3.3.- Mantenimiento De Las Cepas Aisladas-Criopreservación	43
3.4.- Producción De Biosurfactantes	44
3.4.1.- Estimación De La Producción De Biomasa	44
3.4.1.1.- Densidad �ptica.....	44
3.4.1.2.- Peso Seco	44
3.4.2.- Estimación De La Producción De Biosurfactantes.....	44
3.4.2.1.- Medición De La Tensión Superficial	44
3.4.2.2.- Ensayo De Distorsión �ptica En Policubeta (MPA)	45

3.4.2.3.- Capacidad Emulsificadora (E24).....	45
3.4.2.4.- Técnica De Hemólisis	45
3.4.2.5.- Precipitación Ácida En Dos Etapas	45
3.5.- Identificación De Los Microorganismos	45
3.5.1.- Tinción De Gram	46
3.5.2.- Pruebas Bioquímicas Para Identificación De Microorganismos	46
3.5.3.- Identificación Molecular De Los Microorganismos	46
3.5.4.- Ensayo De Susceptibilidad Bacteriana A Diferentes Antibióticos	46
3.6.- Cultivo Para La Producción De Biomasa Y Biosurfactantes	47
3.6.1.- Cultivo De Los Microorganismos En Presencia De Hidrocarburos	47
3.6.2.- Optimización Del Medio De Cultivo De La Cepa Seleccionada Para La Producción De Biomasa Y de Biosurfactantes	48
3.6.2.1.- Ensayos En Erlenmeyers	48
3.6.2.2.- Ensayos En Biorreactor	48
3.6.3.- Utilización De Diferentes Fuentes De Carbono	49
3.6.4.- Purificación Del Biosurfactante.....	50
3.7.- Análisis Estadístico	50
4.- Resultados Y Discusión.....	51
4.1.- Análisis De Las Muestras.....	52
4.2.- Aislamiento Y Selección De Los Microorganismos	52
4.3.- Identificación De Los Microorganismos	55
4.3.1.- Tinción De Gram	55
4.3.2.- Ensayos Bioquímicos (API)	56
4.3.3.- Identificación Genética	58
4.4.- Selección De Microorganismos Potencialmente Productores De Biosurfactantes	59
4.5.- Resistencia A Antibióticos	60
4.6.- Estimación De La Producción De Biosurfactantes En Diferentes Condiciones De Cultivo.....	61
4.7.- Ensayo En Biorreactor	64
4.8.- Utilización De Glucosa Y Glicerol Para Evaluar La Producción De Biosurfactantes	67
4.9.- Separación Y Purificación Del Biosurfactante	71
5.- Conclusiones	74
6.- Bibliografía	77
7.- Anexo	90

AGRADECIMIENTOS

A Carla y la Dra. Giuliatti, por su gran ayuda y colaboración en cada momento de consulta y soporte en este trabajo de investigación.

A las autoridades de la FRD, por su apoyo constante y por brindarme la posibilidad de llevar a cabo este trabajo de investigación.

A mis compañeros de laboratorio, por su ayuda constante y desinteresada.

A mi familia, porque gracias a ellos soy quien soy y pude lograr todo lo que conseguí en mi vida. Gracias por su apoyo y aliento constante.

A mis amigos, por bancarme y aconsejarme siempre.

Por último, a mi hijo Vicente, que es lo más importante que tengo en la vida y la persona por la que mi mundo gira.

El petróleo es la fuente de energía más difundida, utilizada y de bajo costo en el planeta. Sólo en 2014, del total de la energía consumida mundialmente, más del 30% surgió de éste. Su composición y propiedades hacen que, aparte de utilizarse como fuente de energía, pueda ser utilizado en la síntesis y desarrollo de cientos de bienes de consumo global. Desde su descubrimiento en las últimas décadas del siglo XIX hasta la fecha, múltiples aplicaciones y usos han sido descubiertos y explotados. Entre estos, sólo algunos ejemplos son: utilización del petróleo para la industria del plástico, de los solventes y pinturas, lubricantes, detergentes, entre otras.

Más allá de esto, existe un gran inconveniente relacionado con la utilización del petróleo, esto es la contaminación ambiental que se produce a partir de las actividades de extracción, almacenamiento, transporte, refinamiento, procesado y utilización como fuente de energía. Todas estas actividades afectan negativamente el medio ambiente en el que se desarrollan y el medio ambiente global. Filtraciones o derrames, sean accidentales o intencionales, gases de efecto invernadero producto de la combustión, etc., afectan al ecosistema y producen cambios que son muy difíciles de reparar. Con el objetivo de reducir el impacto negativo de estas situaciones, se han desarrollado e implementado diversas técnicas, tanto físicas como químicas y biológicas. Al conjunto de estas técnicas de recuperación de sitios contaminados se los denomina procesos de remediación, en el presente trabajo se hace referencia particular a los procesos de biorremediación, es decir, aquellos procesos de remediación que implican la utilización de microorganismos o parte de estos para llevar a cabo la recuperación del sitio contaminado. Hay diversas técnicas para llevar a cabo este tipo de procesos, una de ellas involucra la utilización de compuestos tensioactivos producidos por los microorganismos para estimular la degradación de hidrocarburos en sitios crónicamente contaminados. En este trabajo se presenta un estudio sobre la producción de biosurfactantes a escala laboratorio a partir de microorganismos aislados de la zona de Campana, Provincia de Buenos Aires.

De muestras obtenidas en el predio de una destilería en la ciudad de Campana aislaron trece colonias de microorganismos, las que fueron capaces de crecer en presencia de hidrocarburos como única fuente de carbono. De ellas, seis presentaron capacidad tensioactiva, por lo que se procedió a la identificación de las mismas. Las colonias aisladas pertenecen a los géneros *Pseudomonas* y *Cellulosimicrobium* respectivamente. De estas, se seleccionó a *Pseudomonas koreensis* su potencial como productora de biosurfactantes.

Con esta cepa se llevaron a cabo diversos ensayos destinados a estimar la capacidad de producción de biosurfactantes. Se evaluaron diferentes condiciones de cultivo en Erlenmeyers y biorreactor (con una capacidad de 3 litros) teniendo en cuenta como parámetros la

temperatura y concentración de sustrato. Cuando se utilizó un medio de cultivo mínimo suplementado con una mezcla de 3 hidrocarburos (Kerosene, diésel y nafta) como única fuente de carbono, se observó crecimiento microbiano y la mayor actividad tensioactiva únicamente cuando se cultivó en Erlenmeyer a 25C° y 6%v/v de HC.

Asimismo, se evaluaron glucosa y glicerol como fuentes de carbono, observándose una disminución de la capacidad tensioactiva, alcanzando valores de 25,10mN/m y 27,84mN/m, respectivamente. Cuando se efectuó la transferencia de la biomasa crecida con los sustratos previamente ensayados en medio de cultivo suplementado con la mezcla de hidrocarburos ya mencionada, no se observó una disminución de la tensión superficial.

En base a lo mencionado y a una decisión basada en minimización de costos (co-producto de la producción de biodiesel), se seleccionó glicerol como fuente de carbono para evaluar la capacidad de producción de biotensioactivos por parte del agente biológico seleccionado. Se observó crecimiento y una disminución de la actividad superficial en un 60%. En estas condiciones se separó el biosurfactante producido a partir de una precipitación en medio ácido, y se determinó su concentración micelar crítica (CMC).

Debido a los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la disponibilidad del glicerol, constituye una excelente alternativa para llevar a cabo procesos de producción de biosurfactantes.

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*¹.

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 la mayoría de las actividades económicas mundiales, y por lo tanto, en nuestro país², las utilizan. Actualmente, dentro de la categoría de fuentes de energía 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. Por citar un ejemplo, en 2014 se consumieron, en promedio, en el mundo 4211,1 millones de toneladas de petróleo, 3065,5 millones de toneladas de petróleo equivalente de gas y 3881,8 millones de toneladas de petróleo equivalente de carbón, esto corresponde a más del 80% de la energía consumida en el mundo en dicho año (*Figura 1*).

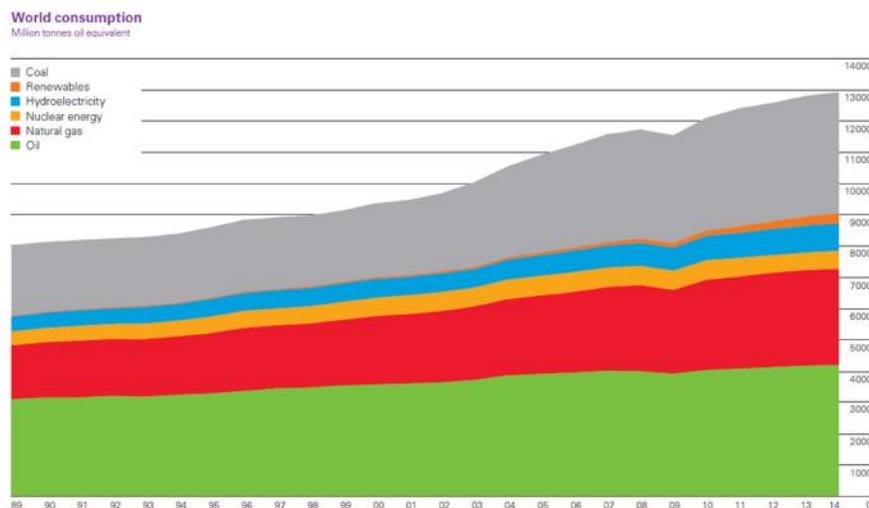


Figura 1: Consumo mundial de energía en millones de toneladas de petróleo equivalente, desde 1990 hasta 2014³.

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 75% del total (*Figura 2*).

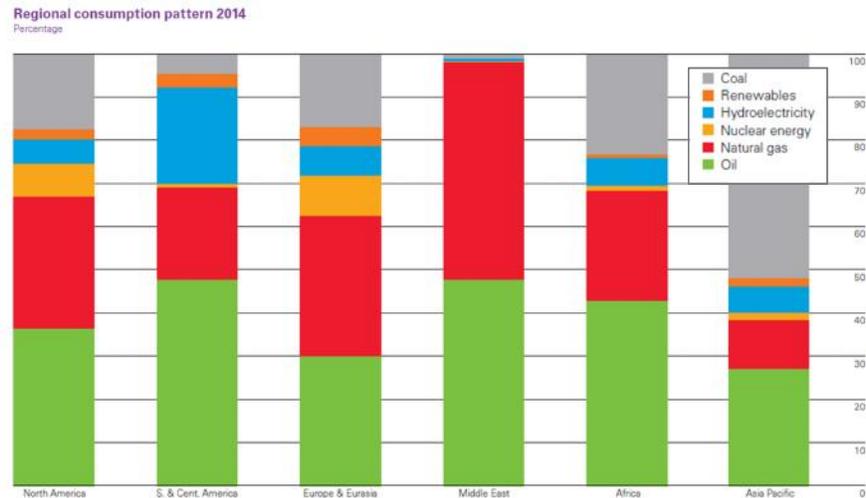


Figura 2: Patrón de consumo de energía regional para el año 2014³.

1.1.2.- Fuentes de energía alternativas

En contraposición a las antes mencionadas, 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 todos aquellos derivados de combustibles fósiles, productos de desecho de fuentes fósiles ni inorgánicas*⁴. 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 HP) para moler granos, curtir, lavar, etc. y la navegación a vela. De las fuentes de energía consideradas previamente, las más utilizadas en la actualidad son la hidroeléctrica, eólica y solar⁵.

A pesar de los grandes avances en cuanto a los métodos de producción y a la optimización de los ya existentes, la energía a partir de fuentes renovables (incluyendo a los biocombustibles) continúa produciéndose (y, por lo tanto, consumiéndose) en pequeña escala frente a valores correspondientes a las convencionales⁶. Por ejemplo, durante el año 2014 se consumieron 316,9 millones de toneladas de petróleo equivalente de energía a partir de fuentes renovables, frente a los 99360,8 millones de toneladas consumidas a partir de fuentes convencionales (petróleo, gas y carbón)³. Una de las razones por las que no se produce energía

de fuentes renovables a mayor escala es el alto coste 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. Pero la razón más importante, 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.

1.1.3.- ¿Por qué las fuentes de energía no renovables, petróleo en particular, se encuentran tan ampliamente difundidas y utilizadas?

Se cree que la respuesta a esta pregunta radica en tres pilares fundamentales: Disponibilidad, Costo y Transporte.

Con respecto a la disponibilidad, en la actualidad hay una 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 planeta⁷. En la mayoría de los lugares en que se encuentra disponible, además, posee una gran accesibilidad, es decir, se puede acceder a él de forma relativamente sencilla. Debido a los yacimientos existentes y a que se cree que hay grandes yacimientos 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 33,7% de la producción mundial de petróleo en febrero de 2016⁴.

En cuanto a los costos de producción y venta, resulta hoy en día una fuente de energía muy económica, si se tiene en cuenta que desde junio de 2014 a enero de 2016 el precio del barril de petróleo cayó desde unos 107 U\$D/b hasta 28 U\$D/b⁹. Si bien el costo de producción de energía por vías alternativas como la eólica y fotovoltaica se encuentra cercano a estos valores¹⁰ (el barril debería costar unos 14,6 U\$D o 38 U\$D para competir con los precios de energía generada en Europa por las vías antes mencionadas respectivamente¹¹), 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 de la gran cantidad de derivados existentes hoy en día.

Por último, debido a que es un material fluido, el transporte del petróleo se puede llevar a cabo de diversas formas. Puede transportarse 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, en un país limítrofe o, en algunos casos, en el mismo continente.

Estos tipos de transporte hacen que los costos de logística disminuyan al mínimo además de que conllevan una operación que es relativamente sencilla.

Sumado a esto, se debe tener en cuenta que la utilización del petróleo para la obtención de una amplia variedad de derivados incrementa la demanda del mismo. Hoy en día, casi todos los productos con los que nos encontramos en nuestra vida diaria se obtienen completamente o en parte a partir del petróleo¹². Ejemplos de estos son los aceites y lubricantes, ampliamente utilizados en motores y diversos tipos de maquinaria; detergentes, uno de ellos es el sulfonato de alquilbenceno lineal es un derivado del kerosene ampliamente utilizado en detergentes domésticos; asfalto, es un sólido o semisólido obtenido de la fracción más pesada de la destilación del petróleo y se utiliza para rutas y calles, y para impermeabilizar techos y estructuras, entre otros usos; derivados para la industria textil, para suplantar la lana y fibras de algodón; caucho sintético, creado a partir de la polimerización de diversos monómeros y utilizado en reemplazo del caucho natural; plásticos, utilizados en embalajes de diversos productos, en autopartes, en la industria de la construcción como aislantes y cañerías, en juguetes, en medicina, etc.; colorantes, desarrollados para reemplazar los colorantes naturales, se utilizan en la industria textil y cosmética; 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.

1.1.4.- Inconvenientes surgidos a partir de la utilización de petróleo y sus derivados como fuente de energía

Si bien el petróleo ha contribuido al desarrollo socio-económico de gran cantidad de países y culturas, posee una desventaja que desde el punto de vista medioambiental resulta de gran importancia. Esta es la contaminación producida por las actividades relacionadas con la extracción, almacenamiento, procesamiento y, principalmente, actividades de transporte a granel¹³. La contaminación ambiental con petróleo y sus derivados se produce principalmente debido a filtraciones en tanques de almacenamiento y a derrames accidentales o intencionales, que hacen que el petróleo y/o sus derivados entren en contacto con suelos y cuerpos de agua. 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. Según datos de Greenpeace, se estima que unos 3800 millones de litros son derramados por año en los

océanos debido a actividades humanas¹⁴. Cuando una situación de estas se produce, se afecta de diversas formas al ecosistema acuático¹⁵, por un lado, las manchas de petróleo disminuyen o imposibilitan el desarrollo de la fotosíntesis por bloqueo de la luz. Esto hace que se reduzca el aporte de oxígeno al ecosistema y provoca la disminución de la cantidad de plantas acuáticas, por lo que los microorganismos y larvas de peces que utilizan estos sitios para alimentarse y resguardarse quedan expuestos a predadores. Sumado a esto, se produce la muerte de gran cantidad de peces y aves por envenenamiento a partir de la ingesta o absorción de los contaminantes con los que se encuentran en contacto, muerte debida a que se encuentran impregnados de hidrocarburos y esto imposibilita el movimiento libre o, en aves mayormente, muerte debida a hipotermia ya que el petróleo impregnado les impide una buena aislación térmica, entre otros inconvenientes.

En cuanto a ecosistemas terrestres, la extensión de la contaminación por hidrocarburos depende en gran medida de las características del suelo, como su composición y textura. Por ejemplo, los suelos arenosos permiten la penetración y dispersión de los contaminantes, por lo que, gran cantidad de estos puede alcanzar la napa freática. 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 permanecen por un largo periodo 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; alteración del hábitat con la consecuente muerte indirecta de diversas especies; ingesta de sustancias tóxicas presentes en el agua de cauces naturales; entre otras.

Por último, la quema de derivados del petróleo para la obtención de energía y calefacción produce un fenómeno conocido como calentamiento global¹⁶. Este tema se encuentra en el centro de la escena mundial desde hace unos 35 años y fue la principal razón por la que se llevaron a cabo diversos tratados internacionales para la preservación del medio ambiente (Protocolo de Kioto¹⁷, Protocolo de Montreal, entre otros). El fenómeno del calentamiento global se produce debido al aumento de la concentración de gases de efecto invernadero en la atmósfera (CO₂, H₂O, CH₄, NO_x, SO_x, entre otros), lo que hace que parte de la energía radiada por la Tierra, que antes atravesaba la atmosfera, 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). En este se estipula un compromiso 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.- Remediación de sitios contaminados con petróleo y sus derivados

Junto con el descubrimiento del petróleo y posterior desarrollo y perfeccionamiento de las diversas técnicas para su extracción y refinación, comenzó también un proceso de contaminación crónica del medio ambiente. Como consecuencia de esto, suelos y cuerpos de agua superficiales y subterráneos se han visto afectados severamente. Este fenómeno se observa principalmente en las zonas donde se produce la extracción, procesamiento y destilación del petróleo crudo y en las vías a través de las que se transporta dicha sustancia. Como ejemplos de esto puede mencionarse algunos de los incidentes más graves en relación a este tema, tales como el sucedido en la plataforma *Deepwater Horizon*¹⁸ en el golfo de México en abril de 2010 a causa de material defectuoso y negligencia por parte de los operadores, y el derrame del buque petrolero *Exxon Valdez*¹⁹ en Alaska en marzo de 1989.

Diversas estrategias, cuyo principal objetivo es el de mitigar los efectos producidos en el medioambiente por situaciones como las mencionadas en el párrafo anterior, han sido diseñadas. Estas se conocen bajo el nombre de remediación²⁰ y pueden ser clasificadas de acuerdo a tres criterios²¹. Estos son: estrategia de remediación, lugar en el que se realiza el proceso y tipo de tratamiento. A continuación se realiza una descripción de los mismos²².

1.2.1.- Estrategias de remediación

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

- *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 un método químico, térmico o biológico, in situ o ex situ.
- *Separación o extracción de los contaminantes del sitio contaminado:* se lleva a cabo aprovechando las propiedades del contaminante. Algunas de las tecnologías para llevar a cabo esto son desorción térmica, extracción con solventes, lavado del suelo o extracción con vapor, en el caso de suelos contaminados, y separación de fases, intercambio iónico, inyección de aire o adsorción con carbón para cuerpos de agua.

- *Aislamiento o inmovilización de los contaminantes*: las técnicas para lograr la inmovilización son contención, estabilización o solidificación, y, generalmente requieren de mantenimiento.

Como se mencionó previamente, al momento de decidir la estrategia de remediación a llevar a cabo en un sitio particular, se utiliza una combinación de las técnicas descritas^{23,24}. Muy difícilmente una sola de ellas pueda llevar a cabo el proceso de recuperación del sitio contaminado por sí misma.

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

De acuerdo al lugar donde tiene lugar el proceso de degradación del contaminante, las tecnologías de remediación pueden clasificarse en:

- *In-situ*: son aquellos procesos en los que la destrucción o reducción de la concentración del contaminante se llevan a cabo en el sitio donde se encuentra la contaminación. Este tipo de procesos tiene ventajas y desventajas. Entre las primeras, se evita el transporte del material contaminado con la consecuente reducción potencial en los costos. Por otro lado, este tipo de procesos son difíciles de monitorear, no se puede asegurar la homogeneidad del proceso de remediación y, generalmente, se desarrollan durante un gran período de tiempo²⁵.
- *Ex-situ*: son aquellos procesos en los que se lleva a cabo la excavación o remoción del material a remediar, previo a este proceso. La remediación *ex-situ* tiene como ventajas que requieren menores tiempos de proceso (respecto de procesos *in-situ*) para alcanzar una concentración de contaminante determinada. Además, debido a que se retira la muestra a tratar de la zona contaminada, se logra homogeneizar el 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*²⁵. Por el contrario, 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, esta tecnología resulta significativamente más costosa que la anterior.

1.2.3.- Tipo de tratamiento

Este criterio se basa en el principio utilizado para el proceso de remediación. Según este criterio, se pueden tener tres tipos de tratamiento:

- *Tratamientos físicoquímicos*: estos involucran el uso de agentes químicos y/o procesos físicos para la remoción, destrucción o disminución de la concentración del contaminante²⁶. Estos tratamientos son, generalmente, de bajo costo y pueden llevarse a cabo en cortos periodos de tiempo. Por otro lado, los residuos generados a partir del proceso deben disponerse de acuerdo a la clasificación correspondiente. Además, si se utiliza algún solvente para extraer el contaminante, se corre el riesgo de aumentar la movilidad del mismo.
- *Tratamientos térmicos*: son aquellos que implican la utilización de calor para destruir, degradar o inactivar las sustancias contaminantes²⁷. Como regla general, este tipo de tratamientos son costosos.
- *Tratamientos biológicos*: estos tratamientos implican la utilización de un agente biológico (generalmente bacterias, hongos o plantas) para degradar, remover o transformar los contaminantes en sustancias inocuas. Estos tratamientos son ampliamente conocidos como *biorremediación*²⁸. Los procesos de biorremediación tienen como principal ventaja (frente a otros tipos de remediación) que son amigables con el medio ambiente, por lo que raramente se requiere de tratamientos posteriores. Sumado a esto, generalmente se logra la destrucción total del contaminante y los costos de proceso son bajos. A pesar de lo mencionado, debe tenerse en cuenta la toxicidad de los intermediarios de reacción, que el tiempo de proceso suele ser largo y que no pueden utilizarse cuando el suelo o cuerpo de agua contaminado no favorezca el crecimiento biótico.

La biorremediación es una tecnología que utiliza las capacidades metabólicas de los microorganismos principalmente para lograr la degradación de sustancias contaminantes en compuestos menos nocivos para el medio ambiente. Esta tecnología posee ciertas ventajas respecto de otros procesos de remediación, ya que involucran la degradación de los contaminantes a sustancias menos contaminantes o inocuas, en lugar de transferir los contaminantes de un sitio a otro. Además, los costos del proceso y el impacto en el sitio a remediar son considerablemente menores²⁹.

A continuación, se desarrollarán con más detalle algunos procesos de biorremediación. Esto es debido a que es uno de los procesos de recuperación de sitios contaminados menos

nocivo para el medio ambiente, y al papel fundamental que cumplen los biosurfactantes en ellos.

1.3.- Procesos de Biorremediación

En los últimos años ha surgido un gran interés social por el cuidado del medio ambiente debido a que se ha tomado conciencia de que llevar a cabo prácticas poco amigables con la naturaleza redunda en impactos negativos en la calidad de vida de los habitantes y, por otro lado, debido al endurecimiento de políticas gubernamentales respecto del medio ambiente y pasivos ambientales producto de las actividades humanas. En este sentido, tradicionalmente se han aplicado técnicas probadamente efectivas para la remoción de contaminantes en suelos y cuerpos de agua que involucran tratamientos físicos y/o químicos para tratar estos sitios. Este tipo de tratamientos muchas veces implica el movimiento de gran cantidad de material contaminado de un sitio a otro, el lavado de los sitios contaminados, tratamientos de oxidación química, etc., con el riesgo que cada uno de estos procesos conlleva. Por esta razón, la aplicación de este tipo de tratamientos se realiza inicialmente, y siempre y cuando exista la posibilidad de remover una gran cantidad de contaminante. Por lo dicho previamente, un objetivo ecológico prioritario es el desarrollar técnicas compatibles con el medio ambiente para la remoción de contaminantes en suelos y cuerpos de agua contaminados. Es en este ámbito donde la biorremediación posee un campo de aplicación con grandes perspectivas de éxito.

Diversos contaminantes han sido tratados a partir de técnicas de remediación con microorganismos, algunos de ellos son: metales pesados³⁰, compuestos organofosforados³¹, hidrocarburos clorados, compuestos nitroaromáticos³², pesticidas³³ e hidrocarburos de todo tipo^{34,35}. Estos últimos contaminantes son de particular interés para los objetivos del presente trabajo.

1.3.1.- Tipos de biorremediación

Los tipos de biorremediación pueden clasificarse en biorremediación in-situ intrínseca, biorremediación in-situ mejorada y biorremediación ex-situ mejorada. El hecho de que el proceso sea in-situ o ex-situ refiere a que se lleve a cabo en el mismo lugar en que se produjo la contaminación o que se retire una porción de material contaminado y se trate en otro lugar, respectivamente³⁶. Por otro lado, que el proceso sea intrínseco implica que no se realiza ninguna acción externa, si no que se lleva a cabo con los microorganismos nativos y con los nutrientes disponibles en el lugar. Por el contrario, se dice que la biorremediación 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 proceso³⁷. La biorremediación intrínseca 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.

La biorremediación de sitios crónicamente contaminados depende de diversos factores para lograr su objetivo. Algunos de estos son: las propiedades del contaminante, dado que hay compuestos que son rápidamente degradables como los hidrocarburos pequeños de cadena lineal, y otros son más difíciles, como los compuestos de cadena ramificada con dobles enlaces o compuestos poliaromáticos. La presencia de comunidades degradadoras y las condiciones del medio, es decir, disponibilidad de nutrientes, temperatura, aceptor de electrones, etc. Por último, cabe destacar la disponibilidad del contaminante³⁸. Este punto es el que reviste mayor importancia y es la razón por la cual generalmente la biorremediación intrínseca de hidrocarburos no es viable. Esto es debido a que el contaminante no es soluble (o lo es en pequeña medida) en agua, medio en que se desarrollan y viven casi la totalidad de los microorganismos degradadores. Para aumentar el rendimiento de la biorremediación mejorada (tanto in-situ como ex-situ) existen dos técnicas: bioaumentación³⁹ y bioestimulación⁴⁰.

1.3.1.1.- Bioaumentación

Esta técnica consiste en el agregado de comunidades de microorganismos foráneos al sitio a tratar para mejorar la degradación del contaminante. Debido a que la velocidad de degradación es directamente proporcional a la concentración de microorganismos, se mejora el rendimiento del proceso. Pero deben tenerse en cuenta ciertos factores a la hora de aplicar esta técnica, algunos de ellos son: disponibilidad de nutrientes, aceptor de electrones y condiciones ambientales; presencia de depredadores y competencia con microorganismos autóctonos; y forma de distribución de las comunidades exógenas. 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 oxígeno⁴¹. Además, se ha demostrado que el agregado de microorganismos endógenos resulta la mejor opción para aumentar la velocidad de degradación de un contaminante particular, sumado a la adición de los nutrientes necesarios. 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, resulta bastante difícil obtener una buena distribución cuando se trabaja in-situ.

1.3.1.2.- Bioestimulación

Es una técnica que consiste en el agregado de nutrientes, aceptor de electrones, alguna sustancia para regular el pH, o algún otro componente que mejore el rendimiento de la degradación⁴². Se basa en la consideración de que los microorganismos autóctonos son capaces de degradar el contaminante disponible. Además, 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 bioaumentación 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. Dado que los biosurfactantes son compuestos tensioactivos, con su adición se pretende aumentar la biodisponibilidad del contaminante y mejorar la velocidad de degradación del mismo⁴³. Además, al ser producidos por organismos vivos, son mucho menos tóxicos para el medio ambiente que los surfactantes químicos convencionales.

1.4.- Biosurfactantes

Los biosurfactantes son compuestos anfipáticos que, a diferencia de los surfactantes químicos o sintéticos, son producidos por distintos tipos de microorganismos tales como hongos, levaduras y bacterias. De estos, los provenientes de bacterias son los mayormente estudiados. 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 entre estas⁴⁴. El tipo de estructura de cada una de estas partes depende de diversos factores, entre los que se encuentran: tipo y especie de microorganismo, la fuente de carbono, tipo de fuente de nitrógeno y concentración, concentración de otros nutrientes, y parámetros de proceso, como el pH, temperatura, velocidad de agitación del cultivo, entre otros⁴⁵. En relación a esto, se ha demostrado la influencia del tipo de sustrato en la estructura del biosurfactante producido⁴⁶.

1.4.1.- Características y aplicaciones de los biosurfactantes

Los surfactantes de origen biológico poseen diversas ventajas respecto de los sintéticos. Entre estas podemos mencionar su biodegradabilidad completa, la posibilidad de producirlos a partir de fuentes renovables^{47,48}, y la gran diversidad y actividad biológica específica de ciertas estructuras. Sumado a esto, poseen mayor estabilidad a temperaturas y pH extremo, y concentraciones altas de sales⁴⁹. Además, poseen una amplia variedad de

aplicaciones, desde antibióticos⁵⁰, aditivos para la industria alimenticia^{51,52}, biorremediación de metales pesados e hidrocarburos⁵³, entre otros, en agricultura como insecticidas, pesticidas, adjuvante para formulación de productos^{54,55}, etc. Más allá de todas estas ventajas, los biosurfactantes poseen una desventaja de gran importancia, sus costos de producción. Este aspecto hace que su producción a gran escala no sea posible por el momento. A pesar de esto, hoy en día los surfactantes sintéticos y los biológicos se complementan. Esto es debido a que hay ciertas aplicaciones en las que la utilización de surfactantes biológicos, más allá de su costo, resulta beneficiosa. Por ejemplo, cuando el surfactante debe dispersarse en el medio ambiente para la remediación de sitios crónicamente contaminados⁵⁶.

Hay dos parámetros característicos de cada biosurfactante que dependen de la composición y la estructura química: concentración micelar crítica (CMC) y la mínima tensión superficial medida a la concentración micelar crítica (ST_{CMC}). Cuando se mide la tensión superficial a concentraciones crecientes de biosurfactante, se obtiene una curva como la que se muestra en la *Figura 3*. Cuando se extrapolan ambas curvas, se obtiene un punto de intersección que corresponde a la CMC, que es la concentración de biosurfactante a partir de la cual las moléculas se comienzan a agregar y a formar micelas, por lo que dejan de ser eficientes para disminuir la tensión superficial. El valor de la tensión superficial medido a esta CMC es ST_{CMC} ⁵⁷.

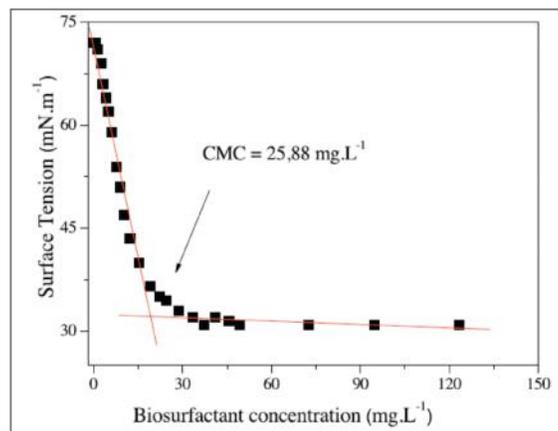


Figura 3: Concentración micelar crítica (CMC) de un biosurfactante producido por *Bacillus subtilis* ICA 56 a 30°C y 150rpm en un medio sintético⁴⁹.

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

Los biosurfactantes actúan de dos formas: disminuyen la tensión superficial y/o interfacial entre dos fases fluidas o son capaces de estabilizar emulsiones de dos fases inmiscibles. En primer lugar, en solución acuosa, 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. Por otro lado, pueden incrementar la solubilidad aparente de compuestos hidrofóbicos evitando la coalescencia de las emulsiones aceite en agua o agua en aceite. No todos los biosurfactantes disminuyen la tensión superficial entre dos fases fluidas o son buenos emulsificadores, en general, esta actividad se encuentra directamente relacionada con su estructura^{58,59}.

En base a esto, la fracción hidrofóbica de la molécula de un biosurfactante generalmente es uno o más ácidos grasos saturados o insaturados, o algunos derivados de éstos. Por otro lado, la hidrofílica puede poseer diversas estructuras tales como carbohidratos (monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos), péptidos (lineales o cíclicos), grupos fosfatos, aminoácidos, proteínas, entre otros, y estas estructuras pueden ser catiónicas, aniónicas, no iónicas o anfóteras⁶⁰.

Con el objetivo de clasificarlos, los biosurfactantes pueden dividirse de acuerdo a su peso molecular⁵⁷ en:

- Sustancias de bajo peso molecular, en general son aquellos compuestos que poseen una actividad superficial significativa,
- Sustancias de alto peso molecular, son aquellas que generalmente poseen propiedades emulsificantes.

1.4.2.1.- Biosurfactantes de bajo peso molecular

Los biosurfactantes de bajo peso molecular, generalmente, son más eficientes para disminuir la tensión superficial y/o interfacial entre dos fases inmiscibles⁶¹. Los mayormente estudiados son los glicolípidos y lipopeptidos, 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 grasos⁶².

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. En la *Figura 4* se observan cuatro estructuras de distintos ramnolípidos. La estructura predominante del surfactante se encuentra en relación directa con las condiciones de cultivo y el sustrato utilizado para la producción^{45,57}. Los ramnolípidos poseen múltiples potenciales aplicaciones, entre las que se puede mencionar producción de compuestos de química fina, caracterización de superficies, como aditivos para la biorremediación de suelos, agentes de control biológico, etc.^{63,64}.

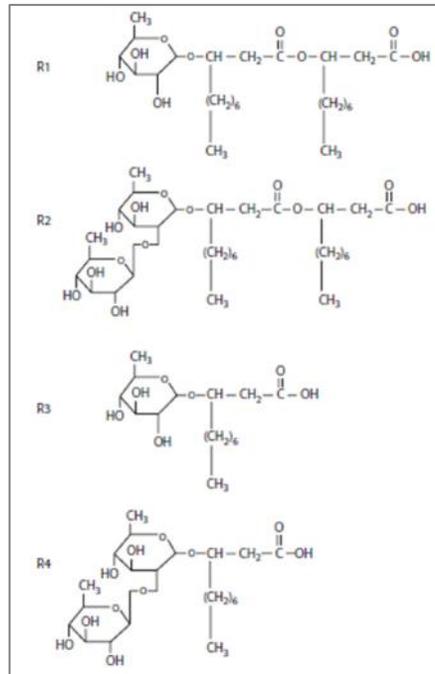


Figura 4: Estructura de cuatro tipos de ramnolípidos⁶⁵.

Los soforolípidos son glicolípidos compuestos por el disacárido soforosa unido a un hidroxíácido graso y son producidos principalmente por levaduras del género *Torulopsis sp.* En la *Figura 5* se observa la estructura de un miembro de esta familia. Este tipo de biosurfactantes posee buena actividad tensioactiva pero no así actividad bioemulsificadora⁶⁶. Este tipo de glicolípidos posee varias aplicaciones potenciales como detergentes para lavar la ropa, como aditivos para biorremediación in-situ de hidrocarburos o para la industria alimenticia, o para remover metales pesados de diversos sedimentos, entre otros⁶⁷.

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 de los géneros *Mycobacterium sp.*, *Nocardia sp.*, *Corynebacterium*

sp., *Rhodococcus sp.*, entre otros, y, el tamaño y estructura del/los ácido(s) micólico(s) difiere(n) de acuerdo al organismo productor. Algunas potenciales aplicaciones de estos glicolípidos son: agente antitumoral y antifúngico en medicina, emulsificador en la industria de la cosmética y alimenticia, y para la biorremediación de suelos y degradación de hidrocarburos poliaromáticos^{68,69}.

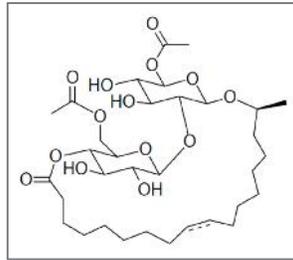


Figura 5: Sotrolípido de *Candida bombicola*⁶⁰.

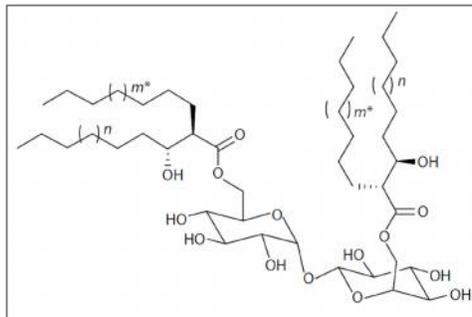


Figura 6: Trehalolípido de *Rhodococcus erythropolis*, $m+n = 18-22$ (*parcialmente insaturado)⁶⁰.

Con respecto a los lipopéptidos, el más ampliamente estudiado y actualmente uno de los escasos biosurfactantes disponibles comercialmente, es el surfactin producido por *Bacillus subtilis*. Este tipo de biosurfactantes generalmente posee una estructura en la que un péptido cíclico se encuentra acilado con ácidos grasos. Sumado a esto, además de poseer una muy buena capacidad tensioactiva⁷⁰, muchos lipopéptidos poseen efecto antibiótico⁷¹. Diversos microorganismos producen biosurfactantes de este tipo, entre ellos se puede mencionar *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Serratia sp.*

En la Figura 7 se observa la estructura del surfactin. La fracción hidrofílica de la molécula consta de un péptido cíclico compuesto por 7 aminoácidos, y la hidrofóbica de distintos 3-hidroxiácidos grasos. Este biosurfactante poseería diversas aplicaciones en el

ámbito de la medicina, como inhibidor de la coagulación sanguínea, agente antitumoral, antiinflamatorio, entre otros⁷².

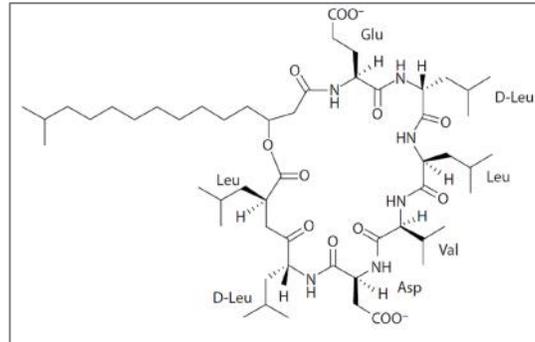


Figura 7: Surfactin de *Bacillus subtilis*⁶⁰.

1.4.2.2.- Biosurfactantes de alto peso molecular

Los biosurfactantes de alto peso molecular 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 de aceite/hidrocarburo en agua estables⁷³. Diversas especies de microorganismos producen este tipo de biosurfactantes⁷³, entre las que podemos mencionar las bacterias del género *Acinetobacter sp.*, *Halomonas eurihalina*, *Planococcus maitriensis*, la levadura *Cándida lipolytica*, etc. Los más estudiados son los bioemulsan producidos por *Acinetobacter sp.* Estos son emulsificadores de gran rendimiento y, en particular, RAG-1 es una mezcla compleja de exopolisacáridos de alto peso molecular y lipopolisacáridos con un peso superior a 250kDa. En la *Figura 8* se observa como ejemplo la estructura de RAG-1 Emulsan de *Acinetobacter sp.*

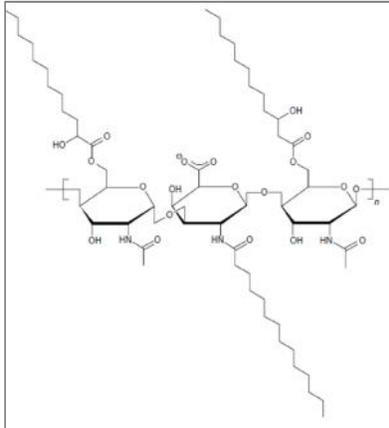


Figura 8: RAG-1 Emulsan de *Acinetobacter* sp. ATCC 31012⁶⁰.

1.5.- Hidrocarburos presentes en el suelo de la destilería. Degradación de hidrocarburos.

Como ya se mencionó previamente, el petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos (saturados, aromáticos, polares, entre otros) formada en la corteza terrestre a partir de la degradación de materia orgánica a lo largo de millones de años⁷⁴. El principal proceso de tratamiento del petróleo crudo consiste en la refinación y destilación⁷⁴ del mismo para separar los hidrocarburos que lo componen en distintas fracciones, comúnmente denominadas "cortes" (cada fracción está compuesta 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 y, por otro lado, las fracciones más pesadas se utilizan como asfalto, combustible sólido (coque de petróleo), lubricantes o aditivos para la industria papelera, etc. En el medio se encuentra una gran cantidad de sustancias que poseen diversas aplicaciones en industrias alimenticias, plásticas, de adhesivos y pinturas, medicina, etc⁷⁴.

