



Revista CENIC. Ciencias Biológicas
ISSN: 0253-5688
ISSN: 2221-2450
editorial.cenic@cnic.edu.cu
Centro Nacional de Investigaciones Científicas
Cuba

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEL AGUA ACOMPAÑANTE DEL PETRÓLEO PROMISORIAS PARA LA BIODESULFURIZACIÓN

Díaz Rodríguez, Yuletsis; Rubio Ribeaux, Daylin; Hernández Gómez, Thais; Contrera Avilés, Rosa; Acosta Díaz, Silvia

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEL AGUA ACOMPAÑANTE DEL PETRÓLEO PROMISORIAS PARA LA BIODESULFURIZACIÓN

Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 50, núm. 2, 2019

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181263501001>

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEL AGUA ACOMPAÑANTE DEL PETRÓLEO PROMISORIAS PARA LA BIODESULFURIZACIÓN

*ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF
BACTERIA FROM ACCOMPANYING OIL WATER
PROMISING FOR BIODESULPHURIZATION*

Yuletsis Díaz Rodríguez yuletsis@ceinpet.cupet.cu

Centro de Investigaciones del Petróleo, Cuba

Daylin Rubio Ribeaux

Thais Hernández Gómez

Rosa Contrera Avilés

Silvia Acosta Díaz

Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol.
50, núm. 2, 2019

Centro Nacional de Investigaciones
Científicas, Cuba

Recepción: 18 Abril 2019
Aprobación: 22 Noviembre 2019

Redalyc: [https://www.redalyc.org/
articulo.oa?id=181263501001](https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181263501001)

Resumen: La biodesulfuración es el proceso en el cual se emplean microorganismos para oxidar compuestos reducidos de azufre y transformarlos en compuestos de fácil eliminación. Dicho proceso posee un conjunto de ventajas como: bajos costos de inversión y de operación ya que en él se utilizan equipos sencillos y de bajos consumos de reactivos; y bajo consumo de energía al poderse operar a temperatura ambiente. Sin embargo, el procedimiento es lento, lo que requiere nuevos microorganismos que reduzcan los tiempos de residencia y hagan más competitivo el proceso a nivel industrial. En este contexto, el presente trabajo propone aislar e identificar microorganismos de agua acompañante del petróleo, así como determinar la capacidad de degradación de las mismas a partir de compuestos azufrados de la industria petrolera. En el aislamiento se empleó como fuente microbiana el agua acompañante del petróleo proveniente de yacimientos de la Franja Norte Occidental de Cuba y se realizó en medio selectivo con tiosulfato de sodio y sulfuro de dibutilo como única fuente de azufre. Se determinó la densidad óptica de los cultivos en la estimación del crecimiento microbiano y la concentración de sulfato como producto de la degradación del azufre. Se obtuvieron como resultados 3 aislados pertenecientes al género *Pseudomonas* sp. con la propiedad de biodegradar compuestos azufrados. Los aislados se identificaron como *Pseudomona* Ny 3a, *Pseudomona* Ny 3b y *Pseudomona* Ny 2a. Sin embargo, solo los dos últimos crecieron en medio con tiosulfato de sodio y sulfuro de dibutilo como únicas fuentes de azufre, respectivamente.

Palabras clave: degradación, biodesulfurización, microbiota, aislamiento.

Abstract: Biodesulfurization is the process in which microorganisms are used to oxidize reduced sulfur compounds and transform them into easily removable compounds. This process has a set of advantages: low investment costs and operating because it uses simple equipment and low reagent consumption, low power consumption to be able to operate at room temperature. However, the process is slow, requiring new microorganisms that reduce the residence times and make the process more competitive in industry. In this context, the present work proposes to isolate and identify microorganisms of accompanying oil water, as well as to

determine their degradation capacity from sulfur compounds of the oil industry. The accompanying oil water from the oilfields of western North Strip Cuba was used for isolating as a microbial source and performed in selective medium with sodium thiosulfate and dibutyl sulfide as the only sulfur source, the optical density of the cultures was determined to evaluate microbial growth and the concentration of sulfate as degradation product of sulfur. As a result, 3 isolates belonging to the genus *Pseudomonas* sp with the property to biodegrade sulfur compounds were obtained. The isolates were identified as *Pseudomonas* Ny 3a, *Pseudomonas* Ny 3b, *Pseudomonas* Ny 2a; highlights the latter two strain in medium with sodium thiosulfate and dibutyl sulfide as the sole source of sulfur, respectively

Keywords: degradation, biodesulfurization, microbiota, isolation.

INTRODUCCIÓN

En la industria petrolera la presencia de compuestos azufrados ocasiona grandes inconvenientes. El envenenamiento de catalizadores, corrosión de la infraestructura, entre otros, se suman a los problemas medioambientales que se originan y afectan la calidad de los productos derivados del petróleo.

En muchos yacimientos cubanos es típico el crudo altamente sulfuroso por las características de las rocas que los almacenan.¹ Asimismo, la formación de azufre biogénico como producto del metabolismo de microorganismos autóctonos en el yacimiento es otro elemento que afecta la composición del petróleo y sus derivados. Además, el aporte de sales y la microbiota presentes en las aguas incorporadas en los procesos de perforación, extracción y depósito, favorecen la formación y desarrollo de compuestos azufrados indeseables.² La presencia de compuestos orgánicos del azufre en los hidrocarburos se manifiesta en forma de mercaptanos, disulfuros, sulfuros y tiofenos, aunque también como azufre inorgánico en ácido sulfhídrico, piritas y en azufre elemental.

Microorganismos con potencialidades para la remoción de varios de estos compuestos se aíslan a partir de fuentes como aguas de capa o agua acompañante del petróleo. Lo que se atribuye al alto contenido de azufre en las mismas y la adaptación de los microorganismos a tales condiciones. Algunos autores refieren que el aislamiento de microorganismos de matrices contaminadas con hidrocarburos o en contacto con ellos, constituyen un excelente método para la reproducción a gran escala de un concentrado bacteriano con capacidades para la biodegradación de compuestos orgánicos azufrados.³

Vargas y Ramón informan sobre la biodesulfurización del carbón utilizando los microorganismos propios de los carbones.⁴ En tal caso la esterilización del carbón antes de tratarlo con el inóculo bacteriano comparado cuando no se esteriliza, no ofrece un influjo significativo en la eliminación del azufre a causa de que son portadores de bacterias desulfurantes.

El agua de capa se reconoce como el agua salobre presente en los yacimientos petroleros, la que varía con la formación geológica y sale a la superficie asociada al crudo. El contenido de las mismas difiere según el yacimiento, pero es posible que contengan: petróleo (500-500

ppm), sulfatos, bicarbonatos, sulfuro de hidrogeno, cianuro, dióxido de carbono y metales pesados (cadmio, arsénico, cromo, plomo, mercurio, vanadio, zinc).⁵ En Cuba la presencia de compuestos azufrados en tal ambiente, y la variabilidad de sus concentraciones se atribuye a la naturaleza pesada del petróleo cubano.⁶ Los representantes bacterianos de esta fuente presentan adaptaciones en su metabolismo que les permite reaccionar favorablemente ante diversos compuestos azufrados. Dado lo antes expuesto, los objetivos de la investigación fueron: Aislar e identificar representantes bacterianos del agua acompañante del petróleo; así como determinar la capacidad de degradación de los mismos en función de la biodesulfurización de compuestos azufrados del petróleo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento microbiológico de bacterias.

A partir de una muestra de agua de capa proveniente de yacimientos petrolíferos de la Franja Norte Occidental de Cuba se realizó el aislamiento en medio para ensayos de biodesulfurización (BDS) (composición para 1 L de agua destilada: K_2HPO_4 4,0 g; Na_2HPO_4 4,0 g; NH_4Cl 2,0 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,2 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,001 g; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,001 g; $BaCl$ 10,0 g; glucosa 5,0 g; pH=7),⁷ agarizado y modificado con: glicerol (5 g.L-1) en lugar de glucosa, y tiosulfato de sodio (2,75 g.L-1) en vez de dibenzotiofeno como única fuente de azufre. Se realizaron diluciones seriadas del agua de capa, hasta 105, y se sembraron por el método de esparcimiento en placas conteniendo el medio referido. Las placas inoculadas se incubaron a 370C durante 24 h.

Se seleccionaron las colonias más representativas atendiendo a la frecuencia de aparición. En el aislamiento se utilizó el método de siembra por agotamiento en placