

EFECTO DE UN BIOSURFACTANTE EN LA BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS HIDROCARBURADOS DE SENTINAS DE BARCOS

Est. Comodoro
FISICACION TOPOGRAFICA

Morán, A.C.¹, Olivera, N.², Commendatore, M.², Esteves, J.L.² y Siñeriz, F.¹

1 Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos (PROIMI), Av. Belgrano y Pje. Caseros, (4000) Tucumán. E-mail: acmoran@proimi.edu.ar

2 Centro Nacional Patagónico (CENPAT), Blvd. Brown s/n, (9120) Pto. Madryn, Chubut. E-mail: olivera@cenpat.edu.ar

RESUMEN

La biodegradación de hidrocarburos está limitada en parte por la disponibilidad del sustrato para los microorganismos degradadores. Los surfactantes, en concentraciones superiores a la concentración micelar crítica (CMC), concentración mínima para la formación de micelas, aumentan la solubilidad de los hidrocarburos en la fase acuosa y así la disponibilidad para los microorganismos. Por debajo de la CMC, pueden favorecer la degradación aumentando la velocidad de transferencia de masa entre las fases. Los surfactantes pueden ser producidos por algunos microorganismos de la población degradadora o pueden ser agregados al sistema. En este trabajo, se estudió el efecto del agregado de un biosurfactante producido por *Bacillus subtilis* O9 en la degradación de un residuo hidrocarburado proveniente de sentinas de barcos. Los ensayos se realizaron en frascos agitados a 25° C, conteniendo agua de mar, nutrientes, y la población autóctona bioaumentada del mismo residuo. En presencia de 4 CMC, se observó una mayor degradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos y un mayor crecimiento microbiano. Con 0,5 CMC, concentración a la cual no se forman micelas, no se obtuvieron diferencias significativas en la degradación ni en el crecimiento microbiano, con respecto al cultivo sin adición de biosurfactante. El agregado de biosurfactante no alteró significativamente la composición de la población microbiana del residuo. Este biosurfactante tendría una aplicación potencial para mitigar el impacto ambiental producido por derrames de hidrocarburos.

INTRODUCCIÓN

Los surfactantes son moléculas anfipáticas, que tienen una parte hidrofóbica y otra hidrofílica. Esta propiedad los hace capaces de disminuir la tensión superficial e interfacial, y de formar micelas, que a su vez permiten la formación de microemulsiones de una fase oleosa en una fase acuosa o viceversa (Desai y Banat, 1997).

La mayoría de los surfactantes usados hoy, son sintetizados químicamente a partir del petróleo. Muchos microorganismos son capaces de sintetizar biosurfactantes utilizando diferentes sustratos. El interés en estos productos de debe

una serie de ventajas con respecto a los surfactantes sintéticos, como la biodegradabilidad, la posibilidad de producción en fuentes renovables y una mayor variedad en sus estructuras, y mayor selectividad y efectividad en condiciones extremas.

Una de las potenciales aplicaciones de los biosurfactantes es su aplicación en la biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos y en el tratamiento de residuos de la industria petroquímica.

Bacillus subtilis O9 es un microorganismo que fue aislado de sedimentos contaminados y que es capaz de producir biosurfactantes cuando es cultivado en un medio conteniendo sacarosa. El surfactante producido por *Bacillus subtilis* O9 es uno de los que producen un mayor descenso de la tensión superficial. La tensión superficial del agua a 25° C es igual a 72 dinas/cm. El surfactante producido por esta bacteria hace que la tensión superficial descienda hasta aproximadamente 28 dinas/cm (Morán y col. 1998) mientras que los valores alcanzados por la mayoría de los surfactantes sintéticos alcanzan valores entre 30 y 35 dinas/cm (Fletcher, 1992).

La biodegradación de hidrocarburos por la población microbiana nativa es el mecanismo biológico primario por el cual los hidrocarburos son removidos del ambiente. Esta biodegradación está limitada por la baja solubilidad de los hidrocarburos en la fase acuosa en la que están los microorganismos. Los surfactantes tienen la propiedad de aumentar el área interfacial y la concentración en la fase acuosa de compuestos de baja solubilidad, tornando estos sustratos insolubles más accesibles para los microorganismos. (Desai y Banat, 1997; Rouse y col., 1994).

La remediación de sitios contaminados con hidrocarburos por microorganismos es una tecnología emergente que implica la aplicación de surfactantes (Desai y Banat, 1997). Los biosurfactantes poseen la ventaja, con respecto a los surfactantes sintéticos, de no causar efectos adversos en el ambiente. Por otra parte se ha reportado que el agregado de surfactantes sintéticos resultó en muchos casos en la inhibición de la biodegradación (Rouse y col. 1994).

En la remediación de sitios contaminados se ha considerado la adición de microorganismos productores de biosurfactantes para estimular la biodegradación. Esto ofrecería la ventaja de proveer surfactantes no tóxicos y biodegradables en forma continua y a bajo costo (Shreve y col., 1995). Para que un microorganismo productor de biosurfactantes cause efectos positivos en la recuperación de un sitio contaminado, el microorganismo debe ser capaz de producir biosurfactantes en forma efectiva, bajo condiciones ambientales. Sin embargo, la inoculación con microorganismos exógenos ha dado resultados ambiguos. Una alternativa ante esta situación es el agregado del biosurfactante producido exógenamente. La literatura cita diversos casos en los cuales esta alternativa ha resultado en un aumento de la biodegradación (Desai y Banat, 1997; Bertrand y col. 1994).

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad del biosurfactante producido por *Bacillus subtilis* O9 para estimular la degradación de un residuo hidrocarburado por la población autóctona bioaumentada del mismo. El residuo utilizado en este trabajo proviene de piletas ubicadas en el basurero municipal de la ciudad de Puerto Madryn donde se acumulan los residuos colectados de sentinas de buques.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Producción y preparación del biosurfactante. *Bacillus subtilis* O9 fue cultivado en erlenmeyers de 250 mL conteniendo 75 ml de un medio mineral con sacarosa y extracto de levadura. El cultivo se llevó a cabo por 24 horas a 30° C en un agitador rotatorio a 160 rpm. Los cultivos se centrifugaron a 12000 g para separar las células. El sobrenadante obtenido fue llevado a pH 2 con ácido clorhídrico 6N. En estas condiciones el biosurfactante precipita, junto con otros productos. El precipitado obtenido fue resuspendido en agua destilada y el pH fue ajustado aproximadamente a 8,5. La concentración de surfactante en esta preparación fue aproximadamente 200 CMC.

Experiencia de biodegradación de hidrocarburos. La degradación del residuo hidrocarburado fue llevada a cabo en erlenmeyers de 125 ml conteniendo 40 ml de un medio preparado con agua de mar filtrada (Millipore 0,45µ). Este medio fue suplementado con 1 g/L de nitrato de amonio, 4 ml/L de una solución de fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,07M y NaH_2PO_4 0,03M) y 0,2 g/L de extracto de levadura. Las cantidades de inóculo, biosurfactante y residuo de sentinas estéril agregadas a cada cultivo se detallan en la Tabla 1. El inóculo consistió de un cultivo con el mismo medio usado en la experiencia de biodegradación suplementado con 0,5 g/L de glucosa y 1% del residuo no estéril. Los erlenmeyers fueron incubados en un agitador recíproco a 25° C durante 7 días. Se tomaron muestras periódicas para determinación de crecimiento celular y al término de la incubación se determinaron los hidrocarburos remanentes.

Determinación del crecimiento celular. El crecimiento fue evaluado midiendo la absorbancia a 450 nm de los cultivos.

Determinación de la concentración de surfactante. Se determinó la concentración de la preparación de biosurfactante midiendo la tensión superficial de diferentes diluciones de las muestras.

Determinación de hidrocarburos remanentes. Con el fin de recuperar los hidrocarburos no degradados al término de período de incubación, los cultivos y controles fueron extraídos con 2 alícuotas de 50 ml de hexano. Los extractos se combinaron y se llevaron a un volumen de 100 ml. Se tomó una alícuota de 1 ml de este extracto y se evaporó a sequedad a temperatura ambiente para evitar la pérdida de los hidrocarburos más volátiles. El residuo se redisolvió en hexano (0,2 ml) y se pasó a través de una columna de fraccionamiento de alúmina para separar los hidrocarburos alifáticos de los aromáticos. La columna se eluyó primero con hexano para colectar la fracción de alifáticos, y luego con una mezcla de 7:3 hexano y cloruro de metileno, seguida por cloruro de metileno puro para colectar la fracción de aromáticos. Los hidrocarburos alifáticos fueron medidos usando un cromatógrafo gaseoso, equipado con columna capilar, detector de ionización a la llama y un inyector splitless. Se cuantificaron alifáticos resueltos (n-alcanos, pristano y fitano) y mezcla compleja no resuelta (MCNR). La identificación y cuantificación de los hidrocarburos se realizó por comparación con mezclas de estándares externos de alcanos. Los aromáticos totales se cuantificaron por fluorescencia, a una longitud de onda de excitación de 310 nm y de emisión de 360 nm. La calibración fue realizada

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos por cromatografía gaseosa de la fracción de hidrocarburos alifáticos del residuo de sentinas mostraron que contenía la serie homóloga de n-alcanos comenzando en n-C11 hasta aproximadamente n-C30, con predominancia de alcanos de bajo peso molecular (n-alcanos <20). La mezcla compleja no resuelta presentó una distribución bimodal característica de la presencia de fracciones livianas y pesadas de hidrocarburos. Una parte de la misma se extendió por debajo de la zona comprendida entre el n-C12 y el n-C19 con un máximo cerca de los C15 y C16; la otra a partir del n-C23 con un máximo en el n-C28 y n-C29 (Figura 1).

El residuo de sentinas usado en esta experiencia contenía aproximadamente 60,83 mg/ml de alifáticos resueltos, 226,0 mg/ml de MCNR, 286,9 mg/ml de alifáticos totales y 31,79 mg/ml (en equivalentes de crisenol) de aromáticos totales.

El biosurfactante en una concentración inferior a la concentración micelar crítica no afectó el crecimiento celular en comparación al cultivo bioaumentado sin biosurfactante, mientras que en una concentración de 4 CMC se observó una fase de crecimiento más prolongada y que el crecimiento alcanzado es mucho mayor (Figura 2).

Se determinaron los porcentajes de biodegradación de los cultivos bioaumentados, sin surfactante (CH) y con concentraciones sub-CMC (CHB-) y supra-CMC (CHB+) del biosurfactante. También se determinó la capacidad de biodegradación de la preparación de biosurfactante, sin el agregado de inóculo de la población degradadora (CADPB). En todos los casos los porcentajes se calcularon con respecto a un control de evaporación (CE) estéril. El biosurfactante en una concentración de 4 CMC aumentó la degradación de alifáticos totales con respecto al cultivo sin biosurfactante, pero el efecto más pronunciado se observa en la degradación de aromáticos, la cual no es apreciable excepto en el cultivo con 4 CMC. Por lo tanto, solamente la combinación de la bioaumentación y agregado de biosurfactante en una concentración superior a la CMC produjo un aumento en la biodegradación de los hidrocarburos. Por otro lado, la biodegradación observada en los cultivos sin inóculo y con biosurfactante, puede deberse a la presencia de esporas de *Bacillus subtilis* O9, las cuales son estructuras de resistencia que pueden haber estado presentes en la preparación de biosurfactante, debido a que esta preparación se usó en forma no estéril.

Por otra parte, el análisis microbiológico de la población microbiana presente en el inóculo, reveló la presencia de una levadura, identificada como *Rhodotorula glutinis* y dos bacterias, bacilos gram negativos, no hemolíticos. Los mismos microorganismos estaban presentes después de 96 horas de cultivo con residuo de sentinas y 4 CMC de biosurfactante, más un microorganismo, con capacidad hemolítica, la cual es indicativa de la producción de biosurfactantes, que podría ser *Bacillus subtilis* O9. Esto fue indicativo de que la presencia del biosurfactante no fue perjudicial para los microorganismos presentes en el inóculo.

En otros casos también se ha observado que surfactantes de origen microbiano han estimulado la biodegradación de hidrocarburos. El ramnolípido producido por

este microorganismo (Shreve y col., 1995). El agregado del biosurfactante producido por *Candida lipolytica* a cultivos con hexadecano, resultó en un aumento en la degradación y en una máxima tasa de crecimiento (Pareilleux, 1979). El agregado del biosurfactante producido por *Pseudomonas aeruginosa* UG2 fue capaz de aumentar la degradación de hidrocarburos alifáticos por microorganismos de un suelo contaminado (Jain y col. 1992). Por otro lado, la mayoría de los surfactantes sintéticos, provocaron una inhibición de la biodegradación en concentraciones superiores a la CMC (Rouse y col, 1994).

Actualmente, el uso de biosurfactantes en la industria química y alimenticia, en general, no es competitivo a causa de su alto costo de producción asociado a las etapas de fermentación y de purificación. Para esta aplicación, la producción requirió un tiempo relativamente corto (24 h) en comparación a otros procesos fermentativos y la preparación se usó en forma de un extracto crudo que no implica un proceso complejo de purificación. El sustrato utilizado fue sacarosa, la cual podría ser reemplazada por melazas que son residuos de la industria azucarera. Cabe destacar que la producción es susceptible de ser optimizada en cuanto a la composición del medio y las condiciones de cultivo, y de escalamiento.

CONCLUSIONES

El biosurfactante producido por *Bacillus subtilis* O9 aplicado en una concentración superior a la concentración micelar crítica estimuló la biodegradación de hidrocarburos del residuo estudiado y el crecimiento de la microbiota presente. Este biosurfactante podría resultar de utilidad en el tratamiento de residuos hidrocarbonados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bertrand, J.C., Bonin, P., Goutx, M., Gauthier, M. and Mille, G. (1994) The potencial application of biosurfactants in combatting hydrocarbon pollution in marine environments. *Res. Microbiol.* 145: 53-56.
2. Desai, J.D. and Banat, I.M. (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* 61: 47-64.
3. Fietcher, A. (1992) Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends. Biotechnol.* 10: 208-217.
4. Jain, D.K., Lee, H. and Trevors, J.T. (1992) Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. *J. Ind. Microbiol.* 10: 87-93.
5. Morán, A.C., Olivera, N., Ferrero, M.A. and Siñeriz, F. (1998) Production of biosurfactant and bioemulsifying agents from an oil degrading *Bacillus* isolated from oil polluted coastal sediments. Presentación oral en Third Latin American Biodegradation & Biodeterioration Symposium.
6. Pareilleux, A. (1979) Hydrocarbon assimilation y *Candida lipolytica*: formation of a biosurfactant; effects on respiratory activity and growth.
7. Rouse, J.D., Sabatini, D.A., Suflita, J.M. and Harwell, J.H. (1994) Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. *Crit. Rev. Environ.*

8. Shreve, G.S., Subbalaxmi, I. and Gunnam, S. (1995) Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 4: 331-337.

Cultivo	Inóculo	Biosurfactante	Residuo de sentinas
Control de evaporación (CE)			6 ml/l
Control de actividad degradadora de la preparación de biosurfactante (CADPB)		4 CMC	6 ml/l
Crecimiento en la preparación de biosurfactante (CPB)	10 ml/l	4 CMC	
Crecimiento en hidrocarburos (CH)	10 ml/l		6 ml/l
Crecimiento en hidrocarburos con biosurfactante sub-CMC (CHB-)	10 ml/l	0.5 CMC	6 ml/l
Crecimiento en hidrocarburos con biosurfactante supra-CMC (CHB+)	10 ml/l	4 CMC	6 ml/l

Tabla 1. Cultivos realizados para la experiencia de biodegradación

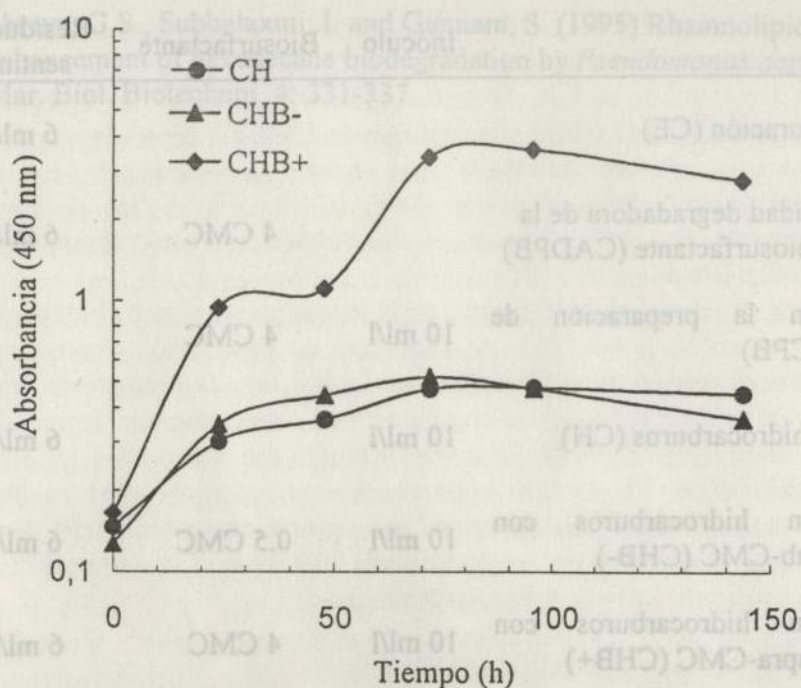


Figura 2. Crecimiento de los cultivos bioumentados en residuo de sentinas, sin biosurfactante (CH), y con concentraciones sub-CMC (CHB-) y supra-CMC (CHB+)

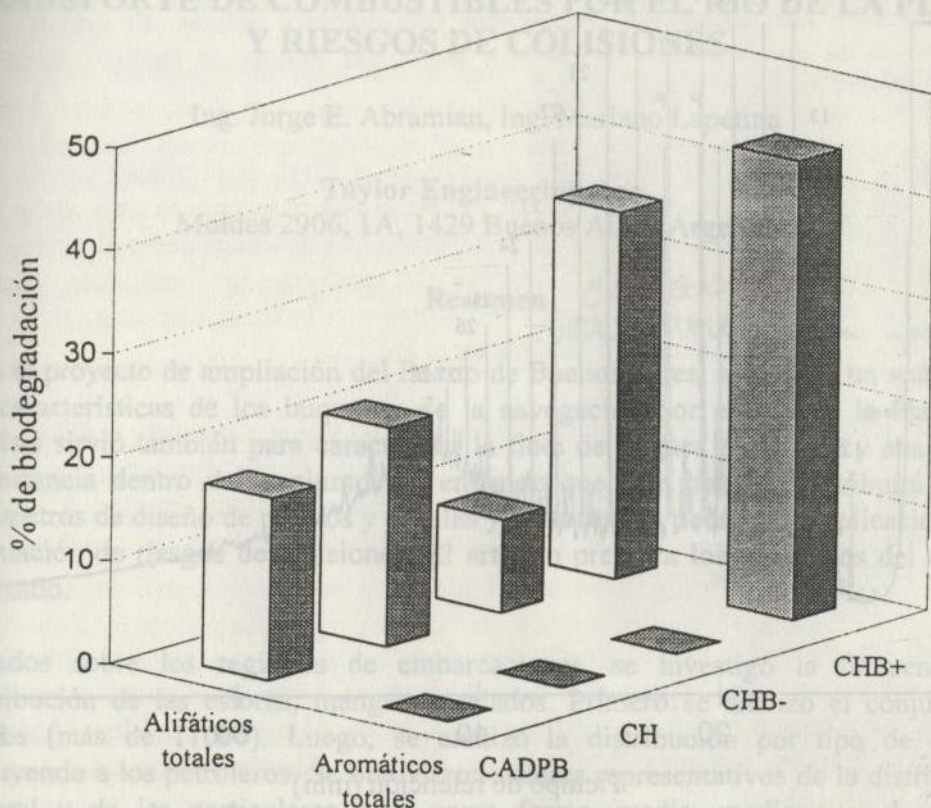


Figura 3. Porcentajes de biodegradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos

Finalmente, el artículo menciona las conclusiones más importantes y avanza sobre la aplicación de la investigación realizada en el diseño de terminales portuarias y en el análisis de riesgos de accidentes.

Introducción

Como parte de los estudios realizados para la ampliación del Puerto de Buenos Aires, los autores analizaron la flota que navega a través del Río de la Plata. Este análisis sirvió de base para caracterizar la situación actual y las posibles interferencias a la navegación de las futuras obras de dragado y relleno para conformar el recinto. Este recinto ganado al río serviría como superficie de apoyo a las operaciones de las terminales de Puerto Nuevo.

Canales de Navegación: Acceso al Puerto de Buenos Aires y Dock Sud

Para acceder al Puerto de Buenos Aires desde la zona exterior del Río de la Plata, un buque debe recorrer aproximadamente 205 km a través de Canal Punta Indio, Canal Interoceánico, Canal de Acceso al Puerto de Buenos Aires y Canal Nuevo.

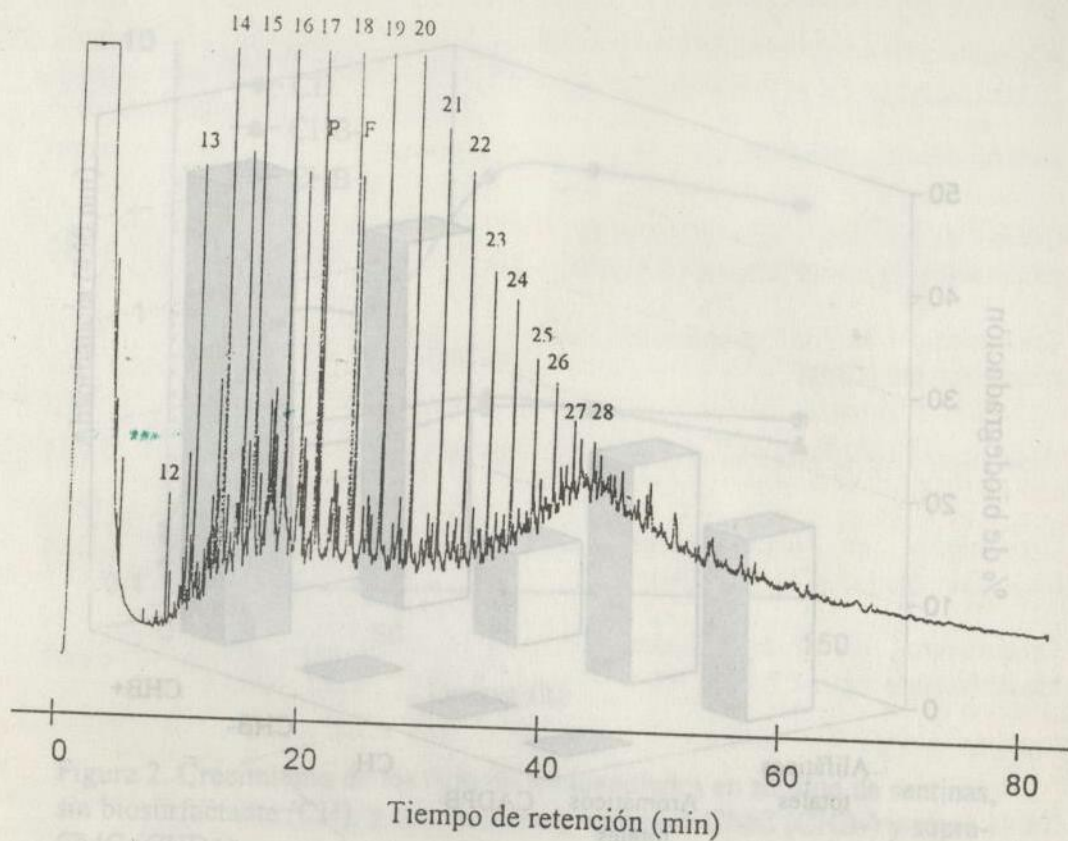


Figura 1. Análisis por cromatografía gaseosa del residuo de sentinas