Toda industria que involucre la intervención de petróleo o alguno de sus derivados produce un impacto negativo en el medio ambiente. En particular, las actividades de extracción, transporte, refinación y almacenamiento de petróleo implican un gran impacto ambiental⁷⁵, en suelos y cuerpos de agua, debido a filtraciones en tanques de almacenamiento u oleoductos, y/o derrames accidentales o intencionales en la carga y descarga del material. Cuando un evento de este tipo sucede, hidrocarburos con distintas estructuras y pesos moleculares entran en contacto con las partículas de suelo o con el cuerpo de agua. Lo que

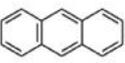
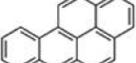
sucede en estos casos es que la persistencia de los contaminantes en el ambiente se encuentra determinada debido a los procesos de volatilización, lixiviación y/o degradación que los afecten. Generalmente, los compuestos alifáticos de pequeña y media longitud de cadena poseen bajos puntos de ebullición y alta solubilidad, por lo que los principales mecanismos de eliminación son la volatilización y dispersión (se pierden rápidamente en la atmósfera), y la 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. Estos compuestos también se ven afectados por procesos de degradación total o parcial a partir de microorganismos nativos⁷⁶. Todo esto se debe al tamaño de sus moléculas, a su menor solubilidad y a las interacciones que desarrollan con las partículas de suelo a medida que el tiempo de exposición se hace mayor. 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 medioambiente⁷⁷. Un ejemplo de este tipo de compuestos contaminantes distribuidos ampliamente en el medio ambiente son los hidrocarburos poliaromáticos (HPA). Estos 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^{78,79,80}.

1.5.1.- 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 (a medida que aumenta el tamaño de la molécula aumenta la insolubilidad, *Tabla 1*) y alta hidrofobicidad. Además, debido a estas últimas dos propiedades principalmente, las moléculas de los HPA son altamente recalcitrantes con grandes tiempos de retención. Su persistencia en el medio ambiente se debe a que las nubes de electrones π a ambos lados de la estructura la hacen resistente a ataques nucleofílicos⁸¹, y depende de diversos factores, como la estructura química de la molécula, concentración, biodisponibilidad, tipo de suelo y estructura, humedad, oxígeno disponible, nutrientes, pH, temperatura, presencia de microorganismos degradadores, entre otros⁸².

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 como erupciones volcánicas, incendios de pastizales y bosques, o como resultado de la biosíntesis de vegetales (donde podemos encontrar alcaloides, carotenoides aromáticos, terpenos, etc.). 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, por ejemplo, de vehículos de combustión interna, de operaciones de procesamiento de madera, de la producción de energía eléctrica en plantas de generación, etc. 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 suelos⁸² y aire⁸³ puede variar entre 1µg/kg – 300g/kg en el primer caso, y 60 µg/m³ – 3 mg/m³. 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 del mismo en agua, en un sistema bifásico octanol – agua.)

HPA	Naftaleno	Fluoreno	Fenantreno	Antraceno	Pireno	Benzo[a]pireno
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

1.5.2.- 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]pireno⁸⁴, además, se halló una cepa de *Micobacterium sp.* que puede crecer utilizando pireno como única fuente de carbono y energía⁸⁵. Por otro lado, se ha visto que diversas especies de hongos también son capaces de degradar compuestos aromáticos. Entre ellos se puede mencionar *Cunninghamella elegans*, cuya capacidad para degradar fluoranteno ha sido probada⁸⁶, o *Aspergillus fumigatus*, capaz de degradar antraceno, benceno y tolueno, entre otros⁸⁷. En *Zhang y col., 2006* se presenta un listado extenso de bacterias y hongos con capacidad degradadora de HPA, junto con el sustrato que son capaces de degradar⁸¹.

Se ha postulado que la degradación de HPA a partir de los microorganismos adecuados puede ser desencadenada por tres razones^{28,77}. En primer lugar, la mineralización del contaminante se realiza para obtener energía para sus funciones celulares y carbono para sintetizar material celular. En segundo lugar, se lleva a cabo un proceso mediante el cual el microorganismo inicia la degradación del contaminante con el objetivo de producir un intermediario de mayor solubilidad, que luego es excretado. Y por último, la degradación del HPA puede ser casual, esto sucede cuando se lleva a cabo a través de co-metabolismo⁸⁸. 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 cosustrato 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 degradación⁸⁹.

Respecto del metabolismo de degradación de HPA de estos microorganismos, de acuerdo a bibliografía hay tres mecanismos fundamentales que conducen a la degradación aeróbica de estas sustancias. 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 carbono⁹⁰.

Las bacterias generalmente 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*-dihidrodiol. 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*-dihidrodiol 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^{77,90}. 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 oxhidrilo. 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 adyacente⁹¹. 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 y col.⁹² presentan un estudio más detallado del metabolismo de degradación bacteriano de ciertos HPA.

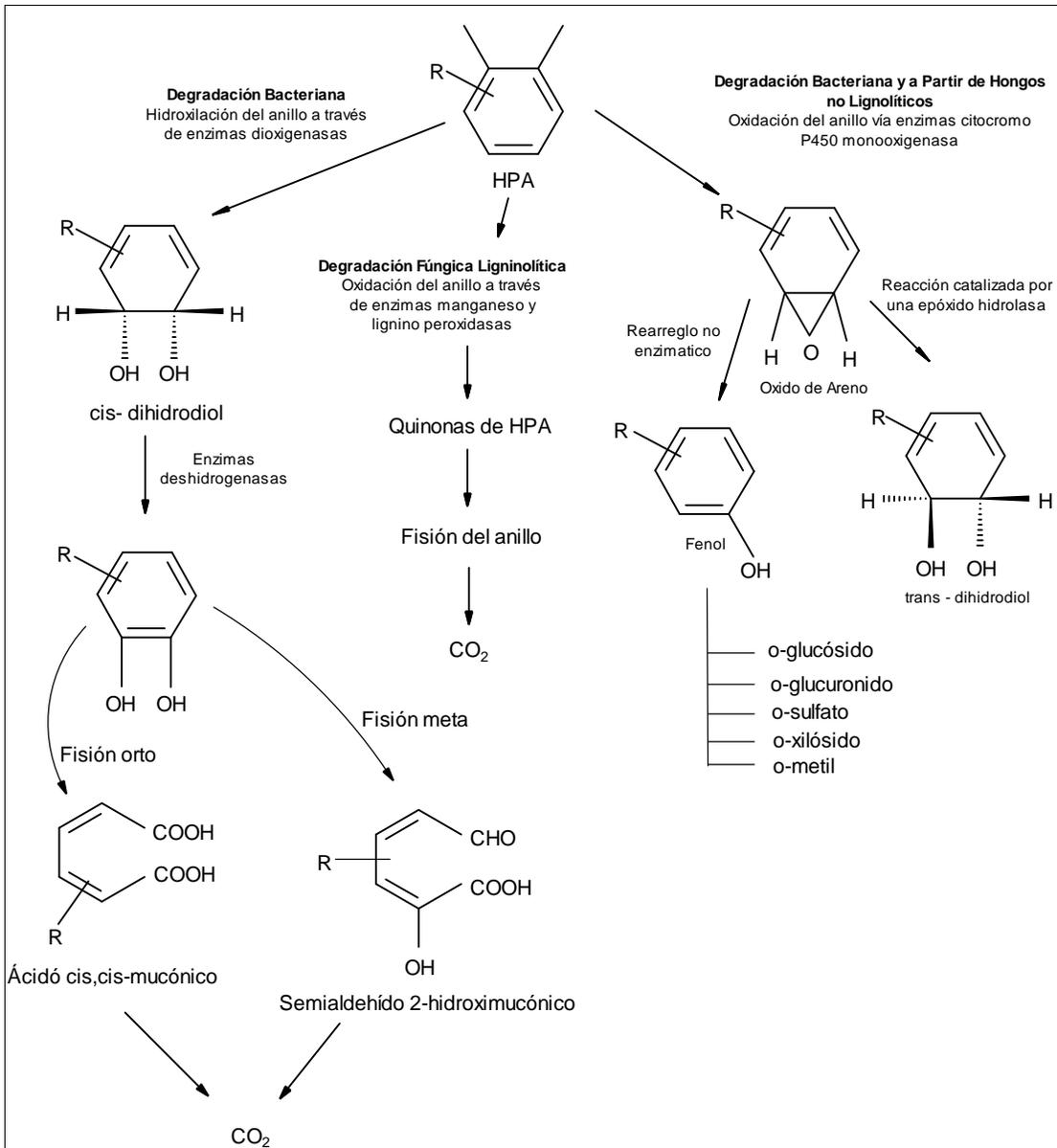


Figura 9: Vías principales de degradación de HPA a partir de bacterias y hongos⁹⁰.

Con respecto a los hongos, poseen dos tipos de metabolismo de degradación de HPA, aquél correspondiente a los hongos no ligninolíticos y el correspondiente a los ligninolíticos.

En el primer caso, 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, etc. Por otro lado, los óxidos de areno también pueden sufrir una hidratación catalizada por una epóxido-hidrolasa,

para dar *trans*-dihidrodiol⁹³. Muchos hongos no lignolíticos pueden degradar los HPA a fenoles, *trans*-dihidrodiol y otros compuestos intermediarios, pero son muy pocos los que logran la mineralización completa. A pesar de esto, se ha demostrado que los intermediarios obtenidos poseen una menor toxicidad y mayor solubilidad que sus precursores⁹⁰.

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 quinonas⁹³. 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. Los resultados obtenidos no han sido concluyentes, por lo que claramente se requieren ensayos adicionales para una mejor caracterización del fenómeno.

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

Esta estrategia implica la utilización de microorganismos, plantas o sus enzimas para llevar a cabo la degradación de los compuestos aromáticos presentes en suelos, sedimentos y cuerpos de agua, con el objetivo de restaurarlos a su condición original. Esto puede lograrse utilizando técnicas in situ (bioventeo, fitorremediación, atenuación natural) o ex situ (compost, biopilas, biorreactores). Este tipo de procesos posee diversas ventajas (frente a técnicas convencionales) y ciertas limitaciones. Entre las primeras, podemos mencionar que la biorremediación involucra técnicas que generalmente son más amigables con el medioambiente, ya que degradan las sustancias totalmente o a intermediarios menos nocivos, en lugar de trasladarlos de un ambiente a otro; son menos invasivas y sus costos son generalmente más bajos^{51,94}. Con respecto a las limitaciones del proceso, hay diversos factores que afectan el grado de remediación a alcanzar. Entre estos factores se puede mencionar la temperatura, el pH y las características del suelo, la biodisponibilidad del contaminante, disponibilidad de oxígeno y nutrientes, etc.

1.5.3.1.- 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, a mayor temperatura, ambas aumentan mejorando la

degradación⁹⁵. Por el contrario, cuando esto sucede la solubilidad del oxígeno es menor, y la reacción se ve afectada negativamente⁹⁶. Además, debido a que la cinética de reacción depende de la ecuación de Arrhenius, a bajas temperaturas la velocidad es baja, y en el intervalo entre 10°C y 40°C, se duplica su valor cada 10°C de incremento⁹⁷.

En cuanto al proceso de degradación, 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°C⁹⁷, en zonas templadas donde se distinguen claramente cuatro estaciones durante el año, en zonas tropicales⁹⁸ y en zonas desérticas donde la temperatura se mantiene alta durante el todo el año⁹⁹.

1.5.3.2.- pH

El pH del sitio contaminado afecta al proceso de biodegradación. Este efecto resulta más importante en contaminación de suelos, donde el pH del mismo depende del tipo de contaminante derramado, que en contaminación de agua de mar, donde la regulación del pH debida a la acción de los microorganismos y corrientes marinas hace que este se mantenga en un rango acotado de valores.

A pesar que se han observado procesos de degradación de HPA en suelos ácidos¹⁰⁰ y básicos¹⁰¹, el valor óptimo para una buena cinética se encuentra entre 6,5 y 7,5⁹³. Una pequeña variación en este valor puede no afectar el crecimiento de forma importante, pero se ha demostrado que en muchos casos afecta significativamente el grado de degradación^{102,103}. 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 ácido⁹³.

1.5.3.3.- Nutrientes

En la degradación de HPA en sitios contaminados, los microorganismos tienen gran cantidad de carbono orgánico disponible, por lo que usualmente requieren de nitrógeno (N), fósforo (P) y algún otro nutriente mineral para llevar a cabo la degradación del hidrocarburo y para su crecimiento. Se ha estimado que la relación C:N:P es uno de los parámetros que limita de forma considerable el proceso, y debido a la gran disponibilidad de carbono en el sustrato, dicha relación se regula a partir del agregado de N y P de una fuente externa, por ejemplo, fertilizantes¹⁰⁴. Se han reportado distintas relaciones de nutrientes óptimas en la bibliografía que van desde 100:15:3¹⁰⁵ hasta 100:5:1¹⁰⁶. 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 degradación¹⁰⁷. Esto se debe a que este tipo de organismos pueden reciclar nutrientes, en particular, nitrógeno.

1.5.3.4.- Biodisponibilidad

Se cree que 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 (transferencia de materia desde el sitio de la contaminación hasta el interior de la célula, en *Bezza y Chirwa, 2016*¹⁰⁸ se demuestra que este paso es el controlante de la reacción.) y la metabolización del mismo¹⁰⁹. 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 coeficiente de partición (K_{ow}) muy altos por lo que tienden a interaccionar fuertemente con la materia orgánica del suelo. Todo esto se traduce en que el hidrocarburo no se encuentra físicamente disponible para ser degradado por el microorganismo (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 microorganismo¹⁰⁹ (esto se conoce como “ageing”: envejecimiento).

Para aumentar la biodisponibilidad del contaminante la estrategia más difundida y efectiva es la utilización de biosurfactantes. 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^{108,110,111}.

1.5.3.5.- Oxígeno

La degradación de hidrocarburos puede llevarse a cabo en ambas condiciones, aeróbica y anaeróbica. Se sabe que la velocidad a la que se lleva a cabo el proceso en el segundo caso es menor¹¹² que en el primero o, como máximo, comparables¹¹³. Además, las condiciones anaeróbicas poseen una serie de desventajas que hacen que no sea deseable. Primeramente, no todos los sitios contaminados con hidrocarburos presentan microorganismos anaeróbicos capaces de degradar HPA. Y, por otro, la geoquímica será alterada debido a las condiciones reductivas 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.

Por otro lado, el oxígeno resulta de vital importancia para los procesos aeróbicos. El primer paso en la biodegradación de HPA involucra la acción de enzimas mono- y di-oxigenasas para la oxidación del anillo aromático¹¹⁴, 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 son⁹³: inyección directa de aire, a través de un sistema de reparto de sustancias químicas que liberen oxígeno, mediante el labrado y mezclado del suelo, entre otros.

1.6.- Problemática regional

El partido de Campana, ubicado al noroeste de la provincia de Buenos Aires, forma junto con el de Zárate uno de los polos industriales más grandes de la Argentina. Esto se debe a diversos motivos, pero principalmente a las diversas vías de comunicación con las que cuenta la zona y a la disponibilidad de un puerto propio, tercero en recaudación fiscal de Argentina¹¹⁵. Los rubros a los que se dedican las empresas radicadas en el área son muy diversos, en el polo industrial se pueden encontrar empresas metalmecánicas (Tenaris Siderca, Titania Fundición), químicas (Dow Chemical Company, Clariant), agroquímicas (PASA, Bunge), alimentarias (Cervecería Quilmes, Cervecería Isenbeck), Papeleras (Celulosa Campana, Celulosa Argentina), automotrices (Honda, Toyota) y petroquímicas (Axxion Energy, Rutilex Hidrocarburos Argentinos S.A. (RHASA), Petromining), entre otras.

En cuanto a la ciudad de Campana, posee en una pequeña parte de su territorio, en el margen del río Paraná de las Palmas, un conglomerado de empresas dedicadas exclusivamente a la actividad petroquímica. Allí se encuentran emplazadas las destilerías de las compañías Axxion Energy y RHASA, y diversas empresas cuya materia prima es un derivado o corte de petróleo crudo. Si consideramos las dos destilerías de la zona, la primera fue inaugurada en el año 1911 y la segunda comenzó sus actividades a mediados de la década del '40. De aquí surge que hace varias décadas que la zona se encuentra sometida a derrames accidentales¹¹⁶ o intencionales, fugas de tanques de almacenamiento y barriles, vuelcos accidentales en el

proceso de carga y descarga de camiones, etc. Esto hace que los suelos y cuerpos de agua se encuentren crónicamente contaminados con hidrocarburos.

Con respecto a esto último, durante la década de 1990 y 2000 la destilería RHASA (previamente Fabrica Militar de Tolueno Sintético) sufrió diversas protestas por parte de personas físicas¹¹⁷ y distintas asociaciones protectoras del medio ambiente debido a la existencia de un lago contaminado con hidrocarburos dentro del predio de la planta^{118,119,120,121}. De acuerdo a lo que han comentado empleados de la firma, a principios de los años '90, la empresa debía realizar la limpieza de varios tanques de almacenamiento de hidrocarburos, ya que luego de varios ciclos de llenado y vaciado, contenían un barro viscoso característico de este tipo de operaciones. Debido a alguna razón incomprensible, decidieron descargar dichos barros en la laguna que se encuentra dentro del predio (*Figura 10*).



Figura 10: Izquierda: Vista satelital (*Google Earth*) del predio de la empresa *RHASA* y el lago dentro del predio. Derecha: Imágenes de la descarga de planta a la laguna.

Es decir que la ribera del Río Paraná de las Palmas (la ciudad de Campana se ubica sobre la margen derecha), además de haberse visto sometida a la contaminación debida a varias décadas de actividad industrial petroquímica, se encuentra afectada por situaciones de derrames intencionales que afectan negativamente al medio ambiente y la sociedad en la que se encuentran inmersas estas fábricas.

En los últimos 6 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^{122,123}. 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 RHASA 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.

OBJETIVOS

2.1.- Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es aislar cepas microbianas nativas productoras de biosurfactantes de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos y con ellas conducir y optimizar la producción de biosurfactantes.

2.2.- Objetivos Específicos

Para lograr este objetivo se deberán cumplir los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluación del grado y tipo de contaminación que afecta a la zona contaminada a través de indicadores fisicoquímicos.
2. Aislamiento y selección de cepas y/o consorcios microbianos productores de biosurfactantes en base a su eficiencia en la producción de los mismos, a partir de muestras de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos.
3. Caracterización bioquímica y taxonómica de las cepas seleccionadas productoras de biosurfactantes.
4. Estimación de la producción de biosurfactantes en diversas condiciones de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- 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 ciudad de Campana se ubica a 75km 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 y el mundo, y con Rosario y el litoral argentino.

3.1.1.- Características Generales del Suelo de la Región y Toma de Muestras

3.1.1.1.- Tipo de Suelo

La ciudad de Campana se ubica en el Delta del Rio Paraná, el cual transporta depósitos de sedimentos cuyo destino final será el Río de la Plata. Esto hace que el principal material originario de los suelos sea el 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*. 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)¹²⁴. 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).

3.1.1.2.- Toma de Muestra y Almacenamiento

Las muestras fueron tomadas del predio que la empresa RHASA posee en la ciudad de Campana (*Figuras 11 y 12*), a partir de la firma de un convenio de trabajo conjunto con la Facultad Regional Delta de la UTN. Este convenio tiene como finalidad el desarrollo de una estrategia de biorremediación, de aplicación en la zona en cuestión y sus alrededores, para intentar disminuir el impacto causado por derrames producto de la actividad industrial.



Figura 11: Plano de la ciudad de Campana. En amarillo se indica la ubicación de la destilería de petróleo de la empresa RHASA.



Figura 12: Vista ampliada del predio de la empresa. Se muestra la zona de donde se obtuvieron las muestras.

Con ayuda de personal de la empresa, se realizó un análisis del sitio teniendo en cuenta la topografía del lugar, la disposición de los equipos y la descarga de efluentes de planta. En base a esto se seleccionaron 5 puntos de toma de muestra que se identificaron como (Figura 12):

- Mt: montículo de tierra de relleno adicionada a un lugar que solía ser una laguna artificial donde se desechaban los remanentes de los tanques de almacenamiento de la destilería.
- Tk: alrededores de un tanque de almacenamiento que sirve como depósito de los barros y material de descarte de los equipos utilizados en planta (Tk.1) e interior del mismo (Tk.2).
- Co: costa de la laguna natural dentro del predio de la empresa, donde se descargan los efluentes de planta.
- Lg: lecho de la laguna natural cercano a las orillas.
- Ag: agua de la laguna antes descripta.

El proceso de toma de muestra se realizó utilizando palas de mano y material de vidrio (frascos y botellas) para el almacenamiento de las mismas. Todo el material se esterilizó por autoclave. Además, se utilizaron elementos de protección personal (guantes, casco y protectores visuales) con un doble objetivo, evitar la contaminación de las muestras y protección del personal encargado de la tarea.

Las muestras fueron tomadas a una profundidad de entre 10 y 20 centímetros para el caso de Mt, Co y Tk.1; Lg a una profundidad respecto de la superficie del agua de 1 metro y a 10 metros de la descarga de efluentes; y Tk.2 de la superficie del contenido del tanque. Todas fueron recolectadas en frascos de vidrio de 800cm³ de capacidad. Respecto a la toma de muestra correspondiente a Ag, fue realizada directamente de la superficie de la laguna, a unos 5 metros de la descarga de efluentes de la planta, con botellas de vidrio tipo Duran Schott de 1000cm³. Además, se recolectó agua de la laguna para su utilización en una primera instancia como única fuente de carbono para el aislamiento de los microorganismos. Todas las muestras fueron debidamente rotuladas y almacenadas provisoriamente en una refrigeradora portátil que contenía cubos de hielo y luego, en el laboratorio, se dispusieron en una heladera a 4°C hasta el momento de procesarlas.

3.1.1.3.- 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. Se le realizaron tres ensayos a cada una de las muestras analizadas:

- 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.

3.2- Medios de cultivo

Para llevar a cabo los experimentos, se utilizó un medio mínimo salino (MSM) previamente descrito en *Shen y col., 1998*¹²⁵. MSM es un medio utilizado para estudios de degradación de hidrocarburos en microorganismos aislados de muestras de suelo y su composición es: 4g/l de NaNO₃; 1,5g/l de KH₂PO₄; 0,5g/l de Na₂HPO₄; 0,0011g/l de FeSO₄·7H₂O; 0,2g/l de MgSO₄·7H₂O; 0,0132g/l de CaCl₂·2H₂O; 20g/l agar-agar (sólo cuando fue necesario el cultivo en medio sólido). La calidad de las sales fue grado analítico y fueron adquiridas a la firma *Sistemas Analíticos S.A., Biopack*, a excepción del KH₂PO₄, que se adquirió a *Merck Argentina*, y del agar-agar (*Laboratorios Britania S.A.*). El pH del medio se ajustó a 7,00 ± 0,02.

Se utilizaron distintas fuentes de carbono. La primera de ellas, una mezcla en partes iguales de tres hidrocarburos comerciales (HC): nafta super (RON95), diésel (<2000ppm de azufre) y kerosene. Estos combustibles fueron adquiridos en *YPF S.A.* Además, se utilizó agua crónicamente contaminada con hidrocarburos extraída de la laguna natural dentro del predio de la empresa (AgLag), glicerol grado analítico y glucosa bacteriológica (*Laboratorios Britania S.A.*).

Se utilizó el medio de cultivo de lisogenia¹²⁶ (LB, medio Luria-Bertani) como pre cultivo, cuya composición es: 10g/l de tripteína bacteriológica, 5g/l de extracto de levadura, 10g/l de cloruro de sodio y 15g/l de agar-agar (en caso de cultivo en placas de Petri). Los reactivos fueron adquiridos a *Laboratorios Britania S.A.*, a excepción del NaCl (*Alcor reactivos analíticos*).

3.3- Aislamiento y selección de los microorganismos

3.3.1.- Aislamiento de los microorganismos

Las muestras obtenidas de la empresa fueron procesadas y cultivadas en medio de enriquecimiento con el objetivo de seleccionar y aislar microorganismos nativos productores de biosurfactantes. Para ello, el primer paso realizado fue la homogeneización de las mismas en el laboratorio, ya que al haber grandes trozos de suelo, carecían de homogeneidad¹²⁷. Se dispusieron las muestras en cristalizadores de vidrio y, con ayuda de cucharas y espátulas metálicas, se procedió a reducir el tamaño de partícula y a generar una buena mezcla. En el caso de la muestra acuosa, se agitó vigorosamente el recipiente que la contenía.

Luego, 1g de cada muestra, 1ml para la muestra acuosa, y 5ml de agua destilada se introdujeron en respectivos tubos Falcon de 15ml, se vortexearon a 2000rpm por 3 minutos y se dejaron reposar por 15 minutos. 2ml del sobrenadante de cada tubo falcon fueron utilizados para inocular los cultivos de enriquecimiento. Éstos se llevaron a cabo en 12 matraces Erlenmeyer de 150ml conteniendo MSM y dos fuentes de carbono y energía, HC y AgLag (6 muestras ensayadas con cada fuente de carbono). La composición de los cultivos con HC fue 21,87ml MSM, 1,13ml HC (4,5%v/v) y el inóculo antes mencionado. Por otro lado, la composición cuando se utilizó AgLag fue de 16,75ml MSM, 6,25ml de AgLag y 2ml de inóculo. Estos matraces se cultivaron a 100rpm y 25°C por 72 horas y se repicaron 8 veces. En cada repique se utilizó 1ml del cultivo agotado como inóculo para el cultivo fresco, y el mismo tipo y concentración de fuente de carbono para cada uno de ellos.

Posteriormente, se realizó el aislamiento de los microorganismos en placas de Petri conteniendo 10ml de MSM suplementado con 20g/l de agar y la fuente de carbono correspondiente. Dado que se utilizaron fuentes de carbono volátiles, una vez solidificado el MSM + agar en la placa se colocaron 100µl de HC o AgLag (según cada muestra), se distribuyeron con una espátula de Drigalsky y se dejó reposar las placas durante al menos 2 horas con esta superficie hacia arriba. Cada placa fue inoculada con un ansa previamente sumergida en el cultivo de enriquecimiento correspondiente y se mantuvieron en estufa de cultivo a 25°C. Las distintas colonias de microorganismos fueron transferidas a placas con medio fresco al cabo de 6 días, operación que se repitió 3 veces.

3.3.2.- Selección de microorganismos potencialmente productores de biosurfactantes.

Se evaluó la capacidad de producción de biosurfactantes de los microorganismos aislados a partir de su cultivo en medio líquido. Se estableció como criterio de selección la capacidad de un microorganismo para disminuir la tensión superficial del sobrenadante libre de células en más de un 30%. Los cultivos se llevaron a cabo en Erlenmeyers de 150ml con 25ml de volumen operativo, respetando la composición utilizada para los cultivos de enriquecimiento. Cada Erlenmeyer se inoculó con un ansa a partir de la placa correspondiente y se situaron en un agitador orbital a 100rpm y 25°C por 10 días.

3.3.3.- Mantenimiento de las cepas aisladas: Criopreservación

En microbiología se cuenta con un gran número de métodos de conservación de cepas microbianas, entre los que se pueden mencionar subcultivos, mantenimiento bajo una capa de aceite, desecación, congelación o liofilización, entre otros. La elección de uno u otro se ve influenciada por diversas variables, como ser el equipamiento disponible, tiempo de

preservación requerido, frecuencia de utilización del microorganismo, etc. A partir de un análisis de estas variables realizado en el laboratorio para el caso particular, se optó por preservar los microorganismos aislados a partir de su congelación con glicerol como agente protector.

Por lo tanto, la conservación de los microorganismos aislados se llevó a cabo en glicerol 20%. Se tomaron 960µl de cultivo líquido (MSM suplementado con 4,5% HC, mantenido a 120rpm, 25°C por 7 días) y se los trasvasó a un tubo eppendorf. A continuación, se agregaron 240µl de glicerol y se vortexeó la mezcla a 2000rpm por 2 minutos. Luego, se dispuso los tubos en una gradilla y se almacenaron en freezer a -18°C y a -80°C.

3.4- Producción de biosurfactantes

3.4.1.- Estimación de la producción de biomasa

Se estimó la producción de biomasa del microorganismo a partir de dos métodos, medición de la densidad óptica (DO) y del peso seco al cabo de 24 horas (PS):

3.4.1.1.- Densidad óptica: Evaluación del crecimiento microbiano a partir de la medición de la densidad óptica inicial y final de cada muestra a una longitud de onda de 600nm con un espectrofotómetro modelo UV-1800 (*Shimadzu Corporation, Japón*).

3.4.1.2.- Peso seco: Se centrifugaron 24ml de cada muestra a 13500 rpm a 19°C durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido fue utilizado para la medición de la tensión superficial. El pellet fue resuspendido con n-hexano para extraer los restos de hidrocarburo que pudiesen haber¹²⁸, trasvasado a un tubo eppendorf de 1,5 ml, previamente pesado, y se volvió a centrifugar. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue colocado en una estufa de secado a 80°C durante 24 hs, para eliminar la humedad presente en la muestra. En aquellos casos en los que no se utilizó HC como fuente de carbono y energía para los cultivos, el pellet fue resuspendido con agua destilada estéril.

3.4.2.- Estimación de la producción de biosurfactantes

3.4.2.1.- *Medición de la tensión superficial (ST)*: Ésta se llevó a cabo a partir de la medición directa de la tensión superficial del sobrenadante de cultivo libre de células, con un tensiómetro *Attension Sigma Force Tensiometer 702 (Biolin Scientific Holding AB)* por el método del anillo de Du Nouy^{129,130,131}. Se utilizaron 18ml de sobrenadante de cultivo centrifugado a 13500rpm y 19°C por 15 minutos en una microcentrífuga

modelo *Prism R* (*Labnet International INC.*) para llevar a cabo la medición. Se realizaron 12 medidas sobre cada muestra y se calculó la media y el desvío estándar (STD) de los resultados. Se utilizó como blanco del ensayo el sobrenadante libre de hidrocarburos de un cultivo de MSM suplementado con 4,5%v/v o 6%v/v de HC, o 25%v/v de AgLag (según el caso) sin inocular, cultivado a la temperatura correspondiente del cultivo, pH inicial de 7,00 y 120rpm por 6 o 10 días. El resultado se indica como $\bar{X} \pm STD$.

3.4.2.2.- *Ensayo de distorsión óptica en policubeta (MPA)*: Este ensayo se realizó en una policubeta de 96 hoyos utilizando 100µl de agua destilada estéril como control. La policubeta se dispuso sobre una hoja con un grillado perpendicular y en cada orificio se introdujo 100µl de sobrenadante de cultivo libre de células de cada muestra^{129,132}. Las policubetas fueron adquiridas a Instrumental Pasteur S.R.L.

3.4.2.3.- *Capacidad emulsificadora (E_{24})*: Este ensayo se realizó en tubos falcon de 15ml. Se procedió según *Cooper y col.*⁷⁰ con una ligera modificación. Además de kerosene se utilizó n-hexano (*Sistemas Analíticos S.A., Biopack*), aceite comercial de girasol, diésel comercial (<2000ppm azufre) y nafta súper (RON 95) como fases orgánicas para el ensayo.

3.4.2.4.- *Técnica de hemólisis*: Se realizó en placas de agar sangre base tripticasa soya (TSA) listas para utilizar adquiridas a *Laboratorios Britania S.A.* Estas se inocularon con ansa a partir de microorganismos crecidos en placas de Petri con medio LB por 6 días a 25°C. El ensayo se llevó a cabo a 25°C y 37°C y se evaluó el tipo de hemólisis luego de 24hs y 48hs^{130,133}.

3.4.2.5.- *Precipitación ácida en dos etapas*: Con el objetivo de purificar el tensioactivo del medio de cultivo se llevó a cabo un proceso de precipitación en medio ácido. Se utilizaron 24ml de muestra que se centrifugaron a 13500rpm y 19°C por 15min para la separación de la biomasa. El sobrenadante fue acidificado con una solución 1M de HCl hasta un pH 2 y 18ml de este fueron centrifugados a 13500rpm y 4°C por 20min. El pellet obtenido fue resuspendido en agua destilada, trasvasado a un tubo de peso conocido, acidificado con HCl y centrifugado en las mismas condiciones. Por último, se retiró el sobrenadante y el precipitado obtenido se secó por 1h a 80°C.

3.5- Identificación de los microorganismos

3.5.1.- Tinción de Gram

A partir de un cultivo líquido del microorganismo se tomó una muestra con ansa, se distribuyó sobre la superficie de un cubre objetos y se fijó con calor. Luego se realizó la tinción de la muestra con un kit comercial (*Sistemas Analíticos S.A., Biopack*).

3.5.2.- Pruebas bioquímicas para identificación de microorganismos

Se llevaron a cabo a partir de la utilización de sistemas de identificación API comerciales adquiridos a la firma *bioMérieux Argentina S.A.* Los sistemas utilizados fueron:

- API 20NE: Sistema de identificación de bacilos gram negativos no enterobacterias y no fastidiosos.
- API 20 Strep: Sistema de identificación de microorganismos *Streptococcaceae* y otros gérmenes emparentados.
- API Coryne: Sistema de identificación de bacterias corineformes.

Todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la identificación fueron adquiridos a la empresa *bioMérieux Argentina S.A.* a excepción de los discos de oxidasa y las placas de agar sangre base TSA (agar tripteína de soya) listas para usar que fueron adquiridas a la empresa *Laboratorios Britania S.A.*

3.5.3.- Identificación molecular de los microorganismos

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

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

3.5.4.- Ensayo de susceptibilidad bacteriana a diferentes antibióticos

Para conocer la sensibilidad del microorganismo *Ag HC* Se determinó la susceptibilidad antimicrobiana del microorganismo *Ag HC*, aislado y seleccionado para el estudio del presente trabajo, por difusión de discos en agar frente a 11 antibióticos. Un listado de los mismos se observa en la *Tabla 2*.

El microorganismo fue sembrado en placas de Petri conteniendo medio de cultivo LB con 20g/l de agar-agar, para obtener colonias aisladas del mismo. Algunas de estas se resuspendieron en agua destilada en tubos falcon de 15ml para obtener una suspensión con una turbidez igual al patrón 0,5 de McFarland.

Para el ensayo se utilizaron placas de Petri con medio LB y 20g/l de agar-agar. La superficie de las mismas fue cubierta completamente con la suspensión antes formulada a partir de su distribución con hisopos estériles. Se dejó secar las placas unos 5 minutos y luego se depositaron sobre la superficie de las mismas los discos embebidos en antibiótico. Se tuvo especial cuidado de respetar una distancia de 24mm entre centro de discos contiguos para tener una buena medida de los resultados y se depositó una gota de agua destilada sobre cada disco para favorecer la difusión de los antibióticos. Luego, se incubaron las placas en estufa de cultivo a 25°C y se midió el halo de inhibición a las 24hs y 48hs. Los resultados fueron comparados con valores estandarizados a fin de establecer si el microorganismo aislado es susceptible o resistente a los antibióticos ensayados.

Tabla 2: Antibióticos utilizados para el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.

Antibióticos Ensayados
Imipenem 10µg
Ampicilina 10µg
Ciprofloxacina 5µg
Cefalotina 30µg
Penicilina 10U
Minociclina 30µg
Eritromicina 15µg
Piperacilina 100µg / Tazobactam 10µg
Vancomicina 30µg
Meropenem 10µg
Ampicilina 10µg / Sulbactama 10µg

3.6- Cultivo para la producción de biomasa y biosurfactantes

3.6.1.- Cultivo de los microorganismos en presencia de hidrocarburos

Los microorganismos aislados fueron cultivados para evaluar su potencial utilización en la producción de biosurfactantes.

El cultivo de dichos microorganismos se llevó a cabo en Erlenmeyers de 150ml conteniendo 25ml de volumen final. Para ello se utilizó MSM y dos fuentes de carbono: 4,5% v/v de HC o 25% v/v de AgLag. Cada microorganismo fue cultivado utilizando ambas fuentes de carbono por separado, y en cada caso fueron las únicas fuentes de carbono y energía. Las muestras se cultivaron por 7 días a 100rpm y 25°C en un agitador orbital. Se midió DO, tensión superficial, distorsión óptica y pH de cada cultivo, inicial y final.

3.6.2.- Optimización del medio de cultivo de la cepa seleccionada para la producción de biomasa y de biosurfactantes

3.6.2.1.- Ensayos en Erlenmeyers

Para los ensayos de estimación de parámetros necesarios para optimizar las condiciones de crecimiento y del medio de cultivo fueron utilizados en una primera instancia, Erlenmeyers de 250 ml, con un volumen final de 45 ml. Se ensayaron tres concentraciones de fuente de carbono y tres temperaturas de cultivo diferentes (2% v/v, 4,5%v/v y 6%v/v; 21°C, 25°C y 29°C respectivamente), y se analizó la capacidad de la bacteria para crecer y producir compuesto tensioactivo en cada ensayo.

Debido a que el microorganismo se mantuvo preservado a -18°C en glicerol 20%, para llevar a cabo el estudio se realizó un precultivo de activación en medio MSM suplementado con 4,5% v/v HC en un Erlenmeyer de 250ml con 25ml de volumen final durante 6 días a 25°C \pm 1°C y 120rpm \pm 2rpm. Luego, se tomó una alícuota de este cultivo y se realizó una dilución con MSM hasta obtener una densidad óptica (DO) de 0,200 \pm 0,010, equivalente a una concentración de biomasa de 0,0425g/l. De esta solución, fueron tomados 1 ml como inóculo inicial, para el ensayo de las diferentes condiciones establecidas.

Para cada temperatura ensayada se utilizó MSM suplementado con 2%v/v, 4,5%v/v y 6%v/v HC como única fuente de carbono y energía a 120rpm \pm 2rpm por 6 días. Cada conjunto de variables estudiadas fue realizado por duplicado. Se midió el peso seco (PS), DO, tensión superficial, distorsión óptica en policubeta y pH de cada cultivo, inicial y final.

3.6.2.2.- Ensayos en biorreactor

A partir de los resultados obtenidos a escala Erlenmeyer, se evaluó el comportamiento del microorganismo en una escala mayor. Para ello se realizó un cultivo en un biorreactor de laboratorio modelo BioFlo 115 (*New Brunswick Scientific Co.*) con un vaso encamisado de 3 litros de capacidad. El procedimiento que se llevó a cabo incluyó las siguientes etapas:

.Pre cultivo de activación: Este tiene por objetivo el activar al microorganismo, ya que este se encuentra preservado en glicerol 20% a -18°C . El cultivo se realizó en Erlenmeyers de 250ml con 25ml de volumen final. Se utilizó MSM suplementado con 4,5% v/v de HC como fuente de carbono y energía. El cultivo se dispuso en un agitador orbital a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $120\text{rpm} \pm 2\text{rpm}$ por 6 días.

.Preparación del inóculo: Se diluyó una alícuota del pre cultivo de activación en MSM hasta un valor de DO de $0,200 \pm 0,010$, equivalente a una concentración de biomasa de $0,0425\text{g/l}$.

.Cultivo en biorreactor: El cultivo se realizó en un volumen final de 2000ml. Se utilizaron 45ml de inóculo, 120ml de HC y 1835ml de MSM. El cultivo se desarrolló por el término de 7 días a 25°C , 200rpm y un pH inicial de $7,10 \pm 0,1$. Se tomaron muestras diarias a las que se le midió DO, PS, pH, valor de la tensión superficial, capacidad emulsificadora y se les realizó un ensayo de distorsión óptica. Además, se midió el coeficiente global de transferencia de oxígeno (K_La) con el objetivo de evaluar la eficiencia del sistema respecto de la transferencia de materia. El K_La se midió a partir del método dinámico simple^{134,135}.

3.6.3.- Utilización de diferentes fuentes de carbono

Se llevó a cabo un ensayo de cultivo en dos etapas a escala Erlenmeyer. El pre cultivo se desarrolló por 72 horas a 25°C y 135rpm en un matraz de 250ml de capacidad conteniendo 60ml de medio LB. El microorganismo fue inoculado con ansa a partir de un vial criopreservado en glicerol a -18°C .

El inóculo para el ensayo se realizó a partir de una dilución en agua destilada del pre cultivo hasta una turbidez correspondiente a una solución 0,5 McFarland. Respecto del volumen de inóculo, se utilizó la misma proporción que para los ensayos previos. Por lo tanto, debido a que el volumen total de cada cultivo en este ensayo fue de 100ml, se utilizaron 4,5ml del inóculo para cada uno de ellos.

El ensayo se llevó a cabo en matraces conteniendo MSM suplementado con dos fuentes de carbono: 20g/l de glucosa o 3%v/v de glicerol. Éstos se dispusieron en un agitador orbital a 135rpm y 25°C por 48hs. Se tomaron muestras a las 0, 24 y 48 horas y se les midió DO, PS, pH, tensión superficial y distorsión óptica en policubeta. Se utilizó MSM + fuente de carbono (glucosa o glicerol, según corresponda) como blanco para los ensayos realizados. Luego, la biomasa producida a las 48hs se centrifugó a 3500rpm por 20 minutos, se retiró el

sobrenadante de cultivo y se resuspendió el pellet con 10ml de agua destilada. La solución resultante se utilizó como inóculo para la siguiente etapa.

A continuación, se inocularon Erlenmeyers de 250ml con 125ml de MSM suplementado con 4,5% v/v de HC como única fuente de carbono y energía. Éstos se mantuvieron a 135rpm y 25°C por 72 horas. Se tomaron muestras a las 0, 24, 48 y 72 horas y se midió DO, PS, pH, tensión superficial y distorsión óptica en policubeta. Se utilizó un Erlenmeyer con MSM suplementado con 4,5% v/v de HC sin inocular como blanco para los ensayos.

3.6.4.- Purificación del biosurfactante

A partir de los resultados obtenidos previamente, se evaluó el comportamiento del microorganismo creciendo en un medio de cultivo suplementado con glicerol con el objetivo de separar el biosurfactante. Para ello se realizó un ensayo en Erlenmeyers durante 4 días. Las etapas del proceso que se llevó a cabo fueron las siguientes:

.Pre cultivo de activación: Se cultivó el microorganismo en Erlenmeyers de 250ml con 60ml de medio LB, en un agitador orbital a 25°C y 135rpm por 3 días. La bacteria se inoculó con un ansa a partir de un cultivo sólido de la misma reservado a 4°C.

.Preparación del inóculo: Se diluyó una alícuota del pre cultivo de activación en agua destilada hasta un valor de DO correspondiente a $0,200 \pm 0,010$ a 600nm (0,0425g/l).

.Cultivo en Erlenmeyer: se realizó en un volumen final de 150ml por cada Erlenmeyer. Se utilizaron 138,8ml MSM suplementado con 4,5ml de glicerol y 6,7 ml de inóculo. El cultivo se desarrolló por el término de 4 días a 25°C y 135rpm. Se tomaron muestras diarias a las que se les midió DO, PS, pH y valor de la tensión superficial. Al cabo de 96h de cultivo, se procedió a separar el biosurfactante del cultivo a partir de una precipitación ácida en dos etapas. El control utilizado fue un Erlenmeyer con 145,5ml de MSM suplementado con 4,5ml de glicerol.

3.7- 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 del test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1- Análisis de las Muestras

Las muestras obtenidas del predio de la empresa RHASA en la ciudad de Campana fueron enviadas al Centro de Investigaciones Toxicológicas para ser analizadas a través de 3 métodos: Hidrocarburos Totales, GRO y DRO. El primero de los ensayos se utiliza para determinar bajas concentraciones de compuestos orgánicos en muestras de suelo, sedimentos, lodos y cualquier otro sólido que sea capaz de ser sometido a procesos de secado y extracción con n-hexano. Por otro lado, los ensayos de GRO y DRO se utilizan para determinar compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles no halogenados. El primero de estos abarca el rango de compuestos desde C_6 a C_{10} , con puntos de ebullición entre 60°C y 170°C . En cuanto al ensayo de DRO, abarca los compuestos de C_{10} a C_{28} con puntos de ebullición en el rango de 170°C a 430°C .

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 a los otros ensayos, el resultado fue no cuantificable por los protocolos llevados a cabo. Esto indica una concentración de compuestos orgánicos e hidrocarburos volátiles, semivolátiles despreciable. Por el contrario, 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 aquellos más recalcitrantes. Los compuestos de menor masa molecular, de menor punto de ebullición y/o más hidrofílicos son los que se eliminan (por métodos físicos principalmente) o dispersan más fácilmente.

4.2- Aislamiento y Selección de los Microorganismos

El aislamiento de microorganismos degradadores de hidrocarburos se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 150ml con 25ml de volumen final y dos fuentes de carbono y energía diferentes (HC y AgLag). Tomando como referencia lo consultado en la bibliografía, las concentraciones utilizadas fueron 4,5%v/v y 25%v/v, respectivamente. En primer lugar, se halló que la concentración de sustrato utilizada en un cultivo microbiano con hidrocarburos oscila entre el 1% y el 8%v/v^{136,137,138}, de esta forma se utilizó un valor promedio para evitar inconvenientes debidos a exceso o falta de sustrato en el cultivo.

De acuerdo a lo consultado en la bibliografía, en un cultivo microbiano, cuando se utiliza una fuente de carbono agotada (aceite, diésel, entre otras), las concentraciones rondan el 10%v/v¹³⁹. De esta manera, dado que el agua de la laguna posee hidrocarburos en solución en una menor proporción que esas fuentes de carbono, se optó por utilizar un 25%v/v de AgLag en los cultivos de enriquecimiento. En total, 12 cultivos de enriquecimiento se llevaron a

cabo a partir de las 6 muestras de suelo y agua obtenidas de la destilería, es decir, cada muestra fue cultivada utilizando HC y AgLag (por separado) como única fuente de carbono y energía.

Luego de 3 días de cultivo, una alícuota de cada uno de estos se transfirió a placas de Petri con MSM y la respectiva fuente de carbono para seleccionar los microorganismos. Se hallaron 13 colonias con morfologías diferentes, una por cada Erlenmeyer, excepto en el cultivo Tk.1.A suplementado con HC, en el que se identificaron dos: una colonia grande y una cuya morfología fue mucho más pequeña (Tk.1.CG y Tk.1.CC, respectivamente). En la *Figura 13* se visualizan algunos cultivos de enriquecimiento y las placas llevadas a cabo con ellos.

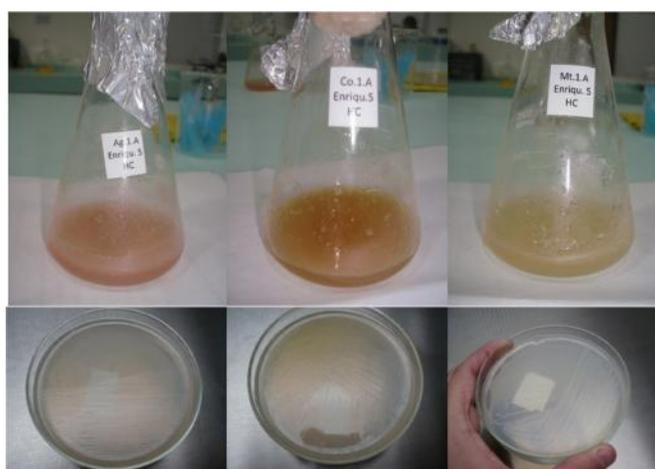


Figura 13: Cultivos de enriquecimiento y placas realizadas con el objetivo de lograr el aislamiento de cepas degradadoras de hidrocarburos.

Las colonias aisladas fueron cultivadas en medio líquido con el objetivo de seleccionar aquellas que posean potencial capacidad de producción de biosurfactantes. Para ello se evaluó la tensión superficial del sobrenadante de cultivo, la capacidad emulsificadora de este frente a diferentes fases orgánicas, su capacidad hemolítica y se realizó un ensayo de distorsión óptica. Los resultados del ensayo de tensión superficial se muestran en la *Tabla 3*.

Tabla 3: Resultados de las medidas de tensión superficial de las muestras aisladas. Las muestras se nombran según sitio de extracción y fuente de carbono utilizada para su crecimiento. Se observa ST promedio, desvío estándar y porcentaje de disminución del valor de ST de cada una de las colonias.

Muestra	Lg HC	Mt HC	Co HC	Ag HC	Tk2 HC	Tk1 HC	Tk1 CC	Lg Ag	Mt Ag	Co Ag	Ag Ag	Tk2 Ag	Tk1 Ag	Control
	Lag	Lag	Lag	Lag	Lag	Lag	Lag	Lag	Lag	Lag	Lag	Lag	Lag	
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

Las denominaciones de las colonias fueron hechas en base al sitio de donde se tomó las muestras a partir de la que fueron aisladas, a saber, Lg: lecho de la laguna; Mt: montículo de tierra contaminada; Co: costa de la laguna; Ag: agua de la laguna; Tk1: tierra alrededor de un tanque de almacenamiento de hidrocarburos; Tk2: fluido dentro del tanque de almacenamiento.

En la *Tabla 3* podemos observar que la mayoría de las muestras crecidas en MSM suplementado con HC redujeron la tensión superficial del medio en más de un 30% (parámetro tomado como valor de referencia para la selección de los microorganismos). Estos resultados son comparables a aquellos obtenidos por *Zhang y col.*¹⁴⁰. Por otro lado, en aquellas muestras cultivadas con AgLag no se observó una disminución significativa del valor de la tensión superficial.

En los resultados del ensayo en policubeta se observa una situación similar a la descrita anteriormente, las muestras crecidas sobre HC como sustrato muestran una distorsión del grillado de fondo. A diferencia de estas, las muestras cultivadas en AgLag no se diferencian del control (*Figura 14*).

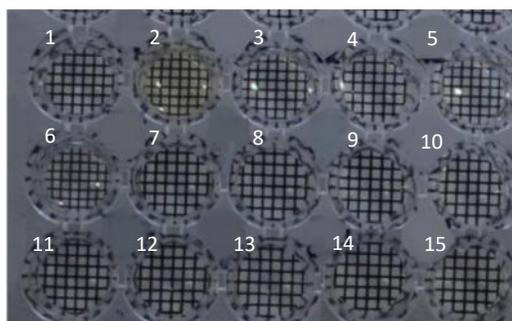


Figura 14: Ensayo en policubeta. Muestras cultivadas con HC: 1-Lg, 2-Mt, 3-Co, 4-Ag, 5-Tk2, 6-Tk1 CC, 7-Tk1 CG. Muestras cultivadas con AgLag: 8-Lg, 9-Mt, 10-Co, 11-Ag, 12-Tk2, 13-Tk1. Agua destilada: 14 y 15.

En el ensayo 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, se analizaron 52 muestras de las que sólo 3 lograron mantener la emulsión formada luego de 24hs. De estas 3, ninguna alcanzó el 50% del parámetro de referencia E_{24} , por lo que se consideró 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^{141,142}. Además, como se mencionó previamente, los biosurfactantes se clasifican en compuestos de bajo (LMW) y alto (HMW) peso molecular, por lo que a partir de la estructura del biosurfactante producido por los microorganismos aislados podría explicarse los resultados observados. Es decir, los compuestos tensioactivos producidos por las colonias aisladas podrían pertenecer al primer grupo, razón por la cual no se estaría observando una buena capacidad emulsificadora del sobrenadante de cultivo.

Sumado a esto, se realizó un test de hemólisis en placas de agar sangre para verificar si los microorganismos aislados poseen actividad hemolítica. El ensayo se llevó a cabo a 25°C y 37°C, y se registró el estado del mismo a las 24 y 48hs. Ninguna de las colonias aisladas exhibió actividad hemolítica significativa al cabo del tiempo que duró el proceso. Si bien este método se utiliza para la búsqueda e identificación de microorganismos productores de biosurfactantes, se ha reportado que posee poca especificidad y que puede dar como resultado falsos positivos y negativos^{130,142}, debido a la acción de enzimas líticas que pueden dar lugar a la formación de halos alrededor de las colonias. Además, hay biosurfactantes que directamente no poseen actividad hemolítica¹⁴³, por lo que los resultados obtenidos aquí se corresponden con los reportados por otros autores.

4.3- Identificación de los microorganismos

A partir de los resultados obtenidos, se llevó a cabo la identificación de los microorganismos aislados. Para ello, se utilizó aquellos aislados a partir de la utilización de HC como fuente de energía ya que representan los más interesantes desde el punto de vista del objetivo del presente trabajo.

4.3.1.- Tinción de Gram

Inicialmente, se llevó a cabo la tinción de Gram de las colonias aisladas para realizar la identificación fenotípica de las mismas. Este procedimiento se realizó con un kit comercial y se

utilizó un microscopio óptico con un objetivo 100x para visualizar los resultados. Estos se pueden observar en la *Tabla 4* y en la *Figura 15*.

Tabla 4: 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 CG</i>	<i>Tk1 HC CC</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 15: Tinción de Gram de la muestra Ag HC vista en un microscopio óptico con un objetivo de 100x.

4.3.2.- Ensayos bioquímicos (API)

Para obtener mayor 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 16* se observan las reacciones colorimétricas (galerías inoculadas) de estos kits para uno de los microorganismos bajo estudio. A partir de estas reacciones, se obtuvieron 3 perfiles numéricos por cada microorganismo, que 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 16: 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 5 y Tabla 6, respectivamente.

Tabla 5: Perfiles numéricos hallados a partir de los kit API de identificación de microorganismos.

Método	Ag HC	Mt HC	Co HC	Tk1 HC CG	Lg HC	Tk1 HC CC
API 20 Strep	0040000/0041	0160000/0160	0160000/4164	4240004/4246	0040000/0041	2040004/2040
API Coryne	000	002	000	017	000	104
API 20 NE	0002000	2010002	4350521	3470721	1000000	3100000
API 20 NE	0047555/0147555	0447724/0467724	0447734/047734	1463600/1473700	1000475/1046775	1040454/3140454

Tabla 6: 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.
	API 20 NE	99,9% identidad respecto de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .
Mt HC	API 20 Strep	63,4% identidad respecto de <i>Gemella haemolysans</i> (24hs de incubación).
	API Coryne	Identificación dudosa, 62% identidad respecto de <i>Arcanobacterium bernardiae</i> .
	API 20 NE	99,8% identidad respecto de <i>Sphingomonas paucimobilis</i> .
Co HC	API 20 Strep	63,1% identidad respecto de <i>Gemella haemolysans</i> (4hs). Perfil inaceptable (24hs).
	API Coryne	Perfil inaceptable.
	API 20 NE	Perfil inaceptable.
Tk 1 HC CG	API 20 Strep	Perfil inaceptable.

	API Coryne	Identificación dudosa, 98,6% identidad respecto de <i>Cellulomonas spp./Microbacterium spp.</i>
	API 20 NE	94,2% (24hs) y 83,1% (48hs) identidad respecto de <i>Sphingomonas paucimobilis</i> .
Lg HC	API 20 Strep	56% (4hs) y 85% (24hs) identidad respecto de <i>Gemella morbillorum</i> .
	API Coryne	Identificación dudosa, 93,8% identidad respecto de <i>Corynebacterium propinquum</i> .
	API 20 NE	Identificación no válida (24hs). 39,2% identidad respecto de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (48hs).
Tk 1 HC CC	API 20 Strep	Identificación dudosa, 54,5% identidad respecto de <i>Aerococcus urinae</i> (24hs).
	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> (24hs). Identidad dudosa, 64,3% identidad respecto de <i>Plesiomonas shigelloides</i> (48hs).

4.3.3.- Identificación genética

Se comparó las secuencias obtenidas de la amplificación del ARNr16s de los microorganismos con bases de datos online. Se obtuvieron secuencias de alrededor de 1400 nucleótidos y se las comparó con 3 bases de datos diferentes. Se encontró que los microorganismos Ag HC, Mt HC, Lg HC y Tk1 HC CG pertenecen al género *Pseudomonas*, y Tk1 HC CC 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 microorganismo en ella.

Según las bases de datos de EZBioCloud y SeqMatch RDP, los resultados obtenidos se observan en la Tabla 7:

Tabla 7: Resultados obtenidos a partir del análisis del ARNr16s de las cepas aisladas

Muestra	Resultado	Grupo al que pertenecería según Mulet y col. ¹⁴⁴
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 CG	100% de identidad respecto de <i>Pseudomonas panipatensis</i> (Esp-1(T)) (EF424401)	<i>P. aeruginosa</i>
Tk 1 HC CC	99,7% de identidad respecto de <i>Cellulosimicrobium funkei</i> (ATCC BAA-886 (T)) (AY501364).	No corresponde

Resulta importante aclarar que los kits API se encuentran diseñados para identificar los microorganismos almacenados en cada una de sus bases de datos, no pueden utilizarse para identificar ni para excluir la presencia de otros microorganismos. Por esta razón, si se comparan los resultados obtenidos a partir de la identificación bioquímica y genética se observan ciertas diferencias.

4.4.- Selección de microorganismos potencialmente productores de biosurfactantes

Con el objetivo de evaluar la influencia de la temperatura y la concentración de la fuente de carbono en la producción de biomasa y de biosurfactante, se procedió a realizar una selección de aquella cepa que haya mostrado ser efectiva en cuanto a la disminución de la tensión superficial en los estudios previos. Para ello se consideraron las siguientes: Co HC, Mt HC y Ag HC. Co HC fue la primera cepa muestra en ser desechada debido a que no pudo ser identificada adecuadamente a partir del análisis del ARN16s. Esta continuó siendo aislada a fin de ser identificada apropiadamente (estos resultados no se muestran en el presente trabajo). De las restantes, se seleccionó Ag HC debido a que cuando se llevó a cabo la identificación, hubo correlación entre los resultados de las tres bases de datos consultadas para la identificación genética, y entre la identificación genética, la bioquímica (API 20 NE) y la tinción de Gram. A diferencia de lo que sucedió con Mt HC, la que fue identificada como perteneciente al género *Pseudomonas* pero no pudo establecerse una correlación entre el resultado obtenido a partir de las tres bases de datos (ítem 4.3.3.- Identificación genética). Además, en la identificación bioquímica, se la identificó como perteneciente a la especie *Sphingomonas paucimobilis*. Por lo que, en base a estas consideraciones, la cepa Ag HC, identificada como *Pseudomonas koreensis* y perteneciente al grupo de *P. fluorescens*, fue seleccionada para los estudios posteriores.

Además, Ag HC fue el microorganismo aislado que mantuvo la misma capacidad de crecimiento y disminución de la tensión superficial luego de 6 meses en criopreservación. Por todo esto, fue seleccionado para los ensayos posteriores. En la *Figura 17* se ven dos imágenes de Ag HC tomadas con un microscopio electrónico de barrido (*SEM*). Dichas imágenes fueron tomadas en el Centro de Microscopías Avanzadas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires.

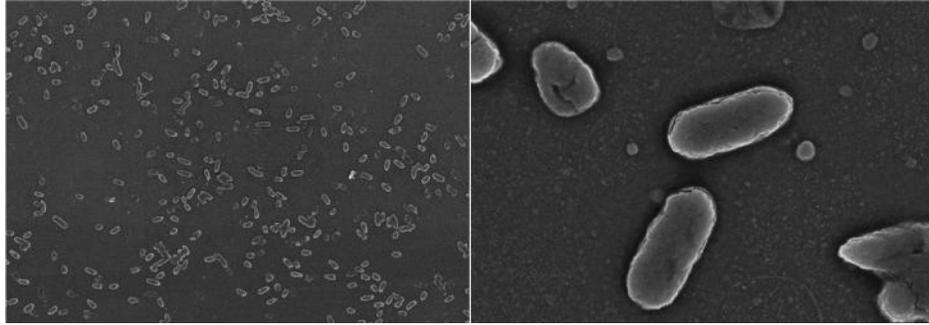


Figura 17: Fotografías tomadas con un microscopio electrónico de barrido (SEM), luego de un tratamiento superficial con oro.

4.5.- 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 antibióticos. Esto nos permitirá, en una primera instancia, obtener información sobre la capacidad metabólica de los mismos y sobre si esta se encuentra relacionada con la capacidad para poder degradar hidrocarburos. Además, en un futuro nos permitirá estudiar la presencia de genes que podrían conferir resistencia a estos compuestos.

A partir de la secuenciación del ARN16s se sabe que Ag HC posee un 99,3% de identidad respecto de *Pseudomonas koreensis*. Se sabe que, en general, el género *Pseudomonas* posee resistencia a los antibióticos beta-lactámicos siendo algunas pocas especies sensibles a los mismos¹⁴⁵. Para evaluar su resistencia, Ag HC se cultivó en medio sólido, en placas de Petri, en presencia de 11 antibióticos distintos. Los resultados fueron obtenidos a partir de la inspección visual de dichas placas y contrastados con valores estandarizados.



Figura 18: Ensayo de resistencia a antibióticos del microorganismo Ag HC. Se observa el halo de inhibición del crecimiento frente a Minociclina, Meropenem, Ciprofloxacina, Imipenem y Piperacilina + Tazobactama.

En la *Figura 18* se observan los resultados obtenidos. Se observó inhibición del crecimiento del microorganismo frente a 5 de los 11 antibióticos ensayados: Minociclina, Meropenem, Ciprofloxacina, Imipenem y Piperacilina + Tazobactama. Frente a los 6 restantes no se observó inhibición del crecimiento. Respecto de los 5 primeros antibióticos, comparando los diámetros experimentales de los halos con los estandarizados en la bibliografía (*Laboratorios Britania S.A.¹⁴⁶, www.eucast.org*), se encontraron los resultados exhibidos en la *Tabla 8*:

Tabla 8: Resultados observados a partir del ensayo de resistencia a antibióticos para el microorganismo *Ag HC*.

Antibiótico	Diámetro Halo Observado (mm)	Diámetro Zona Sensibilidad (mm)	Resultado
Minociclina 30µg	25	19	Sensible
Meropenem 10µg	33	24	Sensible
Ciprofloxacina 5µg	38	25	Sensible
Imipenem 10µg	22	20	Sensible
Piperacilina 100µg	32	18	Sensible
Tazobactam 10µg			

A partir de los resultados se observa que *Ag HC* es sensible a ciertos antibióticos beta-lactámicos (meropenem, imipenem, piperacilina/tazobactam), a minociclina (antibiótico del grupo de las tetraciclinas) y a la ciprofloxacina (perteneciente al grupo de las fluoroquinolona).

4.6- Estimación de la producción de biosurfactantes en diferentes condiciones de cultivo.

Continuando con el estudio acerca de la producción de biosurfactantes por parte de la cepa seleccionada, se tuvieron en cuenta distintas condiciones de cultivo. Los ensayos correspondientes se llevaron a cabo estudios a escala Erlenmeyer de 250ml. Se estimó la producción de biomasa y capacidad de producción de biosurfactantes a partir de un ensayo a tres temperaturas (21°C, 25°C y 29°C) y tres concentraciones de fuente de carbono distintas (2% v/v, 4,5% v/v y 6% v/v). En la *Figura 19* se muestran los cultivos a 29°C luego de 6 días.



Figura 19: Cultivo a 29°C luego de 6 días de cultivo en MSM suplementado con HC. Arriba Izquierda: 2%v/v HC. Arriba Derecha: 4,5%v/v HC. Abajo: 6%v/v HC.

Los resultados del experimento se muestran en la Figura 20, Figura 21, Tabla 9 y Tabla 10.

Tabla 9: Disminución de ST 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

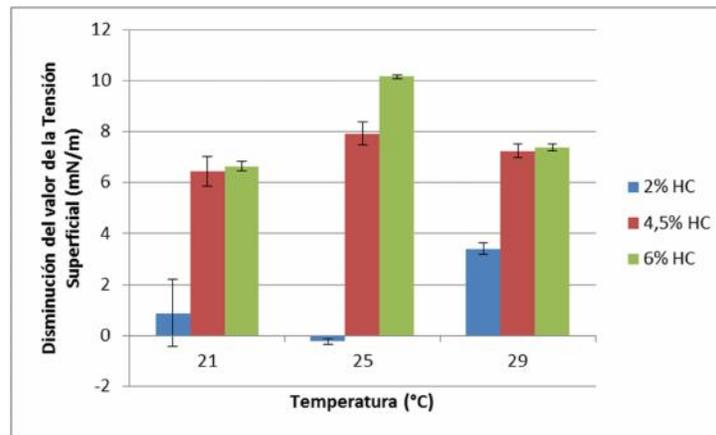


Figura 20: Disminución de ST en función de la temperatura y concentración de HC

En la Figura 20 se puede observar que la mayor disminución en el valor de la tensión superficial sucedió cuando la bacteria se cultivó a 25°C con una concentración 6%v/v de fuente de carbono. En este caso, la disminución en la tensión superficial fue de $48,44\text{mN/m} \pm 0,03\text{mN/m}$ hasta $38,29\text{mN/m} \pm 0,15\text{mN/m}$. Sumado a esto, una correlación entre concentración de fuente de carbono y disminución del valor de la tensión superficial a cada temperatura fue observada. A mayor concentración de HC, mayor disminución de la tensión

superficial. Esto puede ser atribuido a dos factores: por un lado, se sabe que los hidrocarburos afectan la tensión superficial del agua (solvente del MSM), haciendo que esta propiedad disminuya su valor, por lo que podría suceder que a mayor concentración de hidrocarburos, su impacto en la tensión superficial sea mayor; por otro, respecto de la producción de biosurfactantes, se podría plantear que el microorganismo requiera mayor cantidad de este tipo de compuesto cuanto mayor disponibilidad de fuente de carbono insoluble posee.

En la *Figura 21*, 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 10: 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

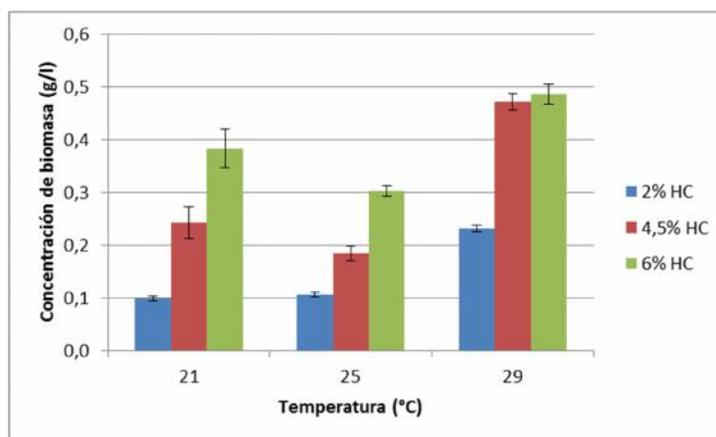


Figura 21: Concentración de biomasa (PS) en función de la temperatura y concentración de HC

Aquí se observa que la mayor producción de biomasa se obtiene cuando la bacteria se cultiva a 29°C con una concentración de HC del 6%v/v. En esta situación se obtuvo una concentración de microorganismo de 0,4858g/l \pm 0,0082g/l. Nuevamente, se observa un perfil creciente de concentración de biomasa respecto de la concentración de fuente de carbono a cada temperatura ensayada. En este caso, podría plantearse que, de todas las especies en el medio de cultivo, el HC constituye el factor limitante del crecimiento.

Sumado a esto, en el ensayo descrito en el ítem 3.5.2.2 (ensayo de distorsión en policubeta), que se basa en la distorsión óptica producida por un biosurfactante en solución

acuosa, se observó que a cada temperatura ensayada, a mayor concentración de fuente de carbono, mayor es la distorsión óptica producida por el sobrenadante de cultivo libre de células (*Figura 22*). Esto guarda relación con los resultados que se muestran en la *Figura 20*.

En cuanto al pH de los cultivos, se observó una tendencia similar a la que se vio en la *Figura 20* y la *Figura 21*. 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, a cada una de las temperaturas estudiadas. El perfil de pH en función de la temperatura y concentración de HC se muestra en la *Figura 23*.

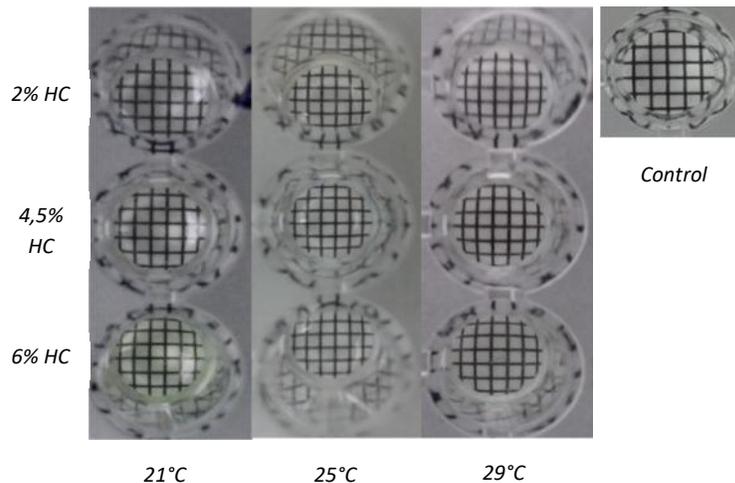


Figura 22: Ensayo en policubeta del sobrenadante de cultivo

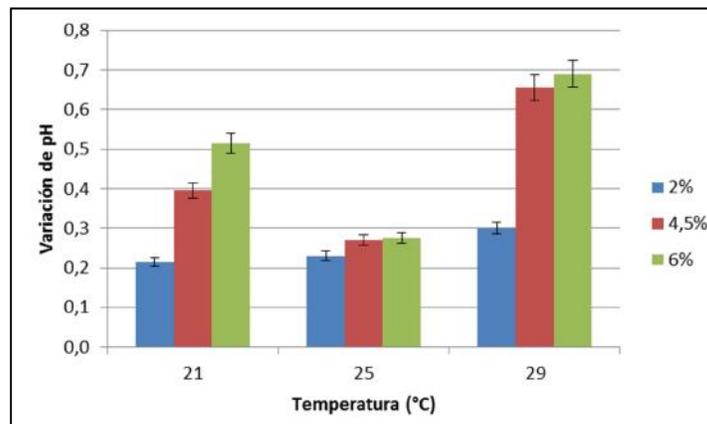


Figura 23: Variación en el valor de pH del cultivo en función de la temperatura y concentración de HC.

4.7- Ensayo en Biorreactor

A partir de los resultados anteriores, 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 mejor condición para la producción de biosurfactantes, y se la evaluó en un biorreactor de tanque agitado. Las condiciones ensayadas fueron: 6% v/v HC como fuente de carbono y 25°C de temperatura. El biorreactor utilizado fue un reactor de tipo tanque agitado discontinuo con una camisa calefactora y sistema de agitación mecánica con dos turbinas de tipo Rushton. En cuanto al sistema de aireación del mismo, posee un aireador de sección circular por debajo del sistema de agitación, lo que permite que las burbujas de aire sean divididas, aumentando el área superficial y mejorando la transferencia de oxígeno. Dicho sistema se muestra en la *Figura 24*.



Figura 24: 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 25*):

- 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.

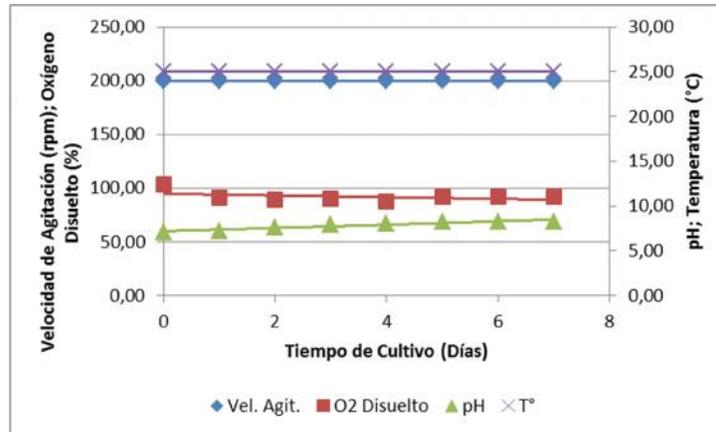


Figura 25: Variables de proceso en el cultivo en biorreactor. Velocidad de agitación (rpm), pH, Temperatura (°C) y Oxígeno disuelto (%).

Para la determinación del crecimiento del microorganismo (PS) y su producción de biosurfactante (ST) se tomaron muestras diarias. Sumado a esto, con el objetivo de evaluar la eficiencia del sistema respecto de la transferencia de materia, se midió el coeficiente global de transferencia de oxígeno (K_La) del sistema. Esto se llevó a cabo a través del método dinámico de estimación del K_La . El valor calculado fue $0,0085s^{-1}$. Este valor concuerda con lo reportado por Özbek y col¹⁴⁷. para un sistema de cultivo de similares características. En la Figura 26 se muestra la variación de oxígeno disuelto durante el ensayo.

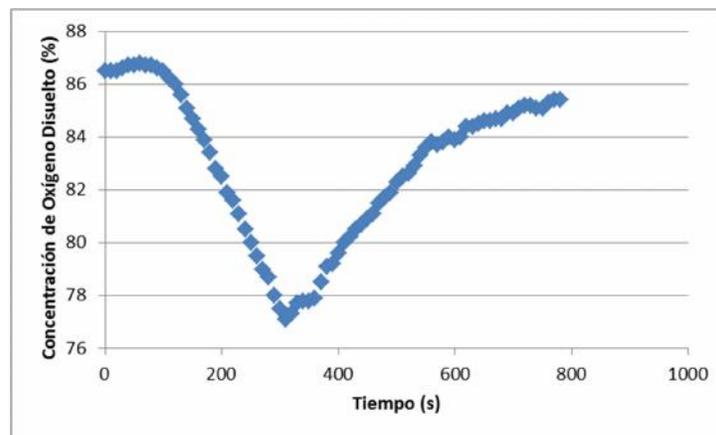


Figura 26: Concentración de oxígeno disuelto durante la medición del K_La .

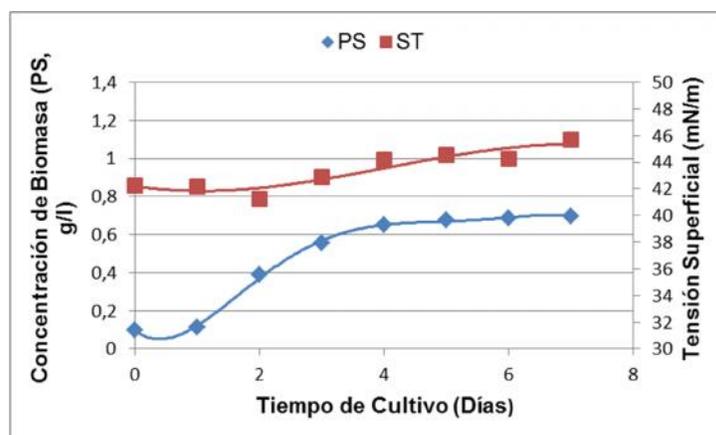


Figura 27: Tensión superficial del sobrenadante de cultivo y concentración de biomasa en función del tiempo de cultivo.

En la *Figura 27* se observa la concentración de biomasa y el valor de la tensión superficial del sobrenadante de cultivo en función del tiempo. Respecto de la primera variable, se observó un perfil de crecimiento típico de un cultivo en batch, con cada una de sus etapas. Se observó una pequeña fase lag, cuya duración aproximada fue de 1 día, 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 final obtenida fue de 0,698g/l. Con respecto al valor de la tensión superficial del sobrenadante de cultivo, se observó una disminución durante los primeros días, desde 42,23mN/m \pm 0,03mN/m hasta 41,25mN/m \pm 0,11mN/m el día 2. Luego, se observó un aumento progresivo hasta un valor final de 45,71mN/m \pm 0,08mN/m, mayor al inicial y al del control.

Esta situación podría deberse a que el sistema de agitación produce la ruptura de las gotas de hidrocarburo, maximizando su área superficial y haciéndolo así más biodisponible para el microorganismo. Otra posibilidad sería que el microorganismo se haya adaptado al sustrato utilizado o que, debido al estrés producido por alguna característica del sistema (esfuerzos de corte por ejemplo), se inhiba la producción del tensioactivo.

4.8.- Utilización de glucosa y glicerol para evaluar la producción de biosurfactantes

Debido a los resultados previamente obtenidos, una estrategia empleada para continuar evaluando la producción de tensioactivos fue llevar a cabo un cultivo del microorganismo *Ag HC* en dos etapas: primeramente, una etapa de crecimiento en una fuente de carbono de asimilación rápida (glucosa o glicerol) para un crecimiento rápido. Luego, en una segunda etapa, se transfirió dicha biomasa a un medio con HC como única fuente de carbono y energía para inducir la producción de biosurfactantes. El ensayo completo se

condujo por 6 días (1^{ra} etapa: 2 días; 2^{da} etapa: 4 días) a 25°C y 135rpm. Los resultados obtenidos en la primera etapa se observan en la *Tabla 11* y la *Figura 28*.

Tabla 11: Resultados de la 1^{ra} etapa de cultivo.

Fuente de Carbono	Glucosa			Glicerol		
Tiempo Cultivo (h)	0	24	48	0	24	48
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

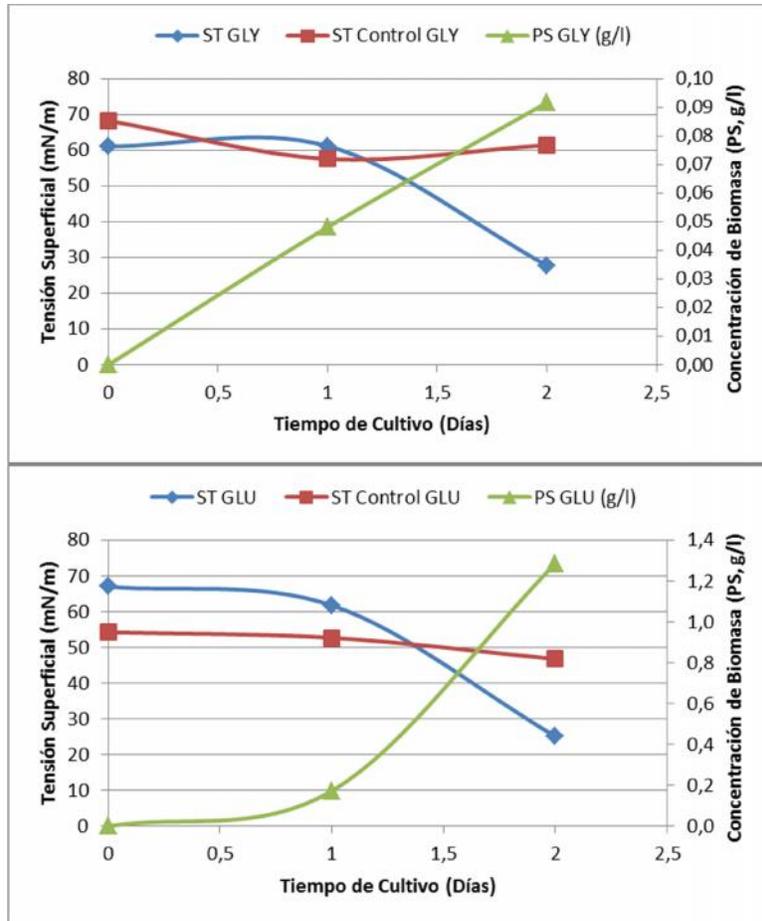


Figura 28: Resultados de la 1^{ra} etapa del cultivo. Se observa concentración de biomasa y ST del cultivo y control vs. tiempo de cultivo. Fuentes de carbono utilizadas: Arriba, glucosa; Abajo, glicerol.

En primer lugar, se observó la capacidad del microorganismo para crecer en ambas fuentes de carbono. Cuando se utilizó glucosa, la bacteria alcanzó a las 48hs una concentración

de 1,29g/l \pm 0,06g/l, 3 veces mayor a la obtenida con HC y en un tercio del tiempo de cultivo. Además, en ninguno de los dos casos se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento, lo que sugiere que se podría continuar con el cultivo si se quisiera alcanzar una concentración de biomasa mayor, o se podría utilizar menor concentración de sustrato con el objetivo de reducir costos de proceso.

Por otro lado, se observa una disminución significativa en el valor de la tensión superficial del sobrenadante de cultivo entre el día 1 y 2 respecto del control, para cada uno de los sustratos. A las 48hs de cultivo se obtuvieron valores de tensión superficial de 25,10mN/m \pm 0,54mN/m y 27,84mN/m \pm 0,39mN/m para el cultivo con glucosa y glicerol respectivamente. Esto representa una disminución del 46,3% y 54,7% respecto de cada uno de los controles. Además, resulta una mejora sustancial respecto de los cultivos en los que se utilizó HC como fuente de carbono. Estos resultados son comparables a aquellos publicados en *Cooper y Goldenberg, 1987*⁷⁰ y *Silva et al., 2010*¹⁴⁸

Con respecto a la segunda etapa de cultivo, los resultados obtenidos se observan en la *Tabla 12* y en la *Figura 29*.

Tabla 12: Resultados de la 2^{da} etapa de cultivo.

Fuente de Carbono	Glucosa - HC				Glicerol - HC			
	0	24	48	72	0	24	48	72
Tiempo de Cultivo (h)								
CDW (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

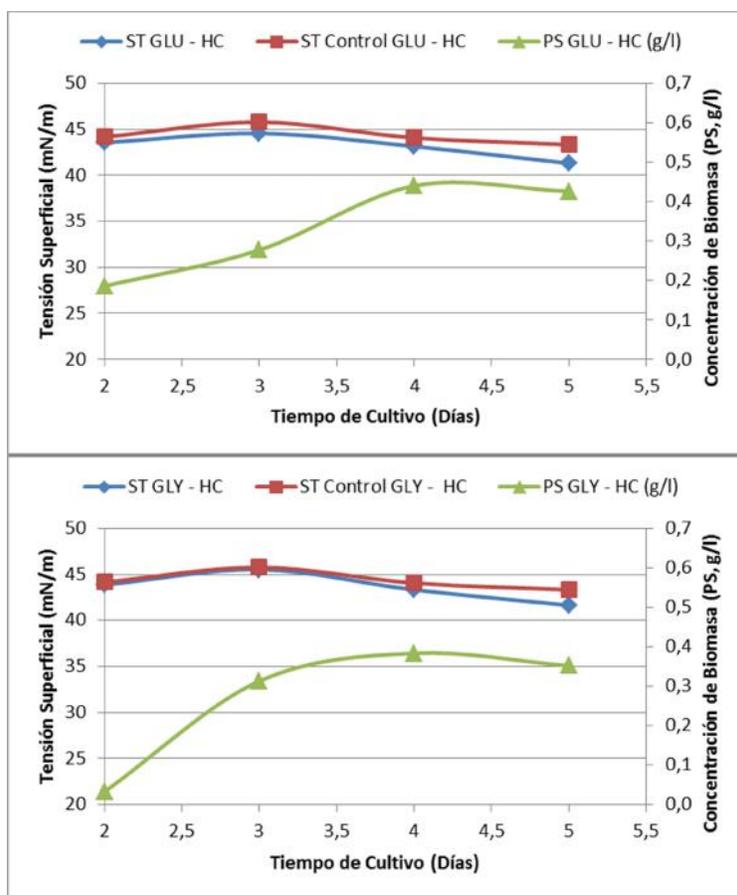


Figura 29: Resultados de la 2^{da} etapa del cultivo. Se observa la concentración de biomasa y ST del cultivo y del control vs. tiempo de cultivo. Fuentes de carbono utilizadas: Arriba, glucosa y luego HC; Abajo, glicerol y luego HC.

En primer lugar, se observó crecimiento del microorganismo luego de haberlo transferido a MSM suplementado con HC. Se lograron concentraciones de biomasa de $0,43\text{g/l} \pm 0,07\text{g/l}$ y $0,35\text{g/l} \pm 0,06\text{g/l}$ en los casos en que se cultivó el microorganismo en la primera etapa con glucosa y glicerol respectivamente. Estos resultados muestran un aumento en la concentración de biomasa respecto de la obtenida para el cultivo en las mismas condiciones suplementado desde el comienzo con HC.

En cuanto al valor de la tensión superficial del sobrenadante de cultivo, se observó que el cultivo mantuvo el valor de ST cercano al del control durante todo el experimento. Recién entre el día 4 y 5 de cultivo (2 y 3 de esta segunda etapa) se observó una pequeña disminución en el valor de esta magnitud, alcanzando valores de $41,29\text{mN/m} \pm 0,61\text{mN/m}$ y $41,65\text{mN/m} \pm 0,90\text{mN/m}$ (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 ST obtenida resultó despreciable frente a la esperada. Esto podría sugerir que el microorganismo no se encuentra

produciendo biosurfactantes cuando se lo cultiva con HC, posiblemente debido a su acostumbramiento a dicha fuente de carbono.

4.9.- Separación y Purificación del Biosurfactante

De acuerdo a los resultados obtenidos, tanto la glucosa como el glicerol podrían ser sustratos adecuados para llevar adelante la producción de biosurfactantes, ya que mostraron valores de ST bastante menores que aquellos obtenidos para el cultivo con HC. Por otro lado, una de las razones por las que a la fecha no se dispone comercialmente de una amplia variedad de biosurfactantes son los costos de producción¹⁴⁹. Entre ellos, el costo del sustrato es uno de los más importantes. En este sentido, se plantea la posibilidad de utilizar glicerol como sustrato. Ya que 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.

Se llevó a cabo una serie de experimentos para lograr la purificación del biosurfactante producido por Ag HC. Para esto se utilizaron Erlenmeyers de 250ml con MSM suplementado con 3% de glicerol como única fuente de carbono y energía, que fueron cultivados por 4 días a 25°C y 135rpm. Para evaluar el desarrollo del cultivo se tomaron muestras diarias a las que se les evaluó el PS, DO, pH y ST. Sumado a esto, a la muestra del día de la cosecha se le estimó la producción de biosurfactantes a partir de la precipitación ácida del mismo.

Se observó un crecimiento sostenido del microorganismo en MSM suplementado con glicerol desde el día cero al día de cosecha, alcanzándose una concentración de 0,77g/l \pm 0,12g/l a las 96h. En la *Figura 30* se observa el perfil de concentración del microorganismo en función del tiempo. Si graficamos 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, la pendiente de dicha recta es la velocidad específica de crecimiento del microorganismo (μ). En este caso, la velocidad específica de crecimiento arrojó un resultado de:

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

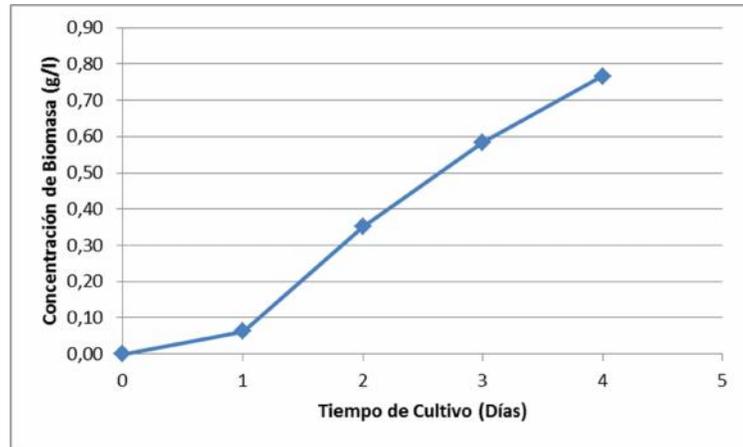


Figura 30: Perfil de concentración de biomasa en función del tiempo.

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. Resulta importante destacar que la mayor disminución en este valor se observa entre el comienzo y las 48h de cultivo, por lo que se podría decir que entre las 24h y 48h de cultivo se estaría alcanzando la concentración micelar crítica (CMC) del biosurfactante. El perfil de ST en función del tiempo se observa en la *Figura 31*. Respecto del control, el valor alcanzado el día de cosecha representa una disminución del 57,89%.

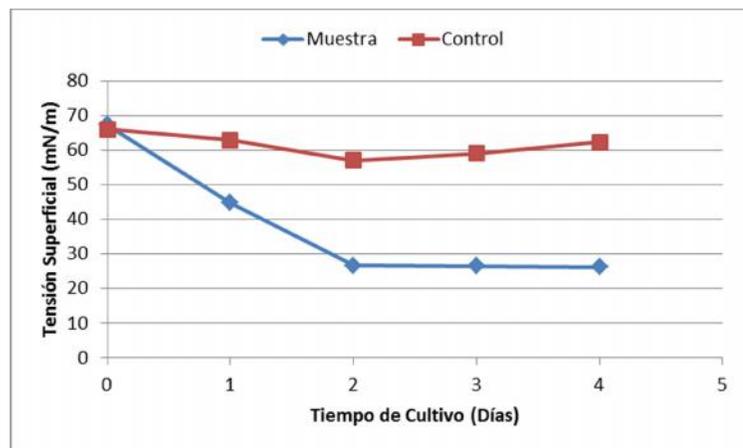


Figura 31: Perfil de tensiones superficiales en función del tiempo.

Sumado a esto, el día de cosecha se llevó a cabo una estrategia de doble precipitación ácida con una solución de HCl, con el objetivo de separar y purificar el biosurfactante producido. A partir de esto, se pudo obtener una concentración máxima de biosurfactante de 0,11g/l y un rendimiento de producto en función de la biomasa (Y_{PX}) de $0,09\text{g/l} \pm 0,02\text{g/l}$.

Por último, se sometió al precipitado obtenido a un proceso de diluciones seriadas en agua destilada con el objetivo de evaluar la concentración micelar crítica (CMC) del mismo. A cada una de estas diluciones se le determinó el valor de la tensión superficial, información que se observa en la *Figura 32*. 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 la pendiente, corresponde al valor de la CMC. Esto es, la mínima concentración a partir de la cual las moléculas de biosurfactante se agregan formando micelas.

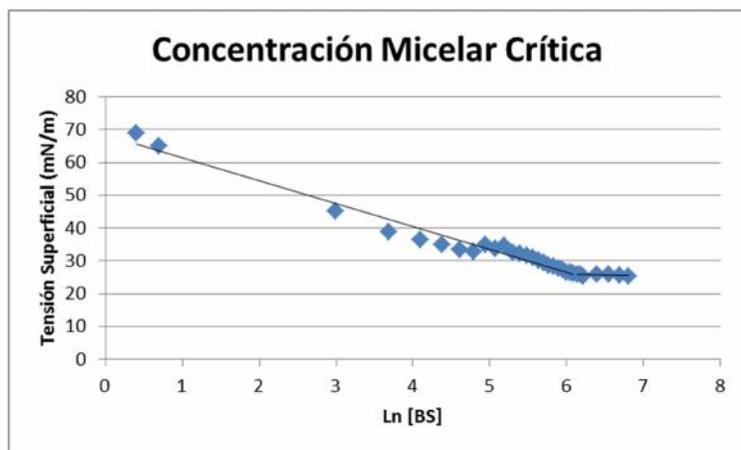


Figura 32: Perfil de tensión superficial en función de la concentración de biosurfactante para la obtención del valor de CMC del microorganismo.

A partir de la *Figura 32*, se obtuvo un valor para la CMC del compuesto producido por Ag HC de 452,21mg/l. Cuando esto sucede, la tensión superficial del medio toma un valor de $26,05\text{mN/m} \pm 0,05\text{mN/m}$. Este valor es comparable al obtenido por *Hultberg et al. 2010*¹⁵⁰ para el biosurfactante producido por *P. koreensis*.

CONCLUSIONES

5.- Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

- Fue posible el aislamiento de cepas de microorganismos autóctonos de los predios de la empresa RHASA, en la ciudad de Campana, Provincia de Buenos Aires. Estos demostraron tener capacidad para degradar hidrocarburos como única fuente de carbono y energía a partir de muestras de suelo y agua crónicamente contaminadas con hidrocarburos
- *Pseudomonas koreensis* resultó ser efectiva en cuanto a su capacidad para disminuir la tensión superficial cuando fue cultivada utilizando fuentes de carbono de fácil asimilación, alcanzando valores de 46,3% y 54,7% comparado a cada uno de los controles, cuando las fuentes de carbono fueron glucosa y glicerol respectivamente.
- Se separó el compuesto tensioactivo de los medios de cultivos a partir de precipitación ácida con HCl, para la determinación de la Concentración Micelar Crítica en los cultivos. Ésta técnica que requiere de pocos insumos y es de fácil aplicación obteniéndose un buen rendimiento del biosurfactante purificado con un valor de 452,21mg/l.
- *Pseudomonas koreensis*, aislada de suelos crónicamente contaminados de las áreas pertenecientes a la Refinería de RHASA es un agente biológico que permite la obtención de biosurfactantes cuando se cultiva en sustratos de bajo costo (glicerol) con valores obtenidos comparables a los reportados a la literatura.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Diccionario de la Real Academia Española. <http://dle.rae.es/>
- 2.- <http://energiasdemipais.educ.ar/>
- 3.- **BP Global**. *Statistical Review of World Energy 2015*.
- 4.- www.treia.org.
- 5.- <http://www.power-technology.com/>
- 6.- **Arroyo, M.** *Nuevas Fuentes de Energía para un Futuro Sostenible: ¿Petróleo Caro o Protección del Medio?* X Coloquio Internacional de Geocrítica. Barcelona, 2008.
- 7.- **Organization of the Petroleum Exporting Countries (OPEC)**. *Annual Statistical Bulletin*, 2016.
- 8.- **Organization of the Petroleum Exporting Countries (OPEC)**. *Monthly Oil Market Report*, March 14th, 2016.
- 9.- www.24hgold.com.
- 10.- **International Renewable Energy Agency (IRENA)**. *Renewable power generation costs in 2014*.
- 11.- **Banco Interamericano de Desarrollo**. http://blogs.iadb.org/energia_es/2015/09/29/la-caida-de-precios-de-petroleo-un-reves-o-una-bendicion-para-las-renovables/
- 12.- **U.S. Energy Information Administration (EIA)**. *Oil: Crude and Petroleum Products, 2015*. www.eia.gov.
- 13.- **Hazardous Substance Research Center**. *Environmental Impacts of the Petroleum Industry*. Environmental Update N°12. 2003.
- 14.- <http://www.greenpeace.org>
- 15.- **International Tanker Owners Pollution Federation (ITOPF)**. *Effects of Oil Pollution on the Marine Environment*. Technical Information Paper N°13. 2014.
- 16.- **Department of the Environment and Energy, Australian Government**. *Greenhouse Effect*. www.environment.gov.au.
- 17.- <http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpspan.pdf>
- 18.- **Velasco, G.** *Posibles Causas del Accidente de la Plataforma Deepwater Horizon*. Petrotecnia, diciembre de 2010.

-
- 19.- **Shigenaka, G.** 2014. *Twenty-Five Years After the Exxon Valdez Oil Spill: NOAA's Scientific Support, Monitoring, and Research*. Seattle: NOAA Office of Response and Restoration. 78 pp.
- 20.- **Riser-Roberts, E.** *Remediation of Petroleum-Contaminated Soils: Biological, Physical and Chemical Processes*. Lewis Publishers, 1998.
- 21.- **Volke Sepúlveda, T. y Velasco, J. A.** *Tecnologías de Remediación para Suelos Contaminados*. Instituto Nacional de Ecología – México.
- 22.- **DOD Environmental Technology Transfer Committee.** *Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide*. 2nd Ed. 1994.
- 23.- **Alves Soares, A., Albergaría, J., Fernandes Domingues, V., Alvim-Ferraz, M., Delerue-Matos, C.** *Remediation of Soils Combining Soil Vapor Extraction and Bioremediation: Benzene*. Chemosphere, 2010. 80: 823-828.
- 24.- **Gomes, H., Dias-Ferreira, C., Ribeiro, A.** *Electrokinetic Remediation of Organochlorines in Soil: Enhancement Techniques and Integration with Other Remediation Technologies*. Chemosphere, 2012. 87: 1077-1090.
- 25.- **Carberry, J. and Wik, J.** *Comparison of Ex Situ and In Situ Bioremediation of Unsaturated Soils Contaminated by Petroleum*. Journal of Environmental Science and Health A, 2001. 36(8): 1491-1503.
- 26.- **Mulligan, C., Yong, R., Gibbs, B.** *Remediation Technologies for Metal-Contaminated Soils and Groundwater: an Evaluation*. Engineering Geology, 2001. 60: 193-207.
- 27.- **Kasai, E., Harjanto, S., Terui, T., Nakamura, T., Waseda, Y.** *Thermal Remediation of PCDD/Fs Contaminated Soil by Zone Combustion Process*. Chemosphere, 2000. 41: 857-864.
- 28.- **Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., Naidu, R.** *Bioremediation Approaches For Organic Pollutants: A Critical Perspective*. Environment International, 2011. 37: 1362-1375.
- 29.- **Kosaric N, Vardar Sukan F.** *Biosurfactants: Production and Utilization - Processes, Technologies and Economics*. CRC Press, 2014.
- 30.- **Guo, H., Luo, S., Chen, L., Xiao, X., Xi, Q., Wei, W., Zeng, G., Liu, C., Wan, Y., Chen, J., He, Y.** *Bioremediation of Heavy Metals by Growing Hyperaccumulaor Endophytic Bacterium Bacillus sp. L14*. Bioresource Technology, 2010. 101: 8599-8605.

-
- 31.- **Cycon, M., Wójcik, M., Piotrowska-Seget, Z.** *Biodegradation of the Organophosphorus Insecticide Diazinon by *Serratia* sp. And *Pseudomonas* sp. And Their Use in Bioremediation of Contaminated Soil.* Chemosphere, 2009. 76: 949-501.
- 32.- **Snellinx, Z., Nepovim, A., Taghavi, S., Vangronsveld, J., Vanek, T., van der Lelie, D.** *Biological Remediation of Explosives and Related Nitroaromatic Compounds.* Environmental Science and Pollution Research, 2002. 9(1): 48-61.
- 33.- **Geetha, M., Fulekar, M.** *Bioremediation of Pesticides in Surface Soil Treatment Unit Using Microbial Consortia.* African Journal of Environmental Science and Technology, 2008. 2(2): 36-45.
- 34.- **Bento, F., Camargo, F., Okeke, B., Frankenberger, W.** *Comparative Bioremediation of Soils Contaminated With Diesel Oil by Natural Attenuation, Biostimulation and Bioaugmentation.* Bioresource Technology, 2005. 96: 1049-1055.
- 35.- **Liebeg, E., Cutright, T.** *The Investigation of Enhanced Bioremediation Through the Addition of Macro and Micro Nutrients in a PAH Contaminated Soil.* International Biodeterioration & Biodegradation, 1999. 44: 55-64.
- 36.- **Ronald Crawford.** *Bioremediation. Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation.* 1999.
- 37.- **Hamdi, H., Benzarti, S., Manusadzianas, L., Aoyama, I., Jedidi, N.** *Bioaugmentation and Biostimulation Effects on PAH Dissipation and Soil Ecotoxicity Under Controlled Conditions.* Soil Biology and Biochemistry, 2007. 39: 1926-1935.
- 38.- **Boopathy, R.** *Factors Limiting Bioremediation Technologies.* Bioresource Technology, 2000. 74: 63-67.
- 39.- **Das, K., Mukherjee, A.** *Crude Petroleum-Oil Biodegradation Efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated From a Petroleum-Oil Contaminated Soil From North-East India.* Bioresource Technology, 2007. 98: 1339-1345.
- 40.- **Bach, Q., Kim, S., Choi, S., Oh, Y.** *Enhancing the Intrinsic Bioremediation of PAH-Contaminated Anoxic Estuarine Sediments With Biostimulating Agents.* The Journal of Microbiology, 2005. Vol.43, No. 4, p. 319-324.
- 41.- **Straube, W., Nestler, C., Hnasen, L., Ringleberg, D., Pritchard, P., Jones-Meehan, J.** *Remediation of Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs) Through Landfarming with Biostimulation and Bioaugmentation.* Acta Biotechnologica, 2003. 23: 179-196.

-
- 42.- **Adams, G., Fufeyin, P., Okoro, S., Ehinomen, I.** *Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review*. International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation, 2015. Vol. 3, No. 1, p. 28-39.
- 43.- **Whang, L., Liu, P., Ma, C., Cheng, S.** *Application of Biosurfactants, Rhamnolipid and Surfactin, for Enhanced Biodegradation of Diesel-Contaminated Water and Soil*. Journal of Hazardous Materials, 2008. 151: 155-163.
- 44.- **Aparna, A., Srinikethan, G., Hedge, S.** *Effect of Addition of Biosurfactant Produced by Pseudomonas sps. on Biodegradation of Crude Oil*. In: 2nd International Proceedings of Chemical, Biological & Environmental Engineering, 2011. vol. 6IACSIT Press, Singapore, pp. 71-75.
- 45.- **Jones W. R.** *Biosurfactants, Bioavailability And Bioremediation*. Global Environmental Technology, 1997. pp. 379-391.
- 46.- **Nitschke, M., Costa, S., Haddad, R., Gonçalves, L., Eberlin, M., Contiero, J.** *Oil Wastes as Unconventional Substrates for Rhamnolipid Biosurfactant Production by Pseudomonas aeruginosa LBI*. Biotechnology Progress, 2005. 21: 1562-1566.
- 47.- **George, S., Jayachandran, K.** *Production and Characterization of Rhamnolipid Biosurfactant From Waste Frying Coconuy Oil Using a Novel Pseudomonas aeruginosa D*. Journal of Applied Microbiology, 2012. 114: 373-383.
- 48.- **Guerra de Oliveira, J., García-Cruz, H.** *Properties of a Biosurfactant Produced by Bacillus pumilus Using Vinasse and Waste Frying Oil as Alternative Carbon Sources*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2013. Vol.56, N°1: p. 155-160.
- 49.- **Lima de França Í, Lima A, Monteiro Lemos J, Farias Lemos C, Maciel Melo V, Batista de Sant'ana, Rocha Barros Gonçalves.** *Production Of A Biosurfactant By Bacillus subtilis ICA56 Aiming Bioremediation Of Impacted Soils*. Catalysis Today, 2015. 255: 10-15.
- 50.- **Bodour A, Guerrero-Barajas C, Jiorle B, Malcomson M, Paull A, Simogyi A, Trinh L, Bates R, Maier R.** *Structure And Characterization Of Flavolipids, A Novel Class Of Biosurfactants Produced By Flavobacterium Sp. Strain MTN11*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. 70: 114–120.
- 51.- **Kosaric N.** *Biosurfactants And Their Application For Soil Bioremediation*. Food Technology and Biotechnology, 2001. 39(4): 295–304.
- 52.- **Van Haesendonck I, Vanzeveren E.** *Rhamnolipids In Bakery Products*. W.O. 2004/040984, International application patent (PCT).

-
- 53.- **Abalos A, Vinas M, Sabate J et al.** *Enhanced Biodegradation Of Casablanca Crude Oil By A Microbial Consortium In Presence Of A Rhamnolipid Produced By Pseudomonas aeruginosa AT10.* Biodegradation, 2004; 15: 249-260.
- 54.- **Mata-Sandoval JC, Karns J, Torrents A.** *Effect Of Rhamnolipids Produced By Pseudomonas aeruginosa UG2 On The Solubilization Of Pesticides.* Environmental Science & Technology, 2000. 34: 4923-4930.
- 55.- **Mata-Sandoval J, Karns J, Torrents A.** *Influence Of Rhamnolipids And Triton X-100 On The Biodegradation Of Three Pesticides In Aqueous Phase And Soil Slurries.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. 49: 3296-3303.
- 56.- **Harvey S, Elashvili I, Valdes J, Kamely D, Chakrabaty A.** *Enhanced Removal of Exxon Valdez Spilled Oil from Alaskan Gravel by a Microbial Surfactant.* Nature Publishing Group, 1900. Vol. 8, p. 228-230.
- 57.- **Olivera N, Nieves M.** *Biosurfactants And Their Uses In The Petroleum Industry And Hydrocarbon Pollution Remediation.* Detergents: Types, components and uses. Nova Sciences Publishers, Inc. 2009.
- 59.- **Roseberg E, Ron E.** *High- And Low-Molecular-Mass Microbial Surfactants.* Applied Microbiology and Biotechnology, 1999. 52: 154-162.
- 59.- **Dhanarajan G, Sen R.** *Amphiphilic Molecules Of Microbial Origin: Classification, Characteristics, Genetic Regulations And Pathways For Biosynthesis.* Biosurfactants: Research trends and applications, 2014. CRC Press.
- 60.- **Hausmann R, Sylđatk C.** *Types And Classification Of Microbial Surfactants.* Biosurfactants. Production And Utilization: Processes, Technologies, And Economics, 2015. CRC Press.
- 61.- **Ahmad, Z., Crowley, D., Arshad, M., Imran, M.** *Biosurfactants and Bioemulsifiers for Treatment of Industrial Wastes.* Advances in Biodegradation and Bioremediation of Industrial Waste, Cap. 5. Ed. CRC Press, 2015.
- 62.- **Gautam K, Tyagi V.** *Microbial Surfactants: A Review.* Journal of Oleo Science, 2006. Vol. 55, No. 4, p. 155-166.
- 63.- **Maier R, Soberón-Chávez G.** *Pseudomonas aeruginosa Rhamnolipids: Biosynthesis And Potential Applications.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2000. 54(5): 625-633.
- 64.- **Lang, S.** *Biological Amphiphiles (Microbial Biosurfactants).* Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2002. Vol. 7 No. 1-2, pp 12-20.

-
- 65.- **Mulligan, C. N.** *Recent Advances In The Environmental Applications Of Biosurfactants*. Current Opinion in Colloid and Interfacial Science, 2009. 14: 372–378.
- 66.- **Desai J, Banat I.** *Microbial Production Of Surfactants And Their Commercial Potential*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997. Vol.61, No.1, pp 47-64.
- 67.- **Morya V, Kim E-K.** *Sphorolipids: Characteristics, Production And Applications*. Biosurfactants: Research Trends And Applications, 2014. CRC Press.
- 68.- **Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Smyth T, Banat I.** *Production And Applications Of Trehalose Lipid Biosurfactants*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2010. 112: 617–627.
- 69.- **Kuyukina M, Ivshina I.** *Application Of Rhodococcus In Bioremediation Of Contaminated Environments*. Biology of Rhodococcus, Microbiology Monographs, Springer, 2010. 16: 231–262.
- 70.- **Cooper D, Goldenberg B.** *Surface Active Agents From Two Bacilus Species*. Applied and Environmental Microbiology, 1987. Vol. 53 No.2, pp 224-229.
- 71.- **Baltz R, Miao V, Wrigley S.** *Natural Products To Drugs: Daptomycin And Related Lipopeptide Antibiotics*. Natural Product Report, 2005. 22(6): 717-741.
- 72.- **Mulligan C.** *Characterization, Production And Applications Of Lipopeptides*. Biosurfactants: research trends and applications, 2014. CRC Press.
- 73.- **Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G., Uad, I., Gonzalez-Lopez, J.** *Application of Bioemulsifiers in Soil Oil Bioremediation Processes*. Future Prospects. Science of the Total Environment, 2009. 407: 3634-3640.
- 74.- **Kirk & Othmer.** *Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley and Sons, Inc. 1^{ra} ed. 1998.
- 75.- **Kingston, P.** *Long-Term Environmental Impact of Oil Spills*. Spill Science Technology Bulletin, 2002. 7: 53-61.
- 76.- **Desay, A., Vyas, P.** *Petroleum and Hydrocarbon Microbiology*. University of Baroda, 2006.
- 77.- **Johnsen, A., Wick, L., Harms, H.** *Principles of Microbial PAH-Degradation in Soil*. Environmental Pollution, 2005. 133:71-84.
- 78.- **Kumar, M., Leon, V., De Sisto Materano, A., Ilzins, O., Galindo-Castro, I., Fuenmayor, S.** *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by Biosurfactant-Producing Pseudomonas sp. IR1*. Z. Naturforsch., 2006. 61c: 203-212.
-

-
- 79.- **Samanta, S., Chakraborti, A., Jain, R.** *Degradation Of Phenanthrene By Different Bacteria: Evidence For Novel Transformation Sequences Involving The Formation Of 1-Naphthol*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999. 53(1): 98-107.
- 80.- **Uyttebroek, M., Ortega-Calvo, J., Breugelmans, P., Springael, D.** *Comparison of mineralization of solid-sorbed phenanthrene by polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Mycobacterium* spp. and *Sphingomonas* spp.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2006. 72(4): 829-836.
- 81.- **Zhang, X., Cheng, S., Zhu, C., Sun, S.** *Microbial PAH-Degradation in Soil: Degradation Pathways and Contributing Factors*. Pedosphere, 2006. 16(5): 555-565.
- 82.- **Kanally, R., Harayama, S.** *Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria*. Journal of Bacteriology, 2000. Vol. 182 No.8, p. 2059-2067.
- 83.- **Freeman, D., Cattell, F.** *Woodburning as a Source of Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Environmental Science and Technology, 1990. 24: 1581-1585.
- 84.- **Aitken, M., Stringfellow, W., Nagel, R., Kazunga, C., Chen, S.** *Characteristics of Phenanthrene-Degrading Bacteria Isolated from Soils Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Canadian Journal of Microbiology, 1998. 44(8): 743-752.
- 85.- **Rehmann, K., Noll, H., Steiberg, C., Kettrup, A.** *Pyrene Degradation by *Mycobacterium* sp. Strain KR2*. Chemosphere, 1998. 36 (14): 2977-2992.
- 86.- **Pothuluri, J., Heflich, R., Fu, P., Cerniglia, C.** *Fungal Metabolism and Detoxification of Fluoranthene*. Applied Environmental Microbiology, 1992. 58: 937-941.
- 87.- **Ye, J-S., Yin, H., Qiang, J., Peng, H., Qin, H-M., Zhang, N., He, B-Y.** *Biodegradation of Anthracene by *Aspergillus fumigatus**. Journal of Hazardous Materials, 2011. Vol. 185 No.1, p. 174-181.
- 88.- **García-Rivero, M., Peralta-Pérez, M.** *Cometabolismo en la Biodegradación de Hidrocarburos*. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 2008. Vol. 7, No., p. 1-12.
- 89.- **Jackson Y, Yang Y, Mueller J, Pritchard P.** *Characterization of Fluoroanthene- and Pyrene-degrading bacteria Isolated from PAH-Contaminated Soils and Sediments*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2000. 24: 100-112.
- 90.- **Bamforth, S., Singleton, I.** *Bioremediation Of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Current Knowledge And Future Directions*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2005. 80: 723-736.

-
- 91.- **Chikere, C., Okpokwasili, G., Chikere, B.** *Monitoring Of Microbial Hydrocarbon Remediation In Soil*. 3 Biotech, 2011. 1: 117-138.
- 92.- **Seo, J., Keum, Y., Li, Q.** *Bacterial Degradation of Aromatic Compounds*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2009. 6: 278-309.
- 93.- **Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T., Ahn, Y.** *Current State Of Knowledge In Microbial Degradation Of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review*. Frontiers in Microbiology, 2016. 7:1369. doi: 10.3389/fmicb.2016.01369.
- 94.- **Kardena, E., Helmy, Q., Funamizu, N.** *Biosurfactants and Soil Bioremediation*. Chap. 16, Biosurfactants: Production and Utilization -- Processes, Technologies and Economics. CRC Press, 1Ed., 2015.
- 95.- **Margesin, R., Schinner, F.** *Biodegradation And Bioremediation Of Hydrocarbons In Extreme Environments*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001. 56:650–663.
- 96.- **Coulon, F., Pelletier, E., Gourhant, L., Delille, D.** *Effects Of Nutrient And Temperature On Degradation Of Petroleum Hydrocarbons In Contaminated Sub- Antarctic Soil*. Chemosphere, 2005. 58: 1439-1448.
- 97.- **Aislabie, J., Foght, J., Saul, D.** *Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria From Soil Near Scott Base, Antarctica*. Polar Biology, 2000. 23: 183-188.
- 98.- **Obayor, O., Ilori, M., Adebusoye, S., Oyetibo, G., Amund, O.** *Pyrene-Degradation Potentials Of Pseudomonas Species Isolated From Polluted Tropical Soils*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2008. 24: 2639-2646.
- 99.- **Obuekwe, C., Hourani, G., Radwan, S.** *High-Temperature Hydrocarbon Biodegradation Activities In Kuwaiti Desert Soil Samples*. Folia Microbiol (Praha), 2001. 46: 535-539.
- 100.- **Stapleton, R., Savage, D., Sayler, G., Stacey, G.** *Biodegradation Of Aromatic Hydrocarbons In An Extremely Acidic Environment*. Applied and Environmental Microbiology, 1998. 64: 4180-4184.
- 101.- **Bamforth, S., Manning, D., Singleton, I.** *Naphtalene Transformation By The Pseudomonas At An Elevated pH*. 2005.
- 102.- **Wong, J., Lai, K., Wan, C., Ma, K., Fang, M.** *Isolation And Optimization Of PAH-Degradative Bacteria From Contaminated Soil For PAH Bioremediation*. Water, Air and Soil Pollution, 2002. 139: 1–13.

-
- 103.- **Kästner, M., Breuer-Jammali, M., Mahro, B.** *Impact Of Inoculation Protocols, Salinity, And Ph On The Degradation Of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) And Survival Of PAH-Degrading Bacteria Introduced Into Soil.* Applied and Environmental Microbiology, 1998. 64:359–362.
- 104.- **Stroud, J., Paton, G., Semple, K.** *Microbe-Aliphatic Hydrocarbon Interactions in Soil: Implications for Biodegradation and Bioremediation.* Journal of Applied Microbiology, 2007. 102: 1239-1253.
- 105.- **Zitrides, T.** *Mutant Bacteria Overcome Growth Inhibition In Industrial Waste Facility.* Industrial Waste, 1978. 24:42–44.
- 106.- **Zhou, Q., Hua, T.** *Bioremediation: A Review of Applications and Problems to be Resolved.* Progress in Natural Science, 2004. 14(11): 937-944.
- 107.- **Yan, J., Cheng, S., Zhang, X., Shi, L., Zhu, J.** *Effect of Four Metals on the Degradation of Purified Terephthalic Acid Wastewater by Phanaerochaete chrysosporium and Strain Fhhh.* Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2004. 72: 387-393.
- 108.- **Bezza, F., Chirwa, E.** *Biosurfactant-Enhanced Bioremediation of Aged Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH's) in Creosote Contaminated Soil.* Chemosphere, 2016. 144: 635-644.
- 109.- **Semple, K. Morriss, A., Paton, G.** *Bioavailability Of Hydrophobic Organic Contaminants In Soils: Fundamental Concepts And Techniques For Analysis.* European Journal of Soil Science, 2003. 54: 809-818.
- 110.- **Bordoloi, N., Konwar, B.** *Bacterial Biosurfactant in Enhancing Solubility and Metabolism of Petroleum Hydrocarbons.* Journal of Hazardous Materials, 2009. 170:495-505.
- 111.- **Dasari, S., Subbaiah, V., Wudayagiri, R., Valluru, L.** *Biosurfactant-Mediated Biodegradation Of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – Naphtalene.* Bioremediation Journal, 2014. 18: 258-265.
- 112.- **Rockne, K., Strand, S.** *Biodegradation Of Bicyclic And Polycyclic Aromatic Hydrocarbons In Anaerobic Enrichments.* Environmental Science and Technology, 1998. 32:2962–2967.
- 113.- **McNally, D., Mihelcic, J., Lueking, D.** *Biodegradation Of Three- And Four- Ring Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Under Aerobic And Denitrifying Conditions.* Environmental Science and Technology, 1998. 32:2633–2639.

-
- 114.- **Gibson, D., Koch, J., Kallio, R.** *Oxidative Degradation Of Aromatic Hydrocarbons By Microorganisms. I. Enzymatic Formation Of Catechol From Benzene.* *Biochemistry*, 1968. 7: 2653–2661.
- 115.- “Campana y la Industria”. Portal En Campana: www.encampana.com.
- 116.- “Refinería de petróleo ESSO”. Portal En Campana: www.encampana.com.
- 117.- <https://www.meneame.net/story/gigantesco-lago-artificial-desechos-hidrocarburos>
- 118.- <http://www.natura-medioambiental.com/el-lago-rhasa-mortal-contaminacion-en-plena-ciudad-de-campana-argentina/>
- 119.- www.cancercrisis.8k.com :“Lago Rhasa”- Nota periodística: 29/12/06
- 120.- <http://www.taringa.net/posts/ecologia/6091438/Un-lago-de-desechos-hidrocarburos-llamado-Rhasa.html>
- 121.- <http://argentina.indymedia.org/news/2006/12/478215.php>
- 122.- <http://www.opds.gba.gov.ar/index.php/leyes/ver/339>
- 123.- <http://www.opds.gba.gov.ar/index.php/leyes/ver/315>
- 124.- **Alvarez R, Leavy S, Marino M.** *Zonas Agroeconómicas Homogéneas - Buenos Aires Norte.* Estudios Socioeconómicos de la Sustentabilidad de los Sistemas de Producción y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2009. ISSN 1851-6955.
- 125.- **Shen Y, Stehmeier L G, Voordouw G.** *Identification Of Hydrocarbon-Degrading Bacteria In Soil By Reverse Simple Genome Probing.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1998. Vol. 64, No 2, p. 637-645.
- 126.- **Al-Wahaibi Y; Joshi S; Al-Bahry S; Elshafie A; Al-Bemani A; Shibulal B.** *Biosurfactant Production By Bacillus Subtilis B30 And Its Application In Enhancing Oil Recovery.* *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014. 114: 324-333.
- 127.- **Mason B J.** *Preparation Of Soil Sample Protocols: Sampling Techniques And Strategies.* U. S. Environmental Protection Agency, 1992.
- 128.- **Chandankere R; Yao J; Choi M; Masakorala K; Chan Y.** *An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium Bacillus methylotrophicus USTBa isolated from petroleum reservoir.* *Biochemical Engineering Journal*, 2013. 74: 46-53.

-
- 129.- **Walter, V., Syldatk, C., Hausmann, R.** *Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms*. Chapter 1, Biosurfactants, 2010. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.
- 130.- **Youssef N; Duncan K; Nagle D; Savage K; Knapp R; McInerney M.** *Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms*. Journal of Microbiological Methods, 2004. 56: 339-347.
- 131.- **Abouseoud M., Maachi R., Amrane A., Boudergua S., Nabi A.** *Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by Pseudomonas fluorescens*. Desalination, 2008. 223: 143-151.
- 132.- **Chen, C., Baker, S., Darton, R.** *The Application Of A High Throughput Analysis Method For The Screening Of Potential Biosurfactants From Natural Sources*. Journal of Microbiological Methods, 2007. 70: 503-510
- 133.- **Carrillo P; Mardaraz C; Pitta-Alvarez S; Giulietti A.** *Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1996. 12: 82-84.
- 134.- **Doran, P.** *Bioprocess Engineering Principles*. 2nd Ed. Elsevier. ISBN 978-0-12-220851-5.
- 135.- **García-Ochoa, F., Gomez, E.** *Bioreactor Scale-Up and Oxygen Transfer Rate in Microbial Processes: An Overview*. Biotechnology Advances, 2009. 27: 153-176.
- 136.- **Araujo I., Gómez A., Barrera M., Angulo N., Morillo G., Cárdenas C., Herrera L.** *Surfactantes biológicos en la biorremediación de aguas contaminadas con crudo liviano*. Interciencia, 2008. Vol. 33, núm. 4, pp. 245-250.
- 137.- **Nishanthi R., Kumaran S., Palani P., Chellaram C., Prem Anand T., Kannan V.** *Screening of biosurfactants from hydrocarbon degrading bacteria*. Journal of Ecobiotechnology, 2010. 2/5: 47-53.
- 138.- **Ferhat S., Mnif S., Badis A., Eddouaouda K., Alouaoui R., Boucherit A., Mhiri N., Moulai-Mostefa N., Sayadi S.** *Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by Ochrobactrum sp. 1C and Brevibacterium so. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils*. International Biodeterioration and Biodegradation, 2011. 65: 1182-1188.
- 139.- **Mandri T., Lin J.** *Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa*. African Journal of Biotechnology, 2007. Vol. 6(1), pp. 23-27.

-
- 140.- **Zhang X., Xu D., Zhu C., Lundaa T., Scherr KE.** *Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading Pseudomonas aeruginosa strains.* Chemical Engineering Journal, 2012. 209: 138-146.
- 141.- **Willumsen P, Karlson U.** *Screening of Bacteria, Isolated from PAH-Contaminated Soils, for Production of Biosurfactants an Bioemulsifiers.* Biodegradation, 1997. 7: 415-423.
- 142.- **Plaza G, Zjawiony I, Banat I.** *Use of Different Methods for Detection of Thermophilic Biosurfactant-Producing Bacteria from Hydrocarbon Contaminated and Bioremediated Soils.* Journal of Petroleum Science & Engineering, 2006. 50: 71-77.
- 143.- **Das P, Mukherjee S, Sen R.** *Antimicrobial Potential of a Lipopeptide Biosurfactant Derived from a Marine Bacillus circulans.* Journal of Applied Microbiology, 2008. 104: 1675-1684.
- 144.- **Mulet M., Lalucat J., García-Valdés E.** *DNA sequence-based analysis of the Pseudomonas species.* Environmental Microbiology, 2010. 12(6): 1513-1530.
- 145.- **Ryan K, Ray C.** *Sherrys Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases.* McGraw-Hill, 4th ed. 2004.
- 146.- **Laboratorios Britania S.A.** *Nueva distribución de discogramas Britania.* http://www.britanialab.com.ar/espanol/k07_01.html
- 147.- **Özbek B., Gayik S.** *The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor.* Process Biochemistry, 2001. Vol. 36, no. 89, p. 729-741.
- 148.- **Silva S, Farias C, Rufino R, Luna J, Sarubbo L.** *Glycerol as Substrate for the Production of Biosurfactant by Pseudomonas aeruginosa UCP0992.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. 79: 174-183.
- 149.- **Banat I, Satpute S, Cameotra S, Patil R, Nyayanit N.** *Cost Effective Technologies and Renewable Substrates for Biosurfactants Production.* Frontiers in Microbiology, 2014. Vol. 5, Art. 697.
- 150.- **Hultberg M, Alsberg T, Khalil S, Alsanius B.** *Suppression of Disease in Tomato Infected by Pythium ultimum with a Biosurfactant Produced by Pseudomonas koreensis.* BioControl, 2010. 55: 435-444.

ANEXO

7. ANEXO I

Resultados de los ensayos de muestras de suelo crónicamente contaminadas:

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

PARÁMETROS	RESULTADO	UNIDAD	METODO ANALITICO	LIMITE DE CUANTIFICACION
Hidrocarburos Totales	9.5	%	EPA 8071	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. Franco Liporace
 Director General
 Centro de Investigaciones Toxicológicas S.A.
 Junin 956 - Capital
 C.P. 1428 - B.A. - Argentina

Página 1 de 1

AV. JUAN B. ALBERDI 2946 - TEL. 4613-1100 / 4612-6912 - FAX 4613-3707 - e-mail: info@citsa.com.ar
 (C1466GSS) BUENOS AIRES - ARGENTINA

CENTRO DE INVESTIGACIONES
TOXICOLOGICAS S.A.



Buenos Aires, 17/07/2012

INFORME ANALITICO 166938

Solicitado por: DRA GIULIETTI ANA MARIA

Dirección: JUNIN 955 - CAPITAL

Tipo de muestra: SUELO

Identificación: 2 - Co.2 - UNIVERSIDAD TECNOLOGICA 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 Poliaromáticos.

*El análisis se refiere a la muestra remitida.
Este protocolo sólo puede ser reproducido íntegramente con la autorización escrita del CENTRO DE INVESTIGACIONES TOXICOLOGICAS S.A.*

Dr. ANA MARÍA GIULIETTI
[Firma]
C.I.T. S.A.
Junín 955 - Capital
Tel. 5.021.1.021

Página 1 de 1

AV. JUAN B. ALBERDI 2946 - TEL. 4613-1103 / 4612-6912 - FAX 4613-3707 - e-mail: info@citna.com.ar
(C1466SS) BUENOS AIRES - ARGENTINA