

**BACILLUS LICHENIFORMIS COMO AGENTE DE
BIODEGRADACIÓN DE FURFURAL
Y FORMADOR DE BIOFILM**

Fariás, Alejandro R.; Echeverría, Macarena C.; Utgés, Enid M.; Fontana, Gimena L.

Grupo de Investigación Sobre Temas Ambientales y Químicos.
Facultad Regional Resistencia. Universidad Tecnológica Nacional. French 414.
alefarias@frre.utn.edu.ar, macarenacecheverría@gmail.com, enidutges@gmail.com,
gimenalilianfontana@gmail.com

Resumen. *El furfural es un aldehído heterocíclico utilizado en la industria química para elaborar variados productos. No obstante su importancia, numerosas investigaciones informan acerca de una serie de problemas ambientales - derivados de su fabricación y uso - que pueden ser contrarrestados mediante técnicas que usan microorganismos para degradar contaminantes como este. Con tal fin, se han aislado e identificado bacterias provenientes de barros en contacto con los efluentes de la fabricación de furfural de una empresa taninera del Chaco. Una de estas cepas aisladas pertenece al género y especie Bacillus licheniformis. El objetivo del trabajo fue determinar la concentración máxima de furfural a la cual crece Bacillus licheniformis, evaluando su capacidad de biodegradarlo; también se estudió la capacidad de esta cepa para formar biofilm sobre cascarilla de arroz como soporte. Se ensayaron por triplicado cultivos líquidos preparados con un medio mineral M9, glucosa como co-sustrato, el inóculo bacteriano y concentraciones crecientes de furfural de 123 a 1433 mg/L. Se usó el mismo cultivo para la formación de biofilm, sin furfural. Se incubaron a 30°C, en oscuridad y con 200 rpm de agitación durante 72 h. Simultáneamente se efectuó un control abiótico en idénticas condiciones que el biótico. El crecimiento bacteriano se monitoreó cada 24 h midiendo la absorbancia a 610 nm con un espectofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda 25. El biofilm generado se midió por diferencia de peso en la cascarilla antes y después del ensayo. La concentración de furfural se analizó cada 24 h por Cromatografía Líquida de Alto Desempeño (HPLC). Los resultados indican que Bacillus licheniformis puede formar biofilm, crecer y utilizar el furfural como fuente principal de carbono, hasta concentraciones de 1433 mg/L, degradándolo en un 11,8%.*

Palabras clave: Furfural, Biodegradación, Bacillus licheniformis, Biofilm.

1. INTRODUCCIÓN

El furfural es un compuesto muy utilizado como producto intermedio en la industria química para la fabricación de plásticos, disolventes de pintura, resina de furano y adhesivos, entre otras aplicaciones. Sin embargo, y a pesar de los beneficios que poseen la producción y exportación de furfural, este compuesto provoca graves problemas de contaminación ambiental durante su proceso de producción (Luo y Cui, 2011).

Actualmente se dispone de una variedad de tecnologías para tratar los efluentes contaminados con materiales peligrosos, como el furfural. Entre ellas, se destaca la biorremoción, que implica la utilización de microorganismos para degradar contaminantes ambientales, la cual ha recibido una creciente atención como enfoque biotecnológico eficiente para restaurar un ambiente contaminado (Boopathy, 2009).

La formación de biofilms o biopelículas, puede facilitar el desarrollo de técnicas más eficientes para la biorremediación de efluentes, de allí, el significativo interés de su estudio (Rajbir y col., 2006). Las biopelículas son comunidades de células adheridas a una superficie, gracias a una matriz extracelular. La matriz de la biopelícula es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos (EPS) y otras macromoléculas como proteínas, ADN, metabolitos, productos diversos procedentes de la lisis bacteriana y material particulado del ambiente que los rodea (Lasa y col., 2005). Constituyen un mecanismo de protección para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos involucrados; además les permite sobrevivir en ambientes hostiles, ser más resistentes a los productos y producir una mayor cantidad de biomasa, incrementando su capacidad y eficiencia de degradación de diversos compuestos (Rajbir y col., 2006).

