



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

***“Estudio de la biodegradación de
contaminantes persistentes y emergentes
empleando microorganismos y/o lodos
biológicos de origen industrial”***

Natacha Ailén Baffo

Tesina para optar al título de Licenciada en Biotecnología

Director: **Dr. Leonardo Martín Pérez**

Co-Directora: **Dra. Dana Belén Loureiro**

2019

Parte del presente trabajo de tesina fue financiado con subsidios obtenidos en el marco del siguiente proyecto de investigación:

- “*Mejoramiento de lodos biológicos de origen industrial aplicables a la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos*”.

Entidad financiadora: Universidad Nacional de Rosario (Secretaría de Vinculación Tecnológica y Desarrollo Productivo). Res. C.S. N° 751/2017.

Entidades participantes: SOLAMB S.R.L., Fac. de Química e Ingeniería del Rosario (UCA-campus Rosario), CONICET, Fac. de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR).

Director: Dr. Leonardo Martín Pérez. **Co-directora:** Dra. Dana B. Loureiro.

Duración: 14/09/2017- 31/12/2018.

Monto asignado: \$145.000

Los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo fueron presentados, en forma parcial, en el marco de la siguiente reunión científica:

- Baffo, N.A., Loureiro, D.B., Salvatierra, L.M., Pérez, L.M. Evaluación de la aplicación de lodos biológicos residuales en la biorremediación de aguas impactadas con ibuprofeno. *XII Jornadas de Ciencia y Tecnología (JorCyT)*. Rosario, Argentina. Octubre 17-18, 2018.

Agradecimientos

A mí.

A mi papá por haberme contagiado la pasión por leer y por aprender, desde cuando me regalaba los libros de Harry Potter y me preparaba para las olimpiadas de matemática. A mi mamá por todas las veces que me tranquilizó antes de un examen, por preguntarme si me tenía que levantar temprano a estudiar y despertarme con medialunas, por estar siempre presente hasta en el más mínimo detalle. A los dos por haber hecho de la educación una prioridad, por su apoyo incondicional y por haberme dado siempre algo que cada vez valoro más: libertad.

A mis hermanes porque a su manera cada cual me demostró siempre su apoyo y su confianza en mí.

A Fede. Mi gran compañero. Por tantas, tantas, horas de estudio compartidas. Por quedarse conmigo la noche previa a rendir cada examen, sabiendo lo importante que era para mí. Por haber estado a mi lado en todo este recorrido, no sólo académico sino personal.

A mis compañeres, por haber convertido tantas horas de cursado en risas y grandes anécdotas. Les agradezco haber crecido juntas.

A todes les docentes que me contagiaron su pasión y dejaron una huella en mí.

A las mujeres que alzaron la bandera para hacer que la educación, la universidad y la ciencia fueran espacios para nosotras.

A todes les que alguna vez lucharon por la educación pública.

Abreviaturas

EB eficiencia de biodegradación

CE Contaminantes emergentes

CG Cromatografía gaseosa

DQO Demanda química de oxígeno

FAME del inglés “*Fatty Acids Methyl Esters*”

FID Detector de ionización a la llama

Glu Glucosa

Ibu Ibuprofeno

OTU unidad taxonómica operacional

PCA del inglés “*Plate Count Agar*”

PTFE Politetrafluoroetileno (Teflon®).

TTC Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio

UFC Unidades formadoras de colonias

Resumen

En el presente trabajo de tesina se evaluó la potencial aplicación de lodos residuales industriales de alta carga bacteriológica, obtenidos de una planta generadora de biogás, para la biorremediación de matrices líquidas impactadas con ibuprofeno, un fármaco comúnmente utilizado como analito modelo de los llamados *contaminantes emergentes*. Además, se realizó una caracterización fisicoquímica del lodo biológico, así como también el análisis metagenómico de la población microbiana pre-existente en dichas muestras.

Se demostró un incremento significativo en la viabilidad celular de las bacterias facultativas presentes en el lodo crudo en presencia de ibuprofeno, encontrándose una interesante correlación entre la microbiota hallada en dichas muestras frente a la reportada en otros estudios orientados a la caracterización de comunidades microbianas con un importante rol en la degradación de xenobióticos

Adicionalmente, se estudió la capacidad de bacterias previamente aisladas del lodo residual para utilizar hidrocarburos del diésel comercial (diésel B10) como fuente de energía para sus actividades metabólicas.

En este caso, se pudo demostrar un incremento significativo en la viabilidad celular de dos de las tres cepas analizadas frente al contacto con diésel comercial como única fuente de carbono, en concordancia con una disminución en la fracción petroquímica y biodiésel del combustible utilizado en los ensayos de biodegradación. Sin embargo, se necesitan más estudios orientados a dilucidar las complejas interacciones que pueden co-existir entre los microorganismos que forman parte de nichos tan complejos, con el fin de diseñar estrategias biotecnológicas eficientes, seguras y confiables, para su aplicación en la biorremediación de sitios impactados con contaminantes persistentes y emergentes.

ÍNDICE

1. Introducción.....	7
1.1. Biorremediación.....	8
1.1.1. Tipos y técnicas de biorremediación.....	9
1.2. Contaminantes emergentes.....	12
1.2.1. Analgésicos: Ibuprofeno.....	12
1.3. Hidrocarburos del petróleo.....	14
2. Objetivos.....	17
3. Materiales y Métodos.....	19
3.1. Caracterización fisicoquímica y microbiológica del barro.....	20
3.2. Ensayos de viabilidad celular.....	20
3.3.....	
3.4. Ensayos de biodegradación de Ibuprofeno.....	22
3.5. Ensayos de biodegradación de diésel comercial.....	23
3.6. Análisis de cromatografía gaseosa de diésel comercial (B10).....	24
3.7. Extracción de ADN, secuenciación y asignación taxonómica.....	22
3.8. Análisis estadísticos.....	23
4. Resultados y discusión.....	26
4.1. Caracterización fisicoquímica y microbiológica del lodo industrial.....	27

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BIORREMEDIACIÓN

El término biorremediación, acuñado a principios de la década de los '80, se refiere a un conjunto de metodologías y técnicas cuyo fin es la recuperación de ambientes contaminados utilizando organismos vivos, aprovechando sus capacidades metabólicas. Estos organismos pueden ser seleccionados naturalmente o por medio de la ingeniería genética (Di Paola y col., 2010; Brutti y col., 2018). Los sistemas biológicos más frecuentemente utilizados para la biorremediación son los microorganismos (principalmente, bacterias y hongos) y las plantas (*i.e.*, fitorremediación) (Biswas y col., 2015).

En general, las tecnologías de eliminación de contaminantes ambientales basadas en procesos biológicos poseen costos más bajos en relación a otras técnicas. Además, la biorremediación provoca una menor intrusión en el sitio contaminado y, en consecuencia, un daño ecológico menos significativo (Di Paola y col., 2010). Aunque los beneficios económicos de la aplicación de estas biotecnologías parecen ser evidentes, la inversión en investigación sobre el estudio y aplicación de estos bioprocesos para la eliminación de contaminantes ambientales es menor en comparación con otras técnicas más tradicionales de saneamiento.

Las principales dificultades con las que aún se encuentra la biorremediación para ser considerada una herramienta exitosa frente a otras alternativas más costosas incluyen la necesidad de mejorar la caracterización y la estabilidad de los microorganismos utilizados en dichos procesos, clarificar los factores que afectan las tasas de degradación, establecer criterios y métodos que sean ampliamente aceptados para la aplicación de esta tecnología en el ambiente, realizar modelizaciones para lograr una correcta aproximación de los estudios a escala de laboratorio hacia el trabajo en campo, y desarrollar mejores técnicas de monitoreo de las sustancias a degradar y/o de sus metabolitos, entre otros aspectos (Di Paola y col., 2010). A su vez, la biorremediación se limita al tratamiento de residuos que son efectivamente reconocidos y transformados por ciertos organismos, pero aún son muchas las sustancias tóxicas difíciles de degradar. Más aún, considerando que en los

últimos años se ha incrementado notablemente la cantidad de compuestos generados por el hombre que no se encontraban presentes en la naturaleza con anterioridad (Di Paola y col., 2010). Por lo tanto, la biotecnología podría jugar un rol clave en el desarrollo de nuevas herramientas biológicas que permitan aplicar protocolos de biorremediación en sitios cada vez más complejos, así como también ampliar el rango de contaminantes cuya eliminación del ambiente sea factible mediante estas nuevas tecnologías de saneamiento.

1.1.1. TIPOS Y TÉCNICAS DE BIORREMEDIACIÓN

Las técnicas de biorremediación se pueden clasificar según diferentes criterios: el agente/organismo que se utilice, el sitio o medio a tratar, la manera en la cual se aplique o se realice el proceso, etc. En general, la palabra *biorremediación* se encuentra mayormente asociada al empleo de microorganismos, sean estos bacterias u hongos (Biswas y col., 2015). Cuando los microorganismos a aplicar provienen de otro ecosistema, a esta práctica se le confiere el término *bioaumentación*. La bioaumentación consiste básicamente en la introducción de cepas exógenas, con propiedades degradativas, en el área o sitio a remediar.

Por su parte, durante la *bioestimulación* de un sitio contaminado no se adicionan microorganismos, sino que se modifica el medio para estimular la flora nativa pre-existente en su capacidad de degradar el/los contaminante/s. Esta técnica involucra el agregado de nutrientes, co-sustratos, pro-oxidantes y otros compuestos que puedan actuar como aceptores o dadores de electrones, según el caso en particular (Lalaroo y col., 2017).

Las técnicas de biorremediación pueden utilizarse para tratar contaminantes en distintos medios. Éstos pueden ser sólidos (suelos, sedimentos o lodos), líquidos (tratamiento de aguas superficiales, subterráneas o residuales), y gaseosos (emisiones industriales) (González-Rojas y col., 2011).

La biorremediación también puede aplicarse “*in situ*” o “*ex situ*” (Fig. 1). Se denomina biorremediación “*in situ*” cuando el tratamiento se realiza en el mismo lugar donde se encuentra la contaminación, sin producir modificación de la estructura física del material a tratar. La biorremediación “*in situ*” es aplicable tanto

en suelos como en acuíferos, y tiene como ventaja su relativo bajo costo. Sin embargo, es más complejo el control de la actividad biológica dirigida a la degradación de contaminantes específicos y la gestión del proceso en general (Brutti y col., 2018).

En el caso de la biorremediación “*ex situ*”, el tratamiento se realiza retirando los materiales del sitio contaminado y tratándolos en una instalación fuera del lugar donde se encuentra la contaminación. La biorremediación “*ex situ*” también puede aplicarse en suelos y acuíferos, en sitios acondicionados a tal efecto, tales como plantas de tratamiento donde se facilitan los controles pero se encarece el proceso. Las estrategias de biorremediación “*on site*” son una variante de “*ex situ*”, en donde los tratamientos se realizan en una zona lindante a la zona afectada (Brutti y col., 2018).

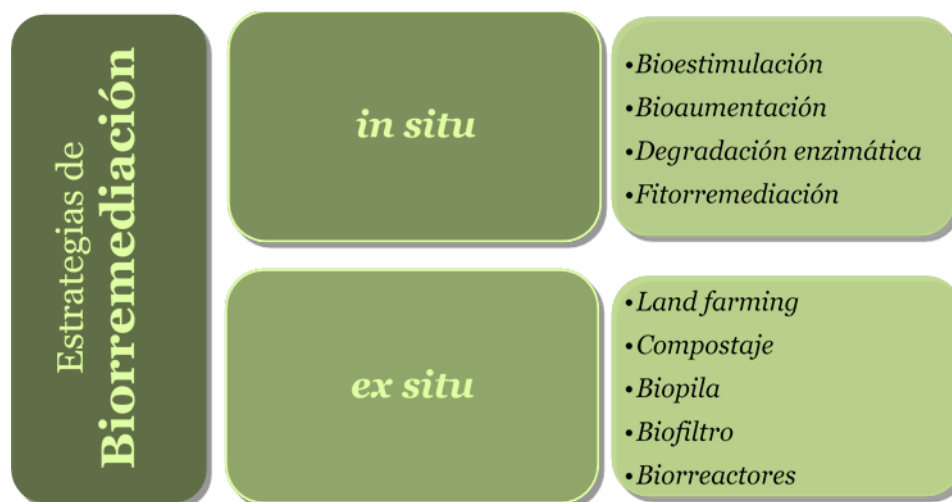


Figura 1. Estrategias habituales de biorremediación “*in situ*” y “*ex situ*”.

Entre las estrategias de biorremediación “*ex situ*” más sencillas se encuentran los sistemas de “*land farming*”. Esta técnica consiste en la excavación del suelo contaminado y su deposición en un soporte sobre el suelo, permitiendo la degradación aeróbica de los contaminantes mediada por organismos nativos. Adicionalmente, se pueden controlar las condiciones de aireación o el agregado de nutrientes para mejorar el proceso (Azubuiké y col., 2016).

Alternativamente, la técnica de “biopila” se basa en colocar la muestra a remediar en celdas de tratamiento que contienen una red de tubos perforados por los que circula aire a través del material, mediante el empleo de un compresor. Esta técnica

requiere menos equipamiento y, en general, una menor área de tratamiento respecto a otras técnicas. Recientemente, se ha incorporado en esta clasificación al “compostaje” que consiste básicamente en mezclar sedimentos contaminados con enmiendas orgánicas fácilmente degradables manteniendo la mezcla apilada bajo condiciones controladas de humedad y aireación (Di Paola y col., 2010).

La creciente contaminación industrial y agrícola ha llevado a una mayor necesidad de procesos “*ex situ*” con mejor capacidad para eliminar contaminantes específicos tales como metales pesados, pesticidas, hidrocarburos y compuestos clorados, entre otros. Estos métodos comprenden procesos aeróbicos, anaeróbicos y/o fisicoquímicos y, en general, incluyen dos tipos de diseños: *i*) filtros de lecho fijo (biofiltros, humedales, *buffer strips*), o *ii*) biorreactores (en los cuales la materia orgánica y los microorganismos se encuentran en suspensión). En los últimos años, ambos sistemas han tenido notables desarrollos en términos de diseño y control de los bioprocesos (Di Paola y col., 2010).

En general, todos estos sistemas consisten en recipientes o espacios cerrados en los cuales se llevan a cabo procesos fisicoquímicos y biológicos, mediados por organismos o productos derivados de los mismos, tales como enzimas. Además, son procesos continuos en donde los organismos no son retirados, por lo tanto, su liberación al medio está contenida (Lalaroo y col., 2017)

En los últimos años, gracias a las nuevas tendencias en economía circular basada en la sustentabilidad de los procesos, los costos asociados al tratamiento de la contaminación de origen industrial y agrícola han podido reducirse mediante la reconversión de residuos en productos útiles. En particular, el tratamiento anaeróbico de residuos orgánicos ha cobrado gran relevancia ya que durante la biodigestión anaeróbica de la materia orgánica se genera biogás, el cuál puede ser utilizado para la co-generación de energía eléctrica y térmica, y el lodo residual producido en los biorreactores puede convertirse en un valioso recurso para la generación de *compost* o para aplicaciones biotecnológicas.

1.2. CONTAMINANTES EMERGENTES

En la actualidad, existe un creciente interés por el impacto ecológico de los llamados *contaminantes emergentes* (CE). Este término se utiliza comúnmente para referirse a compuestos orgánicos de distinto origen y naturaleza química que tienen el potencial de acarrear efectos adversos en el medio ambiente y en la salud de la población (Petrie y col., 2015). Los CE comprenden una amplia gama de sustancias químicas, tales como productos farmacéuticos, productos de cuidado e higiene personal, agentes tensoactivos, plastificantes, pesticidas y aditivos industriales; siendo el reciente hallazgo de analgésicos (ibuprofeno, naproxeno, diclofenac, etc.) en aguas superficiales y subterráneas un hecho que ha despertado una gran preocupación. Las principales vías de introducción de estos últimos en el medio acuático son la excreción humana y la eliminación de productos no utilizados (Rzymiski y col., 2017). Además, se ha establecido que estos compuestos entran en el ambiente a través de aguas residuales de tipo doméstico e industrial, residuos de las plantas de tratamiento, efluentes hospitalarios y actividades agrícola-ganaderas (Stuart y col., 2012; Gil y col., 2013).

Los CE no están incluidos en el monitoreo actual de los programas de tratamiento de aguas residuales, ni las plantas de tratamiento convencionales están diseñadas para eliminarlos, motivo no sólo de preocupación para las entidades ambientales regulatorias sino también para la comunidad científica (Gavrilescu y col., 2015). Por lo tanto, el estudio de nuevas estrategias de biorremediación para la remoción de CE en aguas contaminadas, que además hagan uso de biomasa residual abundante y de bajo coste, es de notable interés para las sociedades modernas preocupadas por la aplicación de tecnologías de saneamiento más económicas y sustentables.

1.2.1. ANALGÉSICOS: IBUPROFENO

En los últimos años, se ha visto incrementada la presencia de compuestos farmacéuticamente activos en plantas de tratamiento de aguas domésticas. Muchas de estas sustancias son reconocidas por sus efectos dañinos, tanto para la salud como para el medioambiente (Almeida y col., 2013). Según las propiedades

fisicoquímicas de los fármacos, estas sustancias -o sus productos de degradación- pueden llegar a alcanzar las aguas subterráneas y contaminar los acuíferos; o bien quedar retenidas en el suelo y acumularse afectando al ecosistema y a los seres humanos a través de la cadena trófica (Stuart y col., 2012). En particular, para los productos farmacéuticos, no se encuentran normativas ambientales ni estándares de vertimiento vigentes (Stuart y col., 2012).

Los analgésicos son los fármacos de mayor consumo a nivel mundial debido a su elevada tasa de automedicación (Gil y col., 2013). Entre ellos, el ibuprofeno (ácido 2-4-metilpropil fenilpropanoico) es actualmente el tercer analgésico más utilizado en el mundo según un estudio relevado por la *Organización Mundial de la Salud* (Parolini y col., 2011). La prevalencia ambiental del ibuprofeno se debe principalmente a sus elevadas dosis terapéuticas (entre 600 a 1200 mg/día), ya que alrededor del 15% de este analgésico es excretado sin modificaciones por los seres humanos (Murdoch & Hay, 2015; Zur y col., 2018).

Debido a sus propiedades fisicoquímicas, este fármaco se caracteriza por una elevada movilidad en los ambientes acuáticos (Parolini y col., 2011). Se han detectado concentraciones de ibuprofeno de hasta 106 µg/L en aguas residuales crudas y 44 µg/L en efluentes tratados; y valores de hasta 5 µg/L en aguas superficiales; así como también la presencia de algunos de sus metabolitos secundarios (Almeida y col., 2013). Diversos estudios han demostrado que en concentraciones del orden de los ng/L y los µg/L, el ibuprofeno afecta el crecimiento y la reproducción de especies acuáticas, y posee efectos genotóxicos en peces (Flippin y col., 2007; Han y col., 2010; Ragugnetti y col., 2011). Además, se ha reportado que este fármaco puede actuar como disruptor endócrino e inductor de estrés oxidativo en diferentes organismos acuáticos (Gonzalez y Bebianno, 2012). Por otro lado, se ha demostrado que en concentraciones del orden de los µg/L, el ibuprofeno puede causar inhibición de la síntesis de genes involucrados en el desarrollo óseo, la respiración y las funciones inmunológicas, mientras que en altas concentraciones induce la expresión de genes relacionados con la regulación de la respuesta inflamatoria (Jeffries y col., 2015). Por lo tanto, es evidente la importancia de desarrollar métodos efectivos para la remoción de ibuprofeno del ambiente.

En general, los métodos más estudiados para la degradación de ibuprofeno han sido de tipo fisicoquímico, especialmente procesos de oxidación avanzados, tales como oxidación con ozono (Huang y col., 2015). Sin embargo, los intermediarios formados durante estos tratamientos han demostrado ser más tóxicos que el compuesto primario (Braz y col., 2014; Quero-Pastor y col., 2014; Huang y col., 2015). Por esta razón, la degradación microbiológica (*i.e.*, biodegradación) aparece como una alternativa prometedora. Sin embargo, aún es limitada la información respecto a cuáles son los metabolitos producidos por la eliminación biológica de este fármaco y los mecanismos involucrados en su degradación, así como su potencial impacto en el medioambiente (Almeida y col., 2013; Marchlewicz y col., 2017).

1.3. HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO

En la actualidad, a pesar de los enormes avances realizados en el estudio y aplicación de diferentes formas de energías renovables, el petróleo y sus derivados siguen siendo la mayor fuente de energía utilizada por la sociedad. La gran mayoría de los sistemas de transporte, tanto para la movilidad de las personas como para el comercio internacional, además de una proporción muy significativa de la demanda de calor y electricidad, se basan en la producción y consumo de derivados líquidos del petróleo (Thornley & Gilbert, 2013). En particular, nuestro país cuenta con un largo recorrido en la extracción de petróleo crudo. Actualmente, se pueden encontrar yacimientos en Chaco, Chubut, Mendoza, Neuquén, Río Negro y Salta. Se calcula que la industria química y petroquímica generan el 29,9% de los residuos peligrosos totales que se producen en Argentina y, en particular, la industria petrolera es la mayor generadora de residuos semisólidos (Brutti y col., 2018).

Todos los años, cerca de 1.300.000 toneladas de hidrocarburos entran al ambiente, aunque la mayor parte sucede a través de filtraciones naturales de petróleo (Di Paola y col., 2010). La mayoría de estos compuestos poseen cierto grado de toxicidad y, además, son muy recalcitrantes, por lo que han sido clasificados como *contaminantes prioritarios* por la *Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos* (USEPA, por sus siglas en inglés: *United State Environmental Protection Agency*).

Cuando la liberación de hidrocarburos es lenta, las propias comunidades locales de microorganismos (bacterias y hongos) actúan a medida que estos compuestos entran en el ambiente y son parcialmente degradados. Por lo tanto, las bacterias constituyen un mecanismo natural para la eliminación de hidrocarburos. Sin embargo, en el caso de las filtraciones que tienen lugar durante la exploración, la producción, el refinamiento, el transporte y el almacenamiento del petróleo crudo y sus derivados, la cantidad de hidrocarburos volcada al ambiente supera la capacidad de degradación de la comunidad microbiana nativa, provocando que estos compuestos se dispersen y conduzcan a graves problemas ecológicos.

Los derrames de hidrocarburos causados por la acción humana son una de las principales causas de contaminación, tanto del agua como del suelo, afectando directa o indirectamente a la salud humana y a muchas otras formas de vida, ya que la acumulación de estos contaminantes en los tejidos animales y vegetales puede causar mutaciones, e incluso la muerte (de Mesa y col., 2006; Das y col., 2011; Varjani y col., 2017; Brutti y col., 2018). Además, debido a su baja densidad, los hidrocarburos suelen acumularse en la superficie de las aguas impidiendo el intercambio gaseoso con la atmósfera e iniciando una serie de procesos fisicoquímicos simultáneos que, dependiendo del tipo de hidrocarburo, la cantidad vertida y las condiciones del entorno (temperatura, humedad, salinidad, etc.), pueden ser más o menos lentos, y generar mayor toxicidad o afectación del ecosistema acuático (de Mesa y col., 2006; Varjani y col., 2017).

Las tecnologías comúnmente utilizadas para la remediación de sitios impactados con hidrocarburos incluyen enterramiento, evaporación, incineración, dispersión y lavado. Sin embargo, estas técnicas son costosas y pueden llevar a una descomposición incompleta de los contaminantes, lo cual puede dar como resultado productos igualmente tóxicos (Das y col., 2011). La capacidad de degradación de hidrocarburos que algunos microorganismos poseen en forma natural ha dado lugar a la posibilidad de utilizar técnicas de biorremediación para la remoción de estos compuestos cuando los mismos son liberados al ambiente por causas antropogénicas (Varjani y col., 2017). Varios estudios han demostrado la superioridad del uso de cultivos mixtos frente a cultivos puros de microorganismos seleccionados para degradar hidrocarburos, debido a la mayor versatilidad metabólica de los consorcios

para utilizar estos compuestos como fuente de carbono (Varjani y col., 2017). Sin embargo, el éxito de la aplicación de estas estrategias de biorremediación en derrames de petróleo y sus derivados depende de establecer y mantener las condiciones que favorezcan la biodegradación bacteriana de los hidrocarburos en el ambiente contaminado. Los principales factores que afectan a la mineralización de hidrocarburos son el pH, la presencia y cantidad de nutrientes, y la tensión de oxígeno, ya que todos estos factores influyen en la tasa de crecimiento celular y, por ende, en la capacidad de biodegradación (Das y col., 2011; Toro y col., 2015; Sabullah y col., 2018).

En la actualidad, numerosas investigaciones están siendo focalizadas en la búsqueda de microorganismos con capacidad para degradar hidrocarburos -y otros contaminantes ambientales- en diferentes nichos y sistemas no estudiados con anterioridad; y en evaluar su capacidad de respuesta en distintas condiciones con el fin de desarrollar nuevas aplicaciones biotecnológicas para el control de la contaminación mediante su inoculación a campo, o como co-adyuvante en sistemas de tratamiento (Brutti y col., 2018). Por lo tanto, es necesaria la investigación enfocada en la búsqueda de nuevas estrategias de biorremediación y en la ponderación de sus efectos a largo plazo; así como en la valoración de su conveniencia en términos de costos y efectividad, para cada caso en particular.

2. OBJETIVOS

Objetivo general:

Analizar la microbiota pre-existente en muestras de lodos residuales provenientes del tratamiento anaeróbico de efluentes industriales, cedidos por una empresa local, con el fin de diseñar estrategias biotecnológicas orientadas a la eliminación de contaminantes ambientales persistentes y emergentes.

Objetivos específicos:

- Caracterizar el consorcio bacteriano presente en muestras de lodos residuales provenientes de una planta generadora de biogás, producidos durante el tratamiento anaeróbico de efluentes industriales no peligrosos de alta carga orgánica.
- Desarrollar y optimizar la aplicación de técnicas cromatográficas y espectroscópicas para la identificación y evaluación de hidrocarburos del diésel comercial e ibuprofeno.
- Evaluar y cuantificar, a escala laboratorio, la tasa de biodegradación de ibuprofeno utilizando los lodos residuales provistos.
- Evaluar y cuantificar, a escala laboratorio, la tasa de biodegradación de hidrocarburos del diésel comercial utilizando bacterias aisladas de las muestras de lodo en estudio.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DEL BARRO.

Las muestras de lodo biológico fueron gentilmente provistas por la empresa SOLAMB S.R.L. (<http://www.solamb.com.ar>). Las mismas se recolectaron en la planta de tratamiento de efluentes industriales que dicha empresa posee en la localidad de Timbúes (Santa Fe, Argentina), y fueron trasladadas al laboratorio en condiciones de refrigeración (4 °C) en frascos de vidrio opaco color caramelo, de 1 L de capacidad, para su posterior análisis. Los siguientes valores promedio fueron obtenidos mediante la caracterización fisicoquímica de las muestras, a partir de diferentes lotes, aplicando protocolos estandarizados (SM2540B y SM2540E): pH (7,41 ± 0,02), conductividad (13,3 ± 2,3 mS/cm), DQO (1320 ± 50 mg/L), sólidos totales (31500 ± 1750 mg/L) y sólidos volátiles (14100 ± 975). La población microbiana presente en las muestras de lodo residual se determinó dentro de las primeras 24 h de recolectadas las mismas mediante la enumeración de heterótrofas totales en medio agar nutritivo (PCA, Britania S.A., Buenos Aires, Argentina). Para ello, se realizaron diluciones seriadas en solución salina (NaCl 0,9%) y se sembraron alícuotas de 10 y 100 µL por placa, dejándolas incubar a 37 °C durante 24 h en una estufa de cultivo (Tecno Dalvo S.R.L., Santa Fe, Argentina). Mediante el recuento de colonias se determinó una concentración promedio de heterótrofas totales de 5,8 ± 0,5 log UFC/mL.

3.2. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR.

Se emplearon bioreactores de 125 mL de capacidad en los cuáles se colocó 1 mL de una suspensión de lodo biológico (1/30) preparada en *buffer* fosfato (pH 7,0) ó 100 µL de una suspensión bacteriana (aprox. 10⁸ UFC/mL) de distintas cepas de *Pseudomonas* sp., a los cuales se le adicionó 0,5 mg/mL de TTC (cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio) y Glucosa (Glu) 1% (v/v), ibuprofeno (Ibu) 5 ppm ó diésel comercial B10 (Shell V-Power ®), como únicas fuentes de carbono adicional.

El TTC es un indicador redox que al entrar en contacto con los microorganismos metabólicamente activos es reducido por las deshidrogenasas bacterianas a 1,3,5-trifenilformazán, un compuesto de color rojo cuya absorbancia máxima se encuentra localizada a 485 nm (Fig. 2). De esta manera, el grado de acumulación intracelular del colorante es proporcional a la cantidad de biomasa bacteriana, la cual dependerá de la capacidad de los microorganismos para metabolizar los compuestos suministrados (Berridge y col., 2005).

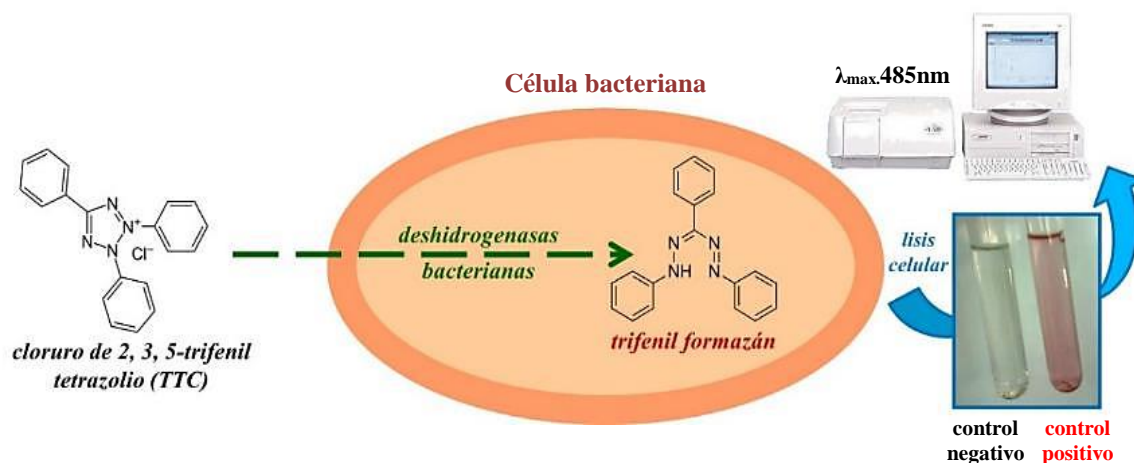


Figura 2. Esquema descriptivo del bioensayo colorimétrico indirecto utilizado para la evaluación de la actividad metabólica de los microorganismos del lodo en presencia de diferentes compuestos orgánicos, mediante la cuantificación espectrofotométrica del contenido intracelular de formazán.

Para determinar la acumulación intracelular del colorante se tomó 1,0 mL de muestra de cada bioreactor, a diferentes períodos de incubación (horas o días), según el objetivo de cada experiencia. Las muestras fueron centrifugadas a $3000 \times g$ durante 5 min. para sedimentar los microorganismos. Luego de eliminar el sobrenadante, se procedió a efectuar la lisis de las células bacterianas mediante el agregado de 1,0 mL de acetona 80% (v/v), seguido de una posterior etapa de sonicación en un baño ultrasónico (10 min.). Finalmente, se realizó una segunda centrifugación (5 min., $5000 \times g$) con el objetivo de decantar los restos celulares, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 485 nm empleando un espectrofotómetro UV-Vis Lambda 25 (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, Estados Unidos). Los experimentos se realizaron por triplicado ($n = 3$).

3.3. ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN DE IBUPROFENO.

Se adicionó Ibu (5 ppm) a 60 mL de una suspensión de lodo biológico (1/30) en *buffer* fosfato (pH 7,0), y se incubó en un baño termostatzado con agitación (37 °C, 150 r.p.m.). A diferentes periodos de tiempo (0-96 h), se tomaron alícuotas de 3,0 mL de la suspensión y determinó la concentración residual de Ibu en la columna de agua mediante espectroscopía de fluorescencia ($\lambda_{exc.272}/\lambda_{em.288}$) empleando un espectrofluorómetro Shimadzu RF-5301 PC (Shimadzu Corp., Japón). El procedimiento de calibración de la respuesta fluorescente de Ibu en presencia de la matriz del barro residual arrojó valores estables y reproducibles ($r^2 > 0,98$).

3.4. EXTRACCIÓN DE ADN, SECUENCIACIÓN Y ASIGNACIÓN TAXONÓMICA.

El ADN genómico microbiano se extrajo de las muestras de barro residual utilizando el *kit* comercial PowerMax® Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc., QuiaGen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN fue cuantificado utilizando el *kit* Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA assay (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Se confeccionó una biblioteca del gen correspondiente al ARNr 16S basada en el procedimiento descrito en la Guía Illumina para “*Preparación de Muestras*”. Brevemente, las regiones V3 y V4 del gen codificante para el ARNr 16S se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (95°C por 3 min., seguido de 25 ciclos a 95°C por 30 s, 55°C por 30 s, y 72°C por 30 s, seguidos de una extensión final a 72°C por 5 min.) usando los cebadores: 341F: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGG GGGCGCAG-3' y 805R: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGAC TACGGGTATCTAATCC-3'. Para la reacción de PCR se colocaron 2,5 µL de ADN genómico (5 ng/mL), 5 µL de cada cebador (1 mM), 1,5 µL de 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix y agua de calidad para PCR hasta alcanzar un volumen final de 25 µL. Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado agrupándose los productos finales en un único volumen. El ADN amplificado se purificó utilizando perlas AMPure XP (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, Estados

Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó una PCR indexada (95°C por 3 min., seguido de 8 ciclos a 95°C por 30 s, 55°C por 30 s, y 72°C por 30 s, seguidos de una extensión final a 72°C por 5 min.) utilizando los cebadores N7xx y S5XX Nextera XT Index. La mezcla de reacción (volumen final de 50 µL) se preparó adicionando 5 µL de muestra de ADN, 5 µL de cada cebador (1 mM), 25 µL de 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix, y 10 µL de agua (calidad PCR). Se realizó un segundo paso de purificación con perlas AMPure XP (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, Estados Unidos) para la limpieza final de la biblioteca. Luego, la misma se cuantificó utilizando el *kit* Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA assay (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y, finalmente, los diferentes fragmentos fueron secuenciados empleando la plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, Estados Unidos). El pre-procesamiento bioinformático de los datos y la clasificación y asignación taxonómica se realizaron siguiendo el procedimiento descrito por [Piazza y col. \(2019\)](#). Las secuencias fueron agrupadas en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) con un nivel de similitud del 97% aplicando una estrategia de referencia abierta implementada en QIIME. Estos análisis se realizaron en el *Instituto de Agrobiotecnología de Rosario* (<https://www.indear.com>).

3.5. ESTUDIO DE LA BIODEGRADACIÓN DE DIÉSEL COMERCIAL UTILIZANDO BACTERIAS AISLADAS DEL LODO RESIDUAL.

3.5.1. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

Para evaluar el crecimiento de las bacterias aisladas del lodo residual con potencial para degradar diésel comercial, se adicionaron 100 µL de una suspensión bacteriana ajustada al 0,5 de la escala de McFarland (aprox. 1.5×10^8 CFU/mL) a 50 mL de medio Bushnell-Hass (pH 7,0) conteniendo diésel B10 1% (v/v), como única fuente de carbono. Los frascos se incubaron en agitación (150 r.p.m.) a 37 °C durante 15 días en un baño termostático (SHZ-88, Arcano, Shanghai, China). La densidad celular se evaluó periódicamente registrando la absorbancia a 600 nm (D.O._{600nm})

utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Lambda 25 (Perkin Elmer, Inc., Waltham, MA, Estados Unidos). Los ensayos fueron realizados por triplicado ($n = 3$).

3.5.3. ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN.

Los experimentos de biodegradación de diésel comercial se llevaron a cabo en frascos estériles de 125 mL de capacidad (biorreactor) conteniendo 50 mL de medio salino Bushnell-Haas (pH 7,0), al cual se le adicionó diésel B10 1% (v/v) como única fuente de carbono, y 100 μ L de una suspensión bacteriana (aprox. 10^8 UFC/mL) de las distintas cepas en estudio como inóculo. Los frascos se incubaron en agitación (150 r.p.m.) a 37 °C durante 15 días en un baño termostatzado (SHZ-88, Arcano, Shanghai, China). Luego de la incubación, se adicionaron 5,0 mL de *n*-hexano a cada biorreactor para extraer los compuestos orgánicos remanentes del diésel comercial. Después de agitar vigorosamente las muestras durante 1 min., las mismas fueron centrifugadas durante 10 min. en una centrífuga Tyfon II (Zelian Instruments, Buenos Aires, Argentina). Finalmente, se colectaron 3 mL del sobrenadante y se filtraron utilizando una membrana de PTFE (tamaño de poro = 0.45 μ m) con el fin de analizar la composición cuali-cuantitativa del diésel B10 residual por cromatografía gaseosa (CG-FID). Paralelamente, se procesaron biorreactores *control* conteniendo diésel B10 1% (v/v) en medio Bushnell-Haas (pH 7,0), sin inocular, que fueron incubados de igual manera que las muestras para ser utilizados en el monitoreo de la pérdida de diésel comercial por procesos abióticos. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado ($n = 3$).

3.5.4. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA DEL DIÉSEL COMERCIAL (B10).