Dentro del Grupo de Investigación Sobre Temas Ambientales y Químicos - GISTAQ – perteneciente a la Facultad Regional Resistencia de la Universidad Tecnológica Nacional, se propone tratar el furfural contenido en el efluente de una fábrica de la región, utilizando un reactor de lecho fluidizado.

Para esto, previamente se han aislado e identificado colonias bacterianas provenientes de barros que han estado en contacto con dicho contaminante ya que, según señala Zheng et al. (2015) en esas condiciones el crecimiento es óptimo. Una de esas colonias identificadas a través del método amplificación por PCR y secuenciación ARNr, es *Bacillus licheniformis*. Sus características macroscópicas son: color anaranjado brillante, consistencia cremosa, forma irregular y borde lobulado (Utgés y otros, 2016).

El objetivo del trabajo fue determinar la concentración máxima de furfural a la cual crece *Bacillus licheniformis*, evaluando su capacidad de biodegradarlo; también se estudió la capacidad de esta cepa para formar biofilm sobre cascarilla de arroz como soporte.

2. MATERIALES Y MÉTODOS:

2.1 Preparación de inóculos

Para lograr el crecimiento del *Bacillus licheniformis* en medios de cultivo líquidos y posteriormente reinocularlo en un medio nutriente M9 - adaptado de Koenig et Andreesen (1989) -, se prepararon por duplicado, en Erlenmeyers de 250 mL dos inóculos sucesivos. Todas las soluciones fueron esterilizadas previamente en autoclave a 1,5 bar y 112°C (Perry, Green, Maloney, 2001) por un lapso de 15 minutos.

El primer inóculo se efectuó con 49 mL de peptona de carne al 1% m/v, 0,5 mL de NH_4Cl 1M, 0,5 mL de NaH_2PO_4 1M y la cepa extraída con palillo estéril, proveniente de un medio agarizado. Como fuente de nitrógeno asimilable, se eligió una sal inorgánica de amonio (NH_4Cl) de acuerdo con Boopathy y Daniels (1991); para regular el pH y proporcionar fósforo, Hareland et al. (1975) sugiere NaH_2PO_4 ; la peptona de carne es la fuente principal de nitrógeno orgánico (Fernández Linares y otros, 2006). El inóculo se incubó a 30°C, en oscuridad y a 200 rpm durante 48 h. Posteriormente, se realizó el segundo inóculo con: 32 mL de agua destilada estéril, 10 mL de M9, 0,1 mL de MgSO_4 1M, 5 μl de CaCl_2 1M, 2,5 mL de glucosa al 20% m/v y 5 mL del inóculo anterior. Se incubó a 30°C, en oscuridad y a 200 rpm durante 24 h. Los inóculos así preparados se utilizaron tanto para los ensayos de formación de biofilm como para las pruebas de biodegradación de furfural.

2.2 Acondicionamiento del soporte

La cascarilla de arroz se acondicionó a través de un lavado con agua destilada a 80°C por 40 minutos, se secó en estufa a 60°C y posteriormente se enfrió en desecador (Figura 1). Se pesó 1 ± 10^{-4} g del soporte y se lo esterilizó dentro de tubos de vidrio con tapa a rosca.



Figura 1. Cascarilla de arroz. Imágenes luego del lavado y secado en estufa.

2.3 Ensayos de formación de biofilm

Los ensayos se realizaron por triplicado en 21 erlenmeyers a los cuales se les adicionaron los reactivos - mencionados en la preparación de los inóculos -, el soporte respectivo y el inóculo bacteriano en M9. Simultáneamente se realizó un ensayo abiótico bajo las mismas condiciones de cultivo.

A cada erlenmeyer conteniendo el medio mínimo glucosado, se le agregó 5 mL de inóculo bacteriano con 0,8 de DO610.

Los 22 Erlenmeyers se incubaron en estufa a 30°C durante 72h y con agitación manual, cada 24h.

Finalizado el tiempo de incubación, se filtró el soporte, se lo lavó con agua destilada para remover las sustancias no absorbidas, se lo dejó secar en estufa a 60°C, enfriar en desecador y se pesó. La biomasa formada se determinó por diferencia de peso.

2.4 Pruebas de Biodegradación de furfural y crecimiento bacteriano

Se trabajó por triplicado en Erlenmeyers de 250 mL con: 34 mL de agua destilada estéril, 10 mL de M9, 0,1 mL de MgSO₄ 1M, 5 µl de CaCl₂ 1M, 1 mL de glucosa al 20% m/v, 5 mL del inóculo a una absorbancia de 0,7 a 610 nm estimando así una cantidad total de bacterias de 10⁶ UFC y furfural a distintas concentraciones (desde 123 a 1433 ppm).

Paralelamente se realizó un control abiótico bajo las mismas condiciones de cultivo. Se incubó a 30°C a 200 rpm durante 72h. El crecimiento bacteriano se analizó cada 24 h midiendo la de la absorbancia a 610 nm con un espectofotómetro PerkinElmer UV/VIS Lambda 25.

La concentración de furfural se analizó cada 24 h por Cromatografía Líquida de Alto Desempeño (HPLC) mediante un equipo Shimadzu CBM 20A. Éste cuenta con un detector UV SPD 20A a 278 nm de longitud de onda, utilizando una columna de fase inversa C18, 40°C de temperatura, con una velocidad de flujo de 1mL/min, un volumen de inyección de 20µL y una mezcla de acetonitrilo – agua (17,5:82,5) como fase móvil (Farías y otros, 2017).

3. RESULTADOS

3.1 Ensayos de formación de biofilms

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos con el soporte cascarilla de arroz. Durante los ensayos pudo apreciarse crecimiento bacteriano, observable por la turbidez generada, y desarrollo de biofilm bacteriano, observable por la diferencia de pesos del soporte en comparación con el ensayo abiótico.

Tabla 1. Resultados de la formación de biofilm en cascarilla de arroz.

<i>Cepa</i>	<i>Peso inicial del soporte [g]</i>	<i>Peso final del soporte [g]</i>	<i>Peso biofilm [g]</i>
C (1)	10,002	10,647	0,0645
C (2)	10,003	10,033	0,003
C (3)	10,002	10,139	0,0137
Blanco	10,001	0,9873	-0,0128

Nota: C = Bacillus licheniformis

3.2 Pruebas de Biodegradación de furfural y crecimiento bacteriano

Se realizaron ensayos con seis concentraciones distintas de furfural, observando que *Bacillus licheniformis* ha sido capaz de crecer y utilizar el furfural, como fuente principal de carbono, en concentraciones de hasta 1433 ppm. En la Tabla 1 se exponen, en forma comparativa los valores de concentración de furfural obtenidos cada 24h en muestras inoculadas con *Bacillus licheniformis* (ensayos bióticos) y en muestras sin inocular (ensayos abióticos), y el porcentaje de remoción total del contaminante a las 72h de incubación.

Tabla 2. Resultados de la concentración de furfural cada 24h y porcentaje de la remoción total de furfural en ensayos bióticos y abióticos.

	Ensayo	Conc. Furfural (ppm)				%Remoción
		día 0	día 1	día 2	día 3	
1	Biótico	123.2	66.8	54.1	0.7	99.4
	Abiótico	128.6	121.5	112.9	111.3	13.5
2	Biótico	239.7	172.1	73.8	12.1	94.9
	Abiótico	242.1	235.4	221.6	216.0	10.8
3	Biótico	498.8	390.6	221.7	53.8	89.2
	Abiótico	455.4	434.6	412.3	380.4	16.5
4	Biótico	595.3	485.9	318.7	207.5	65.1
	Abiótico	561.0	522.1	480.8	473.2	15.7
5	Biótico	717.2	637.1	479.0	297.7	58.3
	Abiótico	732.2	680.0	562.4	562.4	23.2
6	Biótico	1433.3	1380.2	1348.8	1265.1	11.8
	Abiótico	1508.4	1499.7	1499.7	1473.5	2.3

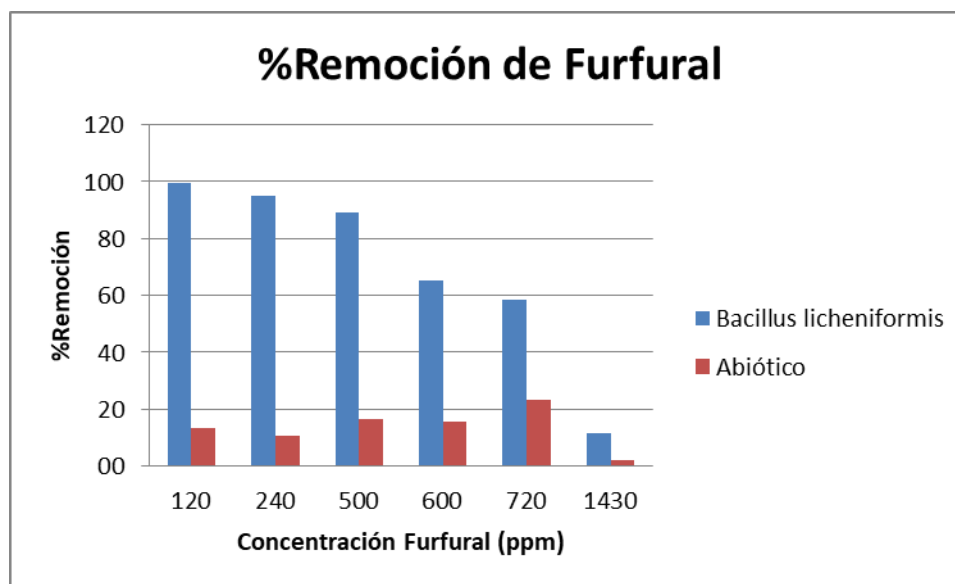


Figura 2. Porcentaje de remoción de furfural vs. Concentración de furfural en ensayos bióticos y abióticos.

El crecimiento bacteriano se determinó midiendo la absorbancia a 610nm (DO610nm). En la

tabla 3 se muestran los resultados obtenidos al inicio del ensayo y cada 24h de incubación en las muestras con y sin inoculación.

Tabla 3. Medida de absorbancia a 610nm cada 24h en los ensayos bióticos y abióticos.

	Ensayo	Absorbancia			
		día 0	día 1	día 2	día 3
1	Biótico	0.078	0.100	0.088	1.839
	Abiótico	0.014	0.004	0.005	0.004
2	Biótico	0.084	0.099	0.267	0.847
	Abiótico	0.009	0.006	0.010	0.011
3	Biótico	0.104	0.217	0.551	0.868
	Abiótico	0.000	0.012	0.016	0.017
4	Biótico	0.104	0.186	0.235	0.593
	Abiótico	0.000	0.002	0.064	0.014
5	Biótico	0.104	0.190	0.214	0.836
	Abiótico	0.000	0.009	0.042	0.030
6	Biótico	0.108	0.049	0.046	0.046
	Abiótico	0.038	0.001	0.004	0.005

4. CONCLUSIÓN

- Se demostró que *Bacillus licheniformis*, aislada de los barros de una fábrica de producción de furfural, puede utilizar furfural como fuente de carbono y degradarlo en un 89,2% hasta concentraciones de 500 ppm y alrededor de un 60% a 700 ppm. Asimismo logró remover un 11,8% en ensayos con concentraciones de 1433ppm.
- En base a los resultados obtenidos en los ensayos de formación de biofilms, podría considerarse que la cascarilla de arroz es un soporte apto para la generación de biofilm bacteriano, cuando se trabaja con *Bacillus licheniformis*. Esto se demostró en función a la diferencia de pesos del soporte cascarilla de arroz obtenido en ensayos bióticos y abióticos.

5. REFERENCIAS

- Alvarez, A., Saez, J.M., Davila Costa, J.S., Colin, V.L., Fuentes, M.S., Cuozzo, S.A., Benimeli, C.S., Polti, M.A. and M.J. Amoroso (2017), "Actinobacteria: Current Research and Perspectives for Bioremediation of Pesticides and Heavy Metals", *Chemosphere*, 166, 41-62.
- Boopathy, R. & Daniels, L. (1991). Isolation and characterization of a furfural degrading sulfate-reducing bacterium from an anaerobic digester. *Current Microbiology*, 23(6), 327-332.
- Boopathy, R. (2009). Anaerobic biotransformation of furfural to furfuryl alcohol by a methanogenic archaeobacterium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(8), 1070–1072.

- Cui, H., MA, Ch., LI, Z., Yi, W. (2011). Effect of the reactive compounds in bio-oils on esterification of the contained carboxylic acids in supercritical methanol. *Journal of Fuel Chemistry and Technology*, 39(5), 347-354
- Crönert, H., Loeper, D. (1969). New industrial paths in the continuous production of furfural. *Escher Wyss News*, 2, 69-77.
- Farías, A., Utgés, E. E., Tenev, M., Hervot, E., Utgés, E. M., Nocenti, M. (2017). Tratamiento de un Efluente con Furfural mediante Bacterias Autóctonas, en un Reactor Anaerobio de Lecho Fluidizado. *Revista Científica FACENA de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la UNNE*. Aceptado para su publicación en el volumen N° 33 y en etapa de edición.
- Fernández Linares, L., Rojas Avelizapa, N., Roldán Carrillo, T., Ramirez Islas, M., Zegarra Martínez, H., Uribe Hernandez, R., Reyes Ávila, R., Flores Hernández, D. y Arce Ortega, J. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados.
- Hareland, W., Crawford, R., Chapman, P. & Dagley, S. (1975). Metabolic function and properties of 4-hydroxyphenylacetic acid 1-hydroxylase from *Pseudomonas acidovorans*. *Journal of Bacteriology*, 121(1), 272-285.
- Hernández, A.S. (2012). Biodiversidad de actinomicetos aislados de plantas depuradoras de aguas residuales. Estudio de la capacidad de degradación de compuestos tóxicos. Universidad Politécnica de Valencia.
- Koenig, K. & Andreesen, J. (1989). Molybdenum involvement in aerobic degradation of 2-furoic acid by *Pseudomonas putida* Fu1. *Applied and environmental microbiology*, 55(7), 1829-1834.
- Lasa I, Del Pozo JL, Penales JR. (2005). *Anales del sistema sanitario de Navarra*. 28(2): 153-298.
- Luo X, Cui J. Xiaoyong. (2011). 5th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. DOI: 10.1109/icbbe.2011.5781175.
- Perry, R., Green, D., Maloney, J. (2001). *Manual del Ingeniero Químico, Volumen I*. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.
- Rajbir, S.; Debarati, P.; Rakesh, K. (2006). *Trends in Microbiology*, Vol 4, 9, 389-396.
- Utgés, E. M., Farías, A., Utgés, E. E., Tenev, M., Hervot, E., Nocenti, M., Echeverría, M. (2016). Aislamiento de Bacterias Autóctonas para su Posterior Utilización en el Tratamiento de Efluentes con Furfural. Presentado en el VI Congreso Internacional sobre Gestión y Tratamiento Integral del Agua. Córdoba.
- Zheng, D., Bao, J., Lu, J. & Gao, C. (2015). Isolation and characterization of a furfural degrading bacterium *Bacillus cereus* sp. strain DS1. *Current microbiology*, 70(2), 199-205.