La determinación cuali-cuantitativa de los componentes principales del combustible diésel B10 se llevó a cabo mediante cromatografía gaseosa con detección por ionización a la llama (CG-FID) utilizando un equipo SCION 436-GC (Scion Instruments, Techcomp USA Inc., Fremont, CA, Estados Unidos) y una columna capilar de sílica fundida de 30 m de longitud (Rtx-5, Restek Co., Bellefonte, PA,

Estados Unidos). La temperatura del inyector y del detector se fijó en 275°C. La temperatura inicial de la columna se estableció en 90°C, aumentando posteriormente hasta 300°C a razón de 7 °C/min, y finalmente permaneciendo a 300°C durante 1 min. Las muestras (1 µL) fueron inyectadas utilizando una relación de *split* 1:20. Como gas portador se utilizó nitrógeno 5.0 (N₂) a una velocidad de flujo de 1 mL/min. La eficiencia de biodegradación (BE) de las distintas fracciones del diésel comercial (petroquímica y biodiesel) fueron calculadas utilizando la ecuación descrita por [Michaud y col. \(2004\)](#):

$$BE (\%) = 100 - \frac{A_s * 100}{A_{ac}}$$

, donde A_s es el área total de los picos seleccionados (fracción C₁₁-C₂₂ o fracción biodiesel -llamada FAME-) en cada muestra, luego de la incubación; y A_{ac} es el área total de los picos seleccionados en el control abiótico después del mismo periodo de tratamiento.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Los datos experimentales fueron analizados utilizando el programa estadístico SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., Estados Unidos) aplicando el test de ANOVA (análisis de la variancia). Cuando el efecto de los factores estudiados fue significativo ($p < 0,05$) se procedió a realizar la prueba *Honestly Significant Difference* (HSD) de *Tukey* para efectuar comparaciones múltiples con un nivel de confianza del 95 %.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DEL LODO INDUSTRIAL.

La empresa SOLAMB S.R.L. posee en su planta de Timbúes (Santa Fe, Argentina) dos biodigestores anaeróbicos, de 3.000 m³ cada uno, para el tratamiento de efluentes líquidos de alta carga orgánica (DQO > 40.000 mg/L) provenientes de industrias de la región (LDC ARGENTINA S.A., CARGILL S.A., COFCO ARGENTINA S.A., RENOVA S.A., NESTLÉ ARGENTINA S.A., BUNGE ARGENTINA S.A., etc.) (Fig. 3). Este tratamiento permite poner en parámetros de volcamiento a dichos líquidos residuales y obtener biogás, el cual se purifica y se utiliza para la co-generación de energía eléctrica y térmica (<http://www.solamb.com.ar>).



Figura 3. Fotografía aérea de los biodigestores anaeróbicos ubicados en la “Planta Timbúes” de la empresa SOLAMB S.R.L. (fotografía cedida por gentileza de la empresa).

Durante el tratamiento de los líquidos y la biodegradación de la materia orgánica, además del efluente tratado y del biogás producido, se generan lodos que van precipitando y que periódicamente deben ser removidos para mantener el sistema estable. Estos lodos, incluso una vez extraídos de los biodigestores, poseen una actividad biológica considerable, la cual fue objeto de estudio para los propósitos del presente trabajo de tesina. Los diferentes lotes de lodos utilizados durante el desarrollo de este trabajo fueron tomados siempre en el mismo punto de muestreo por personal de la empresa, y caracterizados en el laboratorio dentro de las 24 h de

haber sido recolectadas las muestras. Los valores de los diferentes parámetros fisicoquímicos determinados y de la carga bacteriológica que se informan en la Tabla I fueron obtenidos a partir del procesamiento de 8 lotes de lodo, colectados en distintas campañas de muestreo, a lo largo de un año.

Tabla I. Determinación de parámetros fisicoquímicos y de la carga bacteriológica de diferentes lotes de lodo residual obtenidos a partir de distintas campañas de muestreo.

Lote N°	Fecha de muestreo	pH	Cond. (mS/cm)	DQO Sol. (mg/L)	Sólidos Totales (mg/L)	Sólidos Volátiles (mg/L)	Recuento en placa (UFC/ml)	Log UFC/ml
1	27/02/2018	7,43	11,5	950	21200	8700	9,3 x 10 ⁴	5,0
2	26/04/2018	7,29	16,4	1050	25800	10500	1,8 x 10 ⁶	6,3
3	29/05/2018	7,32	12,2	1550	31000	13750	9,1 x 10 ⁵	6,0
4	02/07/2018	7,32	13,3	1450	34500	15750	1,1 x 10 ⁶	6,0
5	22/09/2018	7,53	14,5	1230	26600	11000	1,2 x 10 ⁵	5,1
6	15/10/2018	7,31	13,6	1150	46800	22800	1,6 x 10 ⁶	6,2
7	01/11/2018	7,52	14,2	1650	41000	19300	1,5 x 10 ⁶	6,2
8	22/11/2018	7,52	12,1	1530	25100	11000	2,4 x 10 ⁵	5,4

Los valores promedio de cada una de las variables mensuradas fueron: pH ($7,41 \pm 0,02$), conductividad ($13,3 \pm 2,3$ mS/cm), DQO (1320 ± 50 mg/L), sólidos totales (31500 ± 1750 mg/L), sólidos volátiles (14100 ± 975) y concentración de heterótrofas totales ($5,8 \pm 0,5$ log UFC/mL). Estos resultados muestran una marcada estabilidad del sistema, la cual es coherente con el tipo de alimentación que reciben los biodigestores, sumado a la evaluación y el control periódico y riguroso que la empresa realiza sobre los mismos. Esta primera información es radical en vistas de las potenciales aplicaciones biotecnológicas de los lodos en estudio, ya que es fundamental contar con un material cuya composición sea relativamente estable y uniforme. A su vez, el gran volumen de los biodigestores permite que los lodos que se generan no sufran mayores variaciones en su composición frente a pequeñas modificaciones del entorno y/o el grado de alimentación, demostrando que este tipo de sistema de tratamiento posee una gran capacidad *buffer*.

4.2. DETERMINACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD DE IBUPROFENO.

Con el fin de evaluar la factibilidad de la aplicación de los lodos biológicos residuales provistos por la empresa SOLAMB S.R.L. para la eliminación de ibuprofeno en matrices acuosas, se procedió a la inoculación de barro en una solución *buffer* fosfato salino (pH 7,0) preparada con la adición de 5 ppm del mencionado analgésico. En la Fig. 4 se observa la cuantificación diaria, durante 96 h, de la concentración residual de ibuprofeno en la columna de agua, realizada mediante espectroscopía de fluorescencia.

Como puede observarse, la concentración del fármaco disminuyó un $34 \pm 2\%$ ($p < 0,05$) en las primeras 24 h, sugiriendo una rápida eliminación, aunque incompleta, en las condiciones ensayadas. Resultados similares han sido reportado por otros autores en experiencias análogas. En un estudio reciente, [Aissaoui y col. \(2017\)](#) evaluaron la tasa de biodegradación de ibuprofeno utilizando un consorcio bacteriano sintético preparado a partir de bacterias aisladas de un compost doméstico y de un lodo activado proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales. Estos autores reportaron una tasa de eliminación del fármaco cercana al 23% en 24-48 h, en experiencias realizadas en medio mínimo salino con la incorporación de 3 ppm de ibuprofeno como única fuente de carbono.

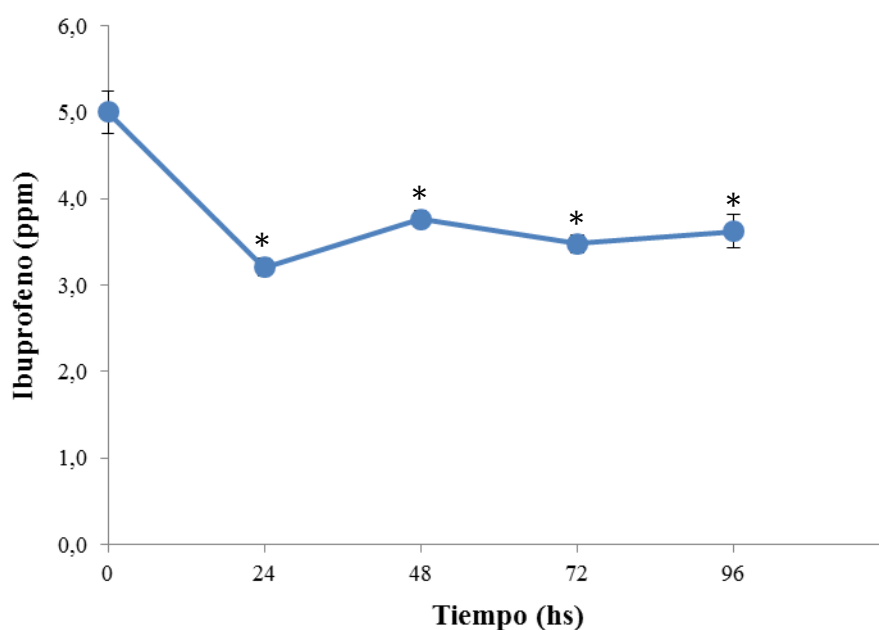


Figura 4. Cinética de eliminación de ibuprofeno (5 ppm) en una muestra de agua contaminada artificialmente tratada con barro biológico residual obtenido de una planta generadora de biogás. *diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto del valor de concentración de ibuprofeno a tiempo inicial.

Para explicar si la disminución observada en la concentración del fármaco se encuentra efectivamente relacionada con la acción de microorganismos potencialmente degradadores presentes en el lodo biológico, descartando posibles interacciones o efectos abióticos (*i.e.*, adsorción) entre el ibuprofeno y la matriz compleja del lodo, se evaluó la actividad deshidrogenasa del barro en presencia de ibuprofeno como fuente de carbono adicional.

Tal como se muestra en la Fig. 5, al inocular una suspensión de lodo con 5 ppm de ibuprofeno se observó un aumento significativo en la actividad deshidrogenasa a las 24 h de incubación, indicativo de un incremento en la viabilidad celular. La actividad de enzimas degradativas, como las deshidrogenasas bacterianas, es un índice que suele utilizarse frecuentemente para describir la actividad microbiológica durante la biorremediación de sustancias tóxicas y contaminantes ambientales (Kumari y col., 2016).

Adicionalmente, este aumento en la actividad metabólica de las bacterias del barro fue similar al alcanzado, en igual periodo de tiempo, frente a la incorporación

de glucosa 1% (v/v), utilizada como control positivo de la inducción de actividad deshidrogenasa.

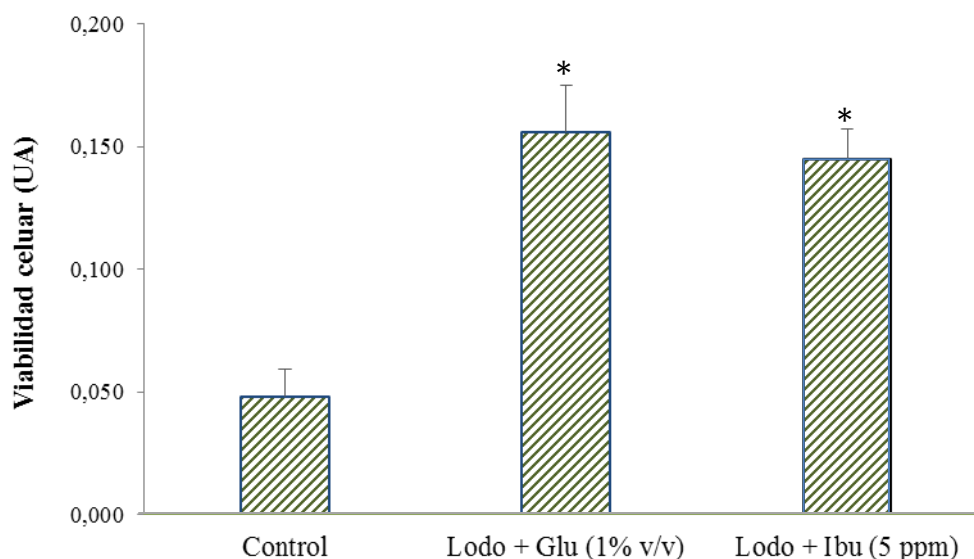


Figura 5. Incremento en la actividad deshidrogenasa de una suspensión de lodo a las 24 h de la adición de glucosa (Glu 1% v/v) o ibuprofeno (Ibu 5 ppm) como fuente de carbono orgánico adicional. *diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto del grupo *control*.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que en las muestras de barros biológicos analizadas, existen microorganismos capaces de utilizar ibuprofeno como sustrato metabólico para sus actividades celulares, sugiriendo la potencial aplicación de estos lodos residuales en protocolos de biorremediación orientados a la eliminación de este reconocido contaminante emergente en matrices acuosas.

En este punto, es interesante remarcar que, a pesar de la relevancia ambiental del ibuprofeno, las rutas metabólicas involucradas en la biodegradación aeróbica y anaeróbica de este fármaco aún permanecen desconocidas. Hasta el presente, existen sólo algunos ejemplos de las reacciones enzimáticas potencialmente involucradas en la biodegradación bacteriana de ibuprofeno, aunque la mayoría han sido descritas para cepas puras aisladas de diferentes matrices ambientales (Almeida y col., 2013; Murdoch & Hay, 2013; 2015; Marchlewicz y col., 2017b; Żur y col., 2018).

Adicionalmente, algunos autores han sugerido que los organismos vivos pueden transformar el ibuprofeno en intermediarios metabólicos aún más tóxicos que el compuesto parental (Kayani y col. 2009, Parolini y col., 2011; Marchlewicz y col., 2017a; Żur y col., 2018). Sin embargo, éste no pareciera ser el caso frente a la acción metabólica del consorcio del barro en función de los valores de viabilidad alcanzados en presencia de ibuprofeno, ya que éstos fueron similares a los obtenidos con glucosa, un compuesto que es completamente metabolizado a CO₂ sin la generación de metabolitos tóxicos. Esto podría estar relacionado a la acción sinérgica de los distintos microorganismos que componen la microbiota del lodo, ya que al actuar en forma acoplada, los productos de degradación de un grupo de bacterias podrían ser utilizados como sustrato metabólico por otro grupo de microorganismos, minimizando así la liberación de intermediarios de degradación del ibuprofeno, potencialmente tóxicos.

4.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA MICROBIOTA CONSTITUYENTE DEL LODO RESIDUAL.

Con el fin de evaluar la presencia de bacterias con capacidad para degradar contaminantes ambientales, que pueda explicar parcialmente la degradación de ibuprofeno demostrada en los apartados anteriores, se realizó un análisis metagenómico de la población bacteriana presente en el lodo crudo mediante amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S. Esta técnica es ampliamente utilizada para la identificación de cepas bacterianas y clasificación filogenética, a distintos niveles taxonómicos, particularmente en muestras o matrices complejas (Simon & Daniel, 2011).

Como se puede apreciar en la Fig. 6 A, *Firmicutes* demostró ser el filo dominante en el lodo residual proveniente de la planta de biogás, seguido por *Synergistetes* y *Proteobacteria* (con mayoría de las subclases *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, y *Epsilonproteobacteria*). En forma consistente con estos resultados, diversos estudios le han otorgado un rol importante en la degradación de xenobióticos, entre ellos hidrocarburos e ibuprofeno, a numerosas bacterias incluidas

en la subclase *Gammaproteobacteria* (Kostka y col., 2011; Liu & Liu, 2013; Aissaoui y col., 2017; Žur y col., 2018).

Por otro lado, en las muestras de lodo biológico analizadas también se encontraron bacterias pertenecientes a los filos *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* y *Thermotogae* (Fig. 6 A). En particular, es interesante notar la presencia de un 4,5% de unidades taxonómicas operativas (OTUs, de sus siglas en inglés: *Operational Taxonomic Units*) asignadas a un grupo de bacterias denominado WWE1 (del inglés, *Wastewater of Evry*). Este singular grupo de microorganismos no-cultivables fue descubierto por primera vez durante el análisis molecular de la microbiota existente en un biodigestor mesofílico ($35 \pm 0,5$ °C) anaeróbico situado en la comuna francesa de Evry (Chouari y col., 2005), y desde entonces, su presencia ha sido frecuentemente reportada en ecosistemas anaeróbicos (Limam y col., 2014; Sun y col., 2015). Sin embargo, el rol ecofisiológico del grupo WWE1 en estos complejos sistemas microbianos aún permanece incierto.

Por su parte, la Fig. 6 B muestra la abundancia relativa porcentual (%) de los órdenes bacterianos más representativos presentes en las muestras de lodos biológicos residuales provistas por la empresa SOLAMB S.R.L.. Como puede evidenciarse, el grupo menos abundante correspondió al orden *Deltaproteobacteria* (*Desulfobacterales*, *Desulfovibrionales* y *Desulfomonadales*), mientras que entre los más abundantes se hallaron bacterias correspondientes a los órdenes *Clostridiales*, *Bacteroidales* y *Synergistales*. Tal como era de esperarse de acuerdo con el origen anaeróbico-facultativo de las muestras analizadas (*i.e.*, provenientes de una planta generadora de biogás), todas las arqueobacterias encontradas en el lodo fueron asignadas como pertenecientes al filo *Euryarchaeota*; principalmente bacterias metanogénicas incluidas en los órdenes *Methanomicrobiales* y *Metahnosarcinales* (Fig. 6).

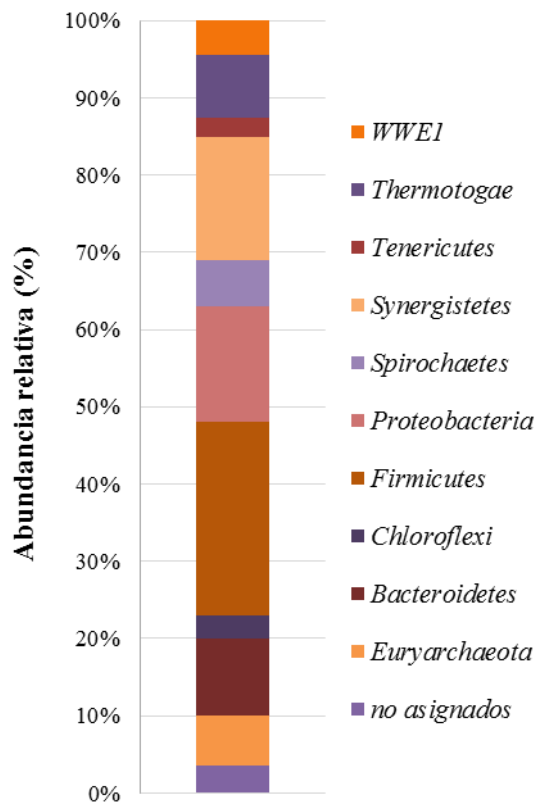
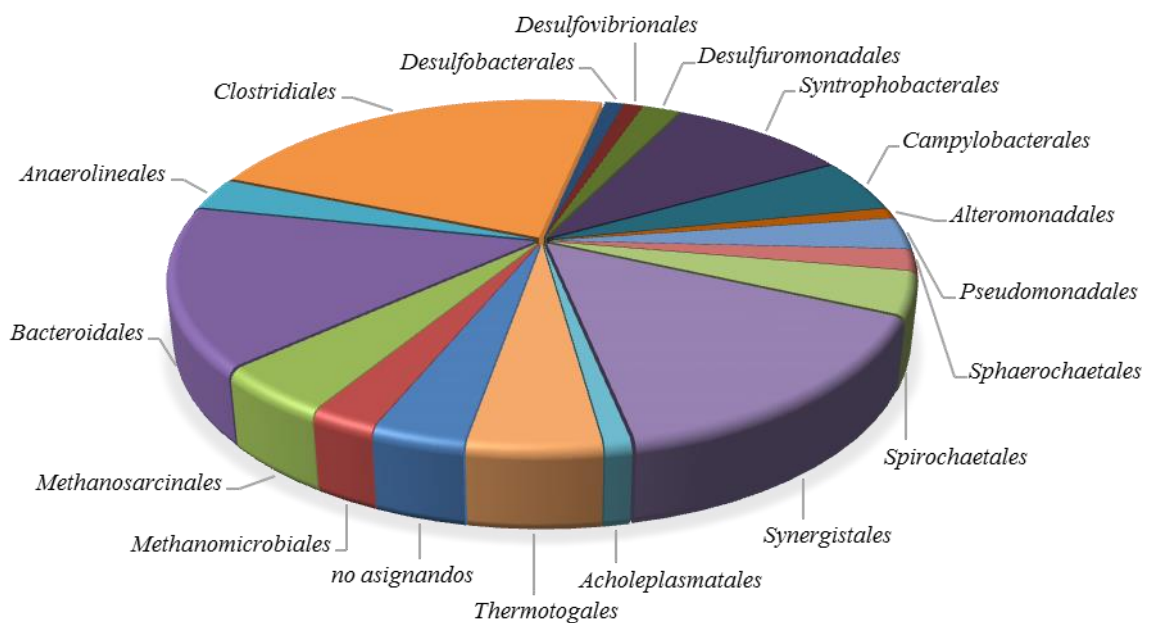
A

Figura 6. Composición taxonómica de las bacterias presentes en el lodo biológico proveniente de una planta generadora de biogás. La abundancia relativa (%) de cada grupo de microorganismos se representa con diferentes colores a nivel de **(A)** filos y **(B)** órdenes.

B

Notablemente, la microbiota hallada en las muestras de lodo analizadas en este estudio mostraron una considerable similitud con otras comunidades microbianas encontradas en ecosistemas contaminados crónicamente con hidrocarburos de petróleo y otros xenóbioticos ambientales. Por ejemplo, los órdenes *Thermotogales*, *Clostridiales*, *Desulfobacterales*, *Desulfuromonadales* y *Syntrophobacterales* han sido identificados en microbiomas de sedimentos con capacidad de degradar hidrocarburos ligado a procesos de metanogénesis (Michas y col., 2017). Además, un 3,5% de las OTUs reportadas en las muestras de lodo analizadas en el presente estudio correspondieron a microorganismos pertenecientes al orden *Pseudomonadales*. Este importante grupo de bacterias facultativas es particularmente interesante, ya que una gran cantidad de microorganismos agrupados en este orden, tales como *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas* spp., han demostrado ser muy versátiles para la biodegradación de numerosos y diversos contaminantes ambientales, entre ellos hidrocarburos y analgésicos, y en particular ibuprofeno (Jasmine & Mukherji, 2014; Liu, 2014; Mnif y col., 2011; 2015; Parthipan y col., 2017; Aissaoui y col., 2017; Żur y col., 2018). Más aún, en estudios recientes llevados adelante por el Grupo de Biotecnología de Materiales y Medioambiente (Bio&TecMA, UCA-CONICET), Loureiro y col. (2018a,b) lograron aislar e identificar -a partir de muestras de lodo análogas a las utilizadas en el presente trabajo sometidas a diferentes protocolos de presión de selección- distintas cepas con potencial para degradar diésel e ibuprofeno; destacándose la presencia de bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*. Este grupo de microorganismos es reconocido por su eficiente capacidad para degradar tóxicos ambientales, y distintas *Pseudomonas* han sido ampliamente utilizadas en protocolos de bioaugmentación para la eliminación de hidrocarburos y otros compuestos complejos, ya sea en forma aislada o como parte de consorcios bacterianos mixtos (Das & Chandran, 2011; Mnif y col., 2011; 2015; Obayori y col., 2009; Wasi y col., 2013).

Por lo tanto, como parte de los objetivos del presente trabajo de tesina se continuó con la profundización de los estudios orientados a la caracterización de la capacidad degradativa de diésel comercial de tres cepas de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. stutzeri* y *P. mendocina*) aisladas del lodo residual en estudio.

4.4. DETERMINACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD DE HIDROCARBUROS DEL DIÉSEL COMERCIAL POR CEPAS DE *Pseudomonas* sp. AISLADAS DEL LODO CRUDO.

4.4.1. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

Se analizó la capacidad de tres especies de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. stutzeri* y *P. mendocina*) aisladas del lodo residual para crecer a expensas de diésel comercial como única fuente de carbono. Para ello, se evaluó la cinética de crecimiento de las tres cepas en forma independiente al ser inoculadas en un medio mínimo salino (Bushnell-Haas) suplementado con diésel B10 (1% v/v) como único nutriente orgánico, determinándose periódicamente la evolución en la densidad óptica de los cultivos a 600 nm (D.O._{600nm}) durante 15 días.

Como se muestra en la Fig. 7, se observó un incremento significativo en la D.O._{600nm} de los cultivos para las tres cepas estudiadas, indicativo de un aumento en el número de células a expensas del diésel B10 como única fuente de carbono. Por lo tanto, estos resultados sugieren que las tres cepas de *Pseudomonas* aisladas del lodo residual podrían ser bacterias potencialmente degradadoras de hidrocarburos. Notablemente, el perfil de crecimiento observado para *P. aeruginosa* y *P. stutzeri* mostró ser más rápido y significativo que el observado para *P. mendocina*, sugiriendo una mejor capacidad de asimilación de diésel B10 para estas dos primeras cepas (Mnif et al., 2015).

Por otro lado, el patrón de crecimiento observado para *P. mendocina* mostró una fase *lag* de aproximadamente 4 días y, a partir de allí, un crecimiento leve pero sostenido hasta el final del período de ensayo (15 días), en donde aún no se vio alcanzada su fase estacionaria. Por lo tanto, este comportamiento permitiría *a priori* descartar una insuficiente cantidad de nutrientes y/o potenciales cambios en el medio a lo largo del período de incubación que pudieran haber sido perjudiciales para las células, afectando su supervivencia, tales como la acumulación o liberación de desechos metabólicos potencialmente tóxicos.

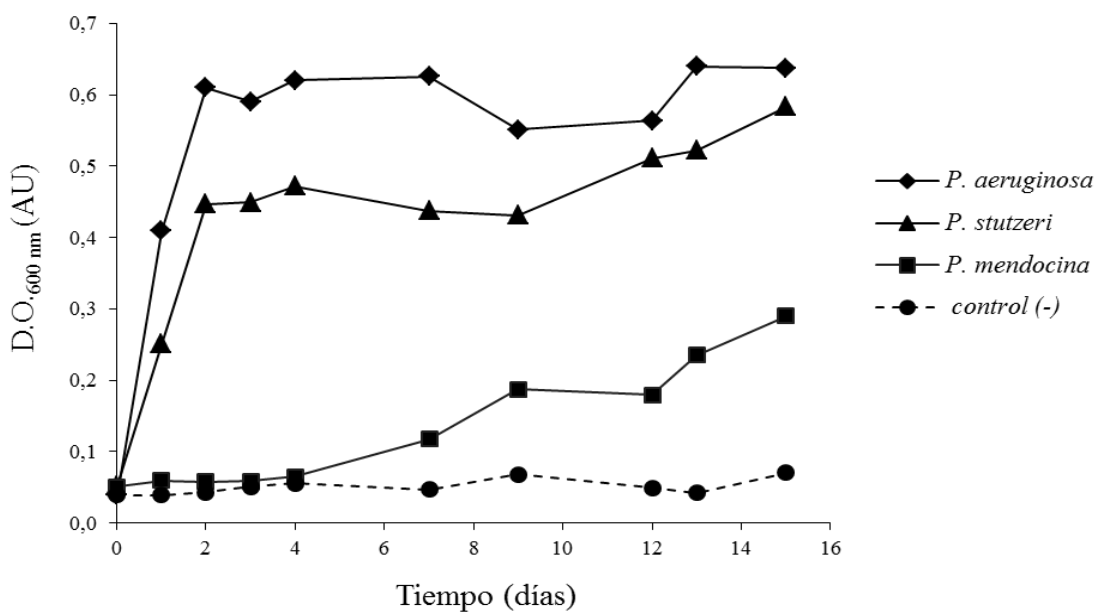


Figura 7. Perfil de crecimiento de las cepas seleccionadas, aisladas del lodo residual, en un medio mínimo salino (Bushnell-Haas) adicionado con diésel B10 1% (v/v) como única fuente de carbono. *P. aeruginosa* (◆); *P. stutzeri* (▲); *P. mendocina* (■); control negativo (●).

Para avanzar en la comprobación de la hipótesis acerca de que el crecimiento celular observado en la Fig.7 se debe a un aumento en la actividad metabólica de las cepas estudiadas a expensas del catabolismo de los componentes del diésel comercial; se aplicó una metodología colorimétrica que permite evaluar y cuantificar la viabilidad de los microorganismos en presencia de distintas fuentes de carbono. Estos experimentos se llevaron a cabo empleando un indicador *redox*, el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC), el cual se ha utilizado ampliamente para evaluar la respiración celular (Praveen-Kumar & Tarafdar, 2003). El TTC, en su forma oxidada, es un compuesto incoloro que es reducido enzimáticamente a 1,3,5-trifenilformazán, de color rojo, en presencia de microorganismos metabólicamente activos, debido a la acción enzimática de las deshidrogenasas celulares (Kaczyńska y col., 2015). Por lo tanto, la cantidad de formazán generado y acumulado intracelularmente es proporcional a la biomasa bacteriana, e indica que los microorganismos son capaces de metabolizar las fuentes de carbono suministradas (Berridge y col., 2005). La detección de formazán se realiza espectrofotométricamente, una vez lisadas las células, midiendo la absorbancia del líquido sobrenadante en la región visible del

espectro electromagnético a 485 nm (Praveen-Kumar & Tarafdar, 2003; Ghaly & Mahmoud, 2006; Brown y col., 2013).

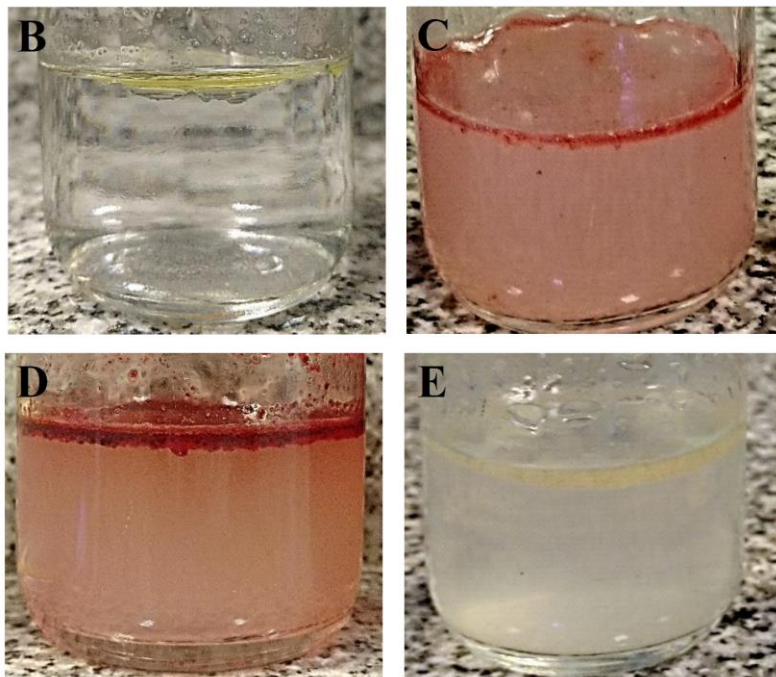
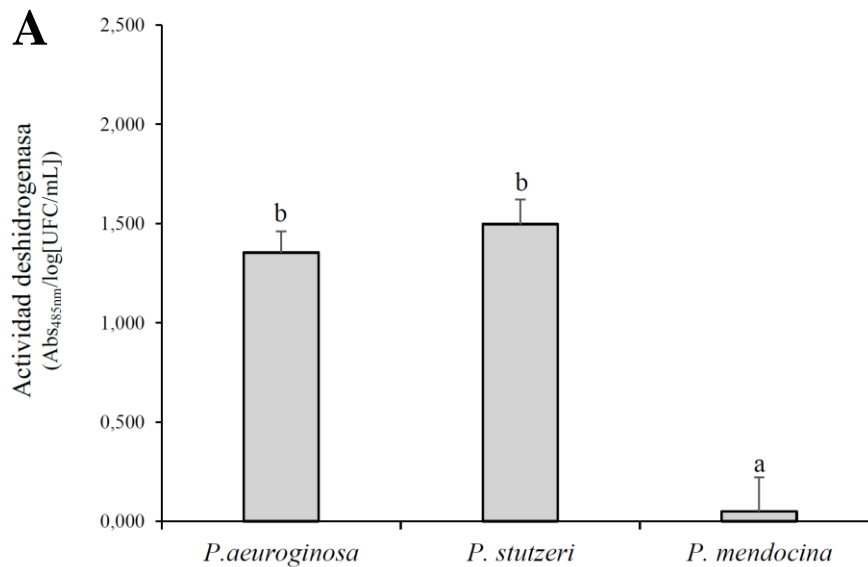


Figura 8. (A) Cuantificación de la actividad deshidrogenasa de cepas aisladas del lodo residual luego de 15 días de incubación (37 °C, 150 r.p.m.) en medio mínimo salino (Bushnell-Hass) suplementado con diésel B10 1% (v/v) como única fuente de carbono. La coloración roja de la células es indicativa de una elevada actividad celular. (B) control negativo (sin inóculo); (C) *P. aeruginosa*; (D) *P. stutzeri*; (E) *P. mendocina*.

En la Fig. 8A se puede apreciar una inducción significativa de la actividad deshidrogenasa para *P. aeruginosa* y *P. stutzeri*, luego de 15 días de incubación en medio Bushnell-Haas (pH 7,0) suplementado con diésel B10 (1% v/v) como única fuente de carbono. Notablemente, para ambas cepas, se pudo evidenciar un importante número de células bacterianas metabólicamente activas (*i.e.*, de color rojo) adheridas superficialmente a la capa orgánica diésel (Fig. 8C y Fig. 8D).

Por el contrario, no se pudo cuantificar actividad deshidrogenasa (Fig. 8A) ni detectar la presencia de células metabólicamente activas en los cultivos de *P. mendocina* (Fig. 8E). Sin embargo, sí fue posible apreciar una turbidez significativa luego de 15 días de incubación en presencia de diésel comercial como única fuente de carbono, en comparación a lo observado para el grupo *control* (Fig. 8B). Este resultado es consistente con las mediciones de D.O._{600nm} reportadas en la Fig. 7 para esta bacteria. La falta de coloración en las células de *P. mendocina* puede deberse a una inhabilidad de estas bacterias para utilizar el TTC como aceptor de electrones, ya que los microorganismos poseen distintas deshidrogenasas con diferente capacidad para reducir el TTC (Praveen-Kumar & Tarafdar, 2003). Además, se ha demostrado que la inducción de enzimas degradativas durante la biodegradación de combustibles depende de la composición del mismo y puede verse afectada por los subproductos de degradación que se generan durante el catabolismo microbiano (Kumari y col., 2016). Por otro lado, se necesitan condiciones óptimas de cultivo para que las bacterias puedan reducir eficientemente el TTC a formazán. Por lo tanto, en condiciones de estrés nutricional, como parecería ser el caso para *P. mendocina*, podría producirse una reducción incompleta del colorante (Brown y col., 2013; Ghaly & Mahmoud, 2006).

En conclusión, los diferentes patrones de crecimiento observados para las tres cepas analizadas, junto a las diferencias encontradas en la inducción de la actividad degradativa, demuestran capacidades diferenciales de las *Pseudomonas* aisladas del lodo residual para adaptarse y utilizar diésel B10 como única fuente de carbono y energía.

4.4.3. ESTUDIOS DE BIODEGRADACIÓN.

Con el fin de demostrar que el incremento en la viabilidad celular y en la actividad enzimática de las distintas *Pseudomonas* aisladas del lodo residual se encuentran relacionadas con la efectiva biodegradación de hidrocarburos presentes en el diésel comercial, se cuantificó la concentración de los componentes mayoritarios del diésel B10 mediante cromatografía gaseosa (CG-FID) frente al contacto con las cepas en estudio. Para ello, se realizaron extracciones con *n*-hexano del contenido total de diferentes sistemas conteniendo medio Bushnell-Haas (pH 7,0), diésel B10 1% (v/v), y 100 µL de una suspensión celular de cada *Pseudomonas*, en forma individual, como inóculo. También se realizaron controles para evidenciar potenciales cambios en la concentración de los hidrocarburos a causa de factores abióticos (es decir, no asociados a la acción bacteriana), mediante la inoculación de diésel B10 1% (v/v) en medio Bushnell-Haas estéril.

La Fig. 9A muestra un cromatograma obtenido de un sistema *control* luego de 21 días de incubación, sin tratamiento biológico. Como era de esperarse, se aprecia un cromatograma típico de una muestra de diésel comercial constituido principalmente por *n*-alcanos de entre 11 a 22 átomos de carbonos (C₁₁-C₂₂).

El diésel comercial es una fracción específica obtenida a partir de la destilación del petróleo crudo, compuesto principalmente por parafinas (iso- y ciclo-parafinas) y, en menor medida, compuestos olefínicos. Además, puede contener hasta un 25% de hidrocarburos aromáticos, incluidos naftalenos y alquilbencenos (Wang & Shao, 2013). En Argentina, desde el 2006, el diésel comercial debe contener un 10% de *biodiésel* (diésel B10) (Resolución N°1283/06 Art. 7°, Secretaría de Energía, Argentina). El *biodiésel* es una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés: *Fatty Acids Methyl Esters*) que se obtienen a partir de la transesterificación de lípidos naturales obtenidos de aceites vegetales o grasas animales. Este biocombustible se aplica en la preparación de sustitutos totales o parciales del *petrodiesel* (*i.e.*, diésel). Como sustituto total se denomina diésel B100, mientras que otras denominaciones como B5, B10 ó B20 hacen referencia a la proporción o porcentaje (%) de *biodiésel* en la mezcla (Thomas y col., 2019). En varios países latinoamericanos (Argentina, Brasil, Chile, Colombia y Perú), como así también en Australia y en los Estados Unidos, los niveles de FAME en el diésel

comercial están regulados por ley, pudiendo variar entre un 5-20% conforme a la legislación de cada país. En la Tabla II, se detalla la identificación de algunos de los componentes mayoritarios del diésel B10 utilizado en el presente estudio, nombrados A-O en la Fig 9A, que fueron asignados mediante el análisis comparativo de los perfiles cromatográficos obtenidos, en iguales condiciones, tanto para el diésel comercial como para soluciones estándares puras de cada compuesto. En particular, se destaca la presencia de cuatro compuestos (nombrados J, L, M y N en la Tabla II y en la Fig 9C) que corresponden a la fracción *biodiésel* del combustible B10. En general, en nuestro país, estos FAME son producidos a partir del aceite de soja (Prince y col., 2008).

Tabla II. Identificación de algunos de los componentes mayoritarios del diésel comercial (diésel B10) utilizado en el presente estudio.

Compuestos petroquímicos (C₁₁-C₂₂)		Fracción <i>biodiésel</i> (FAME)	
A	<i>n</i> -undecano	J	metil-palmitato
B	<i>n</i> -dodecano	L	<i>no identificado</i>
C	<i>n</i> -tridecano	M	metil-oleato
D	<i>n</i> -tetradecano	N	<i>no identificado</i>
E	<i>n</i> -pentadecano		
F	<i>n</i> -hexadecano		
G	<i>n</i> -heptadecano		
H	<i>n</i> -octadecano		
I	<i>n</i> -nonadecano		
K	<i>no identificado</i>		
O	<i>no identificado</i>		

Por otro lado, en la Fig. 9B se muestra -a modo de ejemplo- un cromatograma obtenido para uno de los sistemas inoculados con *P. stutzeri* aislada del lodo residual, e incubado durante 21 días en las mismas condiciones que el grupo *control* (Fig. 9A).

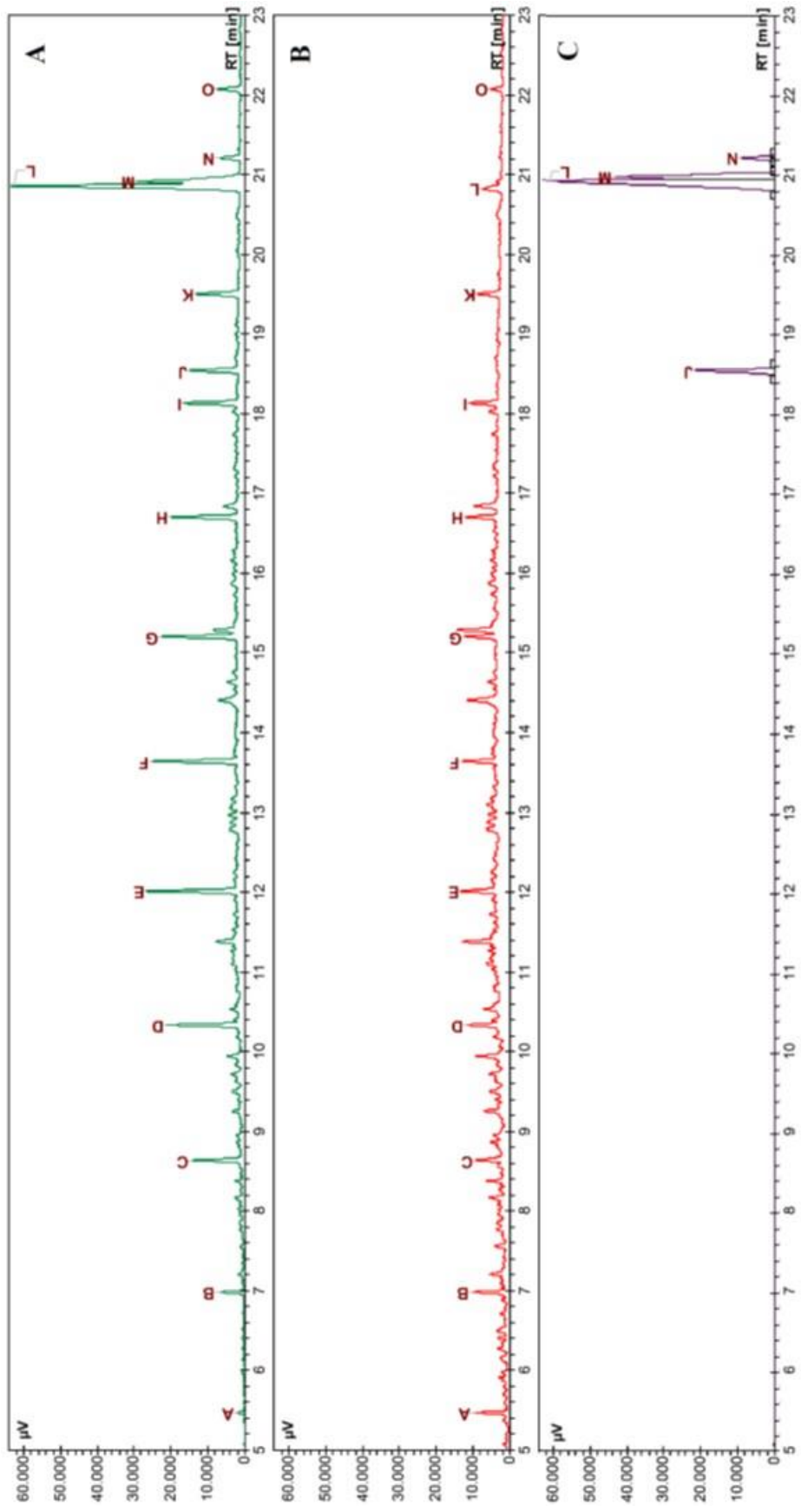


Figura 9. (A) Perfil cromatográfico de una muestra de diésel B10 1% (v/v) extraída en *n*-hexano a partir de medio Bushnell-Haas (pH 7,0), luego de 21 días de incubación (37 °C, 150 r.p.m.) sin tratamiento biológico (control abiótico). Se observan quince componentes principales nombrados A-O en el diésel comercial utilizado en el presente estudio. (B) Perfil cromatográfico de una muestra de diésel B10 1% (v/v) extraído en *n*-hexano a partir de medio Bushnell-Haas (pH 7,0) luego de 21 días de incubación (37 °C, 150 r.p.m.) en presencia de *P. stutzeri*. Se aprecia una disminución significativa en las áreas de la mayoría de los componentes principales del diésel B10. (C) Perfil cromatográfico de una muestra de *bi*diésel puro al 1% (v/v) preparada en *n*-hexano. Se aprecian cuatro analitos (J, L, M y N) que representan el contenido en FAME del diésel comercial.

Como puede observarse, la presencia de esta bacteria causó una disminución significativa en las áreas de la mayoría de los componentes principales del diésel B10, tanto de los hidrocarburos alifáticos (C₁₁-C₂₂) como de la fracción FAME, correspondiente al biodiésel (Fig. 9B).

En la Fig. 10 se muestran las tasas de biodegradación porcentual, calculada en forma independiente para la fracción petroquímica y FAME del diésel comercial, obtenidas para las tres *Pseudomonas* analizadas. Como puede observarse, las dos cepas más eficientes para la remoción de diésel B10 fueron *P. stutzeri* y *P. aeruginosa*, arrojando valores de EB (%) de $53 \pm 2\%$ y $42 \pm 5\%$ para la fracción petroquímica (hidrocarburos C₁₁-C₂₂), y más de un 75% para la fracción FAME, respectivamente.

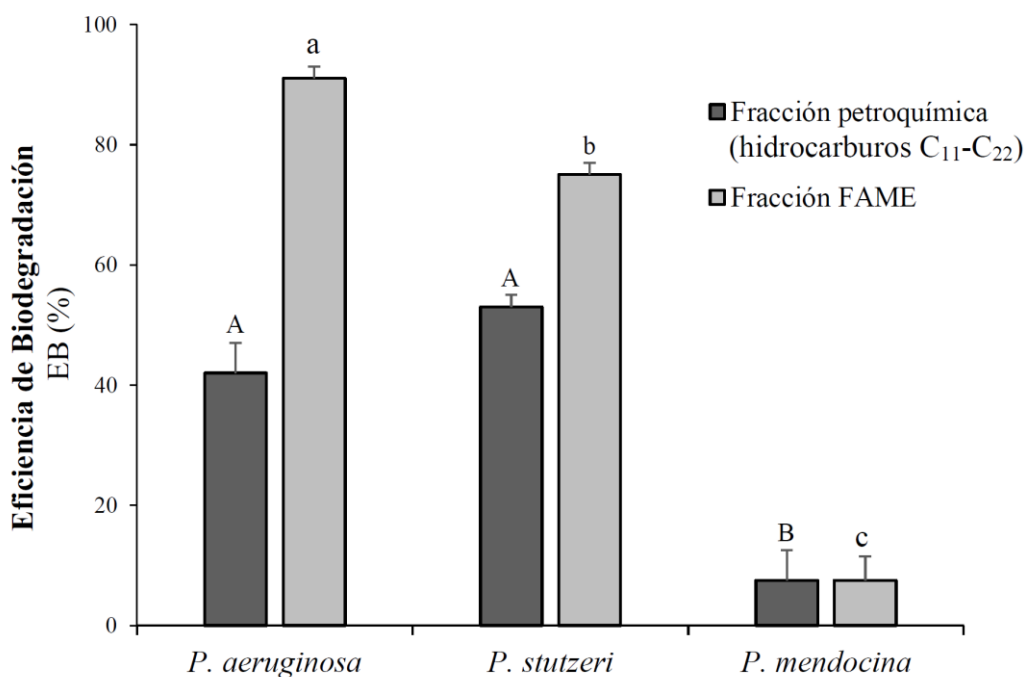


Figure 10. Eficiencia de biodegradación (%) de la fracción petroquímica (hidrocarburos C₁₁-C₂₂) y la fracción FAME del diésel comercial por las diferentes cepas de *Pseudomonas* sp. aisladas del lodo residual, luego de 15 días de incubación en medio mínimo salino (Bushnell-Hass) suplementado con diésel B10 1% (v/v) como única fuente de carbono. Distintas letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los % de degradación de la fracción FAME para cada cepa, mientras que las letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas en los % de degradación para los alcanos de cadena media (hidrocarburos C₁₁-C₂₂).

Por el contrario, *P. mendocina* mostró una eficiencia de biodegradación para ambas fracciones menor al 10% (Fig. 10), sugiriendo que en las condiciones ensayadas, esta bacteria es menos apta que *P. aeruginosa* y *P. stutzeri* para la biodegradación de diésel B10. Estos resultados son consistentes con la baja tasa de crecimiento y actividad deshidrogenasa reportada para *P. mendocina* en el apartado anterior (Fig. 7 y Fig. 8, respectivamente), y podrían estar relacionados con su menor capacidad para producir biosurfactantes (Loureiro y col., 2018a,b), lo cual limitaría la habilidad de *P. mendocina* para asimilar compuestos de carácter hidrofóbico.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los ensayos orientados a la eliminación de ibuprofeno permitieron concluir que, en las muestras de barro analizadas, existen microorganismos capaces de utilizar este contaminante como fuente de energía para sus actividades metabólicas. Adicionalmente, se demostró que parte de la microbiota hallada en las muestras de lodo crudo es coherente con lo reportado en otros estudios sobre comunidades microbianas que poseen un importante rol en la degradación de xenobióticos.

Por su parte, los estudios realizados con bacterias aisladas del lodo residual mostraron diferencias en la tasa de degradación para la fracción petroquímica (hidrocarburos C₁₁-C₂₂) y bio- (compuestos FAME) del diésel comercial, lo cual demuestra la existencia de distintas respuestas metabólicas entre las *Pseudomonas* analizadas. Asociado a esto, se demostró que la eficiencia en la biodegradación del diésel B10 por parte de las tres cepas estudiadas estuvo asociada con la inducción de la actividad de enzimas degradativas (deshidrogenasas bacterianas).

En conclusión, los resultados alcanzados en este trabajo de tesina dejan en claro la importancia de continuar estudiando esta interesante biomasa residual, poco explorada y valorada, para su aplicación en la reducción del daño ecológico causado por la liberación de contaminantes de alto impacto ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

- Aissaoui, S., Ouled-Haddar, H., Sifour, M., Beggah, C., Benhamada, F. (2017). Biological removal of the mixed pharmaceuticals: diclofenac, ibuprofen, and sulfamethoxazole using a bacterial consortium. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5(2): e1530.
- Almeida B, Kjeldal H, Lolas I, Knudsen AD, Carvalho G, Nielsen KL, Barreto-Crespo MT, Stensballe A, Nielsen JL. (2013) Quantitative proteomic analysis of ibuprofen-degrading *Patulibacter* sp. strain I11. *Biodegradation* 24: 615-630.
- Almeida, B., Oehmen, A., Marques, R., Brito, D., Carvalho, G., & Crespo, M. B. (2013). Modelling the biodegradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by activated sludge and a pure culture. *Bioresource technology*, 133, 31-37.
- Azubuiké, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 180.
- Berridge, M.V., Herst, P.M., Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127-152.
- Biswas, K., Paul, D., Sinha, S.N. (2015) Biological Agents of Bioremediation: A Concise Review. *Frontiers in Environmental Microbiology*. Vol. 1, No. 3, 39-43.
- Braz, F. S., Silva, M. R., Silva, F. S., Andrade, S. J., Fonseca, A. L., & Kondo, M. M. (2014). Photocatalytic degradation of ibuprofen using TiO₂ and ecotoxicological assessment of degradation intermediates against *Daphnia similis*. *Journal of Environmental Protection*, 5(7), 620-26.
- Brown, H.L., van Vliet, A.H., Betts, R.P., Reuter, M. (2013). Tetrazolium reduction allows assessment of biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in a food matrix model. *Journal of Applied Microbiology*, 115(5), 1212-1221.

- Brutti, L. N., Beltran, M. J., & García de Salamone, I. (2018). *Biorremediación de los recursos naturales*. Ediciones INTA (1ª edición).
- Chouari, R., Le Paslier, D., Dauga, C., Daegelen, P., Weissenbach, J., Sghir, A. (2005). Novel major bacterial candidate division within a municipal anaerobic sludge digester. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(4), 2145-2153.
- Das, N., Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International*, Article ID 941810.
- De Mesa, J. B. L., Quintero, G., Vizcaíno, A. L. G., Cáceres, D. C. J., Riaño, S. M. G., & García, J. M. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, **4**(5), 82-90.
- Di Paola, M. M., & Vicién, C. (2010). Biorremediación: vinculaciones entre investigación, desarrollo y legislación. Documento de trabajo *CEUR-CONICET. Argentina*.
- Flippin, J. L., Huggett, D., & Foran, C. M. (2007). Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquatic Toxicology*, **81**(1), 73-78.
- Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S., & Fava, F. (2015). Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New biotechnology*, **32**(1), 147-156.
- Ghaly, A.E., Mahmoud, N. (2006). Optimum conditions for measuring dehydrogenase activity of *Aspergillus niger* using TTC. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, **2**(4), 186-194.
- Gieg, L.M., Fowler, S.J., Berdugo-Clavijo, C. (2014). Syntrophic biodegradation of hydrocarbon contaminants. *Current Opinion in Biotechnology*, **27**, 21-29.
- Gil, M. J., Soto, A. M., Usma, J. I., & Gutiérrez, O. D. (2013). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción+limpia*, **7**(2), 52-73.

- Gonzalez-Rey, M., & Bebianno, M. J. (2012). Does non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) ibuprofen induce antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*?. *Environmental toxicology and pharmacology*, 33(2), 361-371.
- González-Rojas, E. H. (2011). Concepto y estrategias de biorremediación. *INGE@UAN-Tendencias en la Ingeniería*, 1(2), 20-29.
- Han, S., Choi, K., Kim, J., Ji, K., Kim, S., Ahn, B., & Giesy, J. P. (2010). Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquatic toxicology*, 98(3), 256-264.
- Huang, H., Liu, G., Lv, W., Yao, K., Kang, Y., Li, F., & Lin, L. (2015). Ozone-oxidation products of ibuprofen and toxicity analysis in simulated drinking water. *J Drug Metab Toxicol*, 6(3).
- Jasmine, J., Mukherji, S. (2014). Evaluation of bioaugmentation and biostimulation effects on the treatment of refinery oily sludge using 2ⁿ full factorial design. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 16(8), 1889-1896.
- Jeffries, K. M., Brander, S. M., Britton, M. T., Fanguie, N. A., & Connon, R. E. (2015). Chronic exposures to low and high concentrations of ibuprofen elicit different gene response patterns in a euryhaline fish. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(22), 17397-17413.
- Kaczyńska, G., Borowik, A., Wyszowska, J. (2015). Soil dehydrogenases as an indicator of contamination of the environment with petroleum products. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(11), 372.
- Kayani MA, Parry JM, Vickery S, Dodds PF. (2009). In vitro genotoxic assessment of xenobiotic diacylglycerols in an in vitro micronucleus assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50: 277-284.

- Kostka, J.E., Prakash, O., Overholt, W.A., Green, S.J., Freyer, G., Canion, A., Delgardio, J., Norton, N., Hazen, T.C., Huettel, M. (2011). Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**(22), 7962-7974.
- Kumari, B., Singh, S.N., Singh, D.P. (2016). Induced degradation of crude oil mediated by microbial augmentation and bulking agents. *International Journal of Environmental Science and Technology*, **13**: 1029-1042.
- Lalaroo, H. E., Devi, S., & Arjuna, A. (2017). Bioremediation. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, **14**(1), 367-372.
- Limam, R.D., Chouari, R., Mazéas, L., Wu, T.-D., Li, T., Grossin-Debattista, J., Guerquin-Kern, J.-L., Saidi, M., Landoulsi, A., Sghir, A., Bouchez, T. (2014). Members of the uncultured bacterial candidate division WWE1 are implicated in anaerobic digestion of cellulose. *MicrobiologyOpen*, **3**(2), 157-167.
- Liu, P.-W.G. (2014). Bioaugmentation efficiency investigation on soil organic matters and microbial community shift of diesel-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **95**, Part A, 276-284.
- Liu, Z., Liu, J.. (2013). Evaluating bacterial community structures in oil collected from the sea surface and sediment in the northern Gulf of Mexico after the Deepwater Horizon oil spill. *MicrobiologyOpen*, **2**(3), 492-504.
- Loureiro, D.B., Olivera, C., Herrero, M.S., Bergara, C.D., Andretich, S.M., Salvatierra, L.M., Pérez, L.M. (2018a). Aislamiento e identificación de bacterias potencialmente degradadoras de hidrocarburos a partir de lodos industriales. *Libro de resúmenes IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental (CAMAyA) y I Jornada de Microbiología General (I MicroGen)*, p.p.: B61.
- Loureiro, D.B., Olivera, C., Salvatierra, L.M., Pérez, L.M. (2018b). Evaluación del potencial de biodegradación de diésel empleando bacterias aisladas de lodos industriales. *Energeia* **15**(15): 84-89.

- Marchlewicz A, Guzik U, Hupert-Kocurek K, Nowak A, Wilczyńska S, Wojcieszńska D (2017a) Toxicity and biodegradation of ibuprofen by *Bacillus thuringiensis* B1(2015b). *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 7572–7584.
- Marchlewicz A, Smulek W, Guzik U, Wojcieszńska D. (2017b). Exploring the degradation of ibuprofen by *Bacillus thuringiensis* B1(2015b): the new pathway and factors affecting degradation. *Molecules*, 22: 1676.
- Michas, A., Vestergaard, G., Trautwein, K., Avramidis, P., Hatzinikolaou, D.G., Vorgias, C.E., Wilkes, H., Rabus, R., Schloter, M., Schöler, A. (2017). More than 2500 years of oil exposure shape sediment microbiomes with the potential for syntrophic degradation of hydrocarbons linked to methanogenesis. *Microbiome*, 5(1), 118.
- Michaud, L., Lo Giudice, A., Saitta, M., De Domenico, M., Bruni, V., (2004). The biodegradation efficiency on diesel oil by two psychrotrophic Antarctic marine bacteria during a two-month-long experiment. *Marine Pollution Bulletin*, 49(5-6), 405-409.
- Mnif, I., Mnif, S., Sahnoun, R., Maktouf, S., Ayedi, Y., Ellouze-Chaabouni, S., Ghribi, D. (2015). Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(19), 14852-14861.
- Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M., Sayadi, S. (2011). Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 111(3), 525-536.
- Murdoch RW, Hay AG. (2013). Genetic and chemical characterization of ibuprofen degradation by *Sphingomonas* Ibu-2. *Microbiology* 159: 621-632. -
- Murdoch RW, Hay AG. (2015). The biotransformation of ibuprofen to trihydroxyibuprofen in activated sludge and by *Variovorax* Ibu-1. *Biodegradation* 26: 105-113.

- Obayori, O.S., Adebuseye, S.A., Adewale, A.O., Oyetibo, G.O., Oluyemi, O.O., Amokun, R.A., Ilori, M.O. (2009). Differential degradation of crude oil (Bonny Light) by four *Pseudomonas* strains. *Journal of Environmental Sciences (China)*, **21**(2), 243-248.
- Parolini M, Binelli A, Provini A. (2011). Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 1586-1594.
- Parthipan, P., Elumalai, P., Sathishkumar, K., Sabarinathan, D., Murugan, K., Benelli, G., Rajasekar, A. (2017). Biosurfactant and enzyme mediated crude oil degradation by *Pseudomonas stutzeri* NA3 and *Acinetobacter baumannii* MN3. *Biotech*, 7(5): 278.
- Petrie, B., Barden, R., & Kasprzyk-Hordern, B. (2015). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water research*, 72, 3-27.
- Piazza, A., Ciancio, L., Pacini, V. A., Sanguinetti, G., Ottado, J., & Gottig, N. (2019). Environmental Bacteria Involved in Manganese (II) Oxidation and Removal from Groundwater. *Frontiers in microbiology*, 10, 119.
- Pinto Mariano, A., Clayton Tomasella, R., Marcondes de Oliveira, L., Contiero, J., de Franceschi de Angelis, D. (2008). Biodegradability of diesel and biodiesel blends. *African Journal of Biotechnology*, 7(9), 1323-1328.
- Praveen-Kumar, Tarafdar, J.C. (2003). 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) as electron acceptor of culturable soil bacteria, fungi and actinomycetes. *Biology and Fertility of Soils*, **38**(3), 186-189.
- Prince, R.C., Haitmanek, C., Lee, C.C. (2008). The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. *Chemosphere*, **71**(8), 1446-1451.
- Quero-Pastor, M. J., Garrido-Perez, M. C., Acevedo, A., & Quiroga, J. M. (2014). Ozonation of ibuprofen: a degradation and toxicity study. *Science of the Total Environment*, 466, 957-964.

- Rabus, R., Boll, M., Heider, J., Meckenstock, R.U., Buckel, W., Einsle, O., Ermler, U., Golding, B.T., Gunsalus, R.P., Kroneck, P.M.H., Krüger, M., Lueders, T., Martins, B.M., Musat, F., Richnow, H.H., Schink, B., Seifert, J., Szaleniec, M., Treude, T., Ullmann, G.M., Vogt, C., von Bergen, M., Wilkes, H. (2016). Anaerobic microbial degradation of hydrocarbons: from enzymatic reactions to the environment. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **26**(1-3), 5-28.
- Ragugnetti, M., Adams, M. L., Guimarães, A. T., Sponchiado, G., de Vasconcelos, E. C., & de Oliveira, C. M. R. (2011). Ibuprofen genotoxicity in aquatic environment: an experimental model using *Oreochromis niloticus*. *Water, Air, & Soil Pollution*, *218*(1-4), 361-364.
- Rzyski, P., Drewek, A., & Klimaszyk, P. (2017). Pharmaceutical pollution of aquatic environment: an emerging and enormous challenge. *Limnological Review*, *17*(2), 97-107.
- Sabullah, M. K., Marbawi, H., Faik, A. A. M., Abdullah, R., Sani, S. A., Japanis, F. G. J., Roland, R. (2018). Bioremediation of hydrocarbon: a mini Review. *Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology*, *6*(2), 1-6.
- Simon, C., Daniel, R. (2011). Metagenomic analyses: past and future trends. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(4): 1153-1161.
- Stuart, M., Lapworth, D., Crane, E., & Hart, A. (2012). Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment*, *416*, 1-21.
- Sun, L., Pope, P.B., Eijsink, V.G., Schnurer, A. (2015). Characterization of microbial community structure during continuous anaerobic digestion of straw and cow manure. *Microbial Biotechnology*, **8**(5), 815-827.
- Thomas, A.O., Leahy, M.C., Smith, J.W.N., Spence, M.J. (2019). Natural attenuation of fatty acid methyl esters (FAME) in soil and groundwater. *Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology*, **50**(3), 301-317.
- Thornley, P., Gilbert, P., 2013. Biofuels: balancing risks and rewards. *Interface Focus*, *3*(1), 20120040.

- Toro, M. A. T., & Quirama, J. F. R. (2015). Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental (RIAA)*, 3(2), 37-48.
- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277-286.
- Wang, W., Shao, Z., 2013. Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation. *Frontiers in Microbiology*, 4, 116.
- Wasi, S., Tabrez, S., Ahmad, M. (2013). Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: a review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(10), 8147-8155.
- Żur, J., Piński, A., Marchlewicz, A., Hupert-Kocurek, K., Wojcieszynska, D., Guzik, U. (2018). Organic micropollutants paracetamol and ibuprofen—toxicity, biodegradation, and genetic background of their utilization by bacteria. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 21498-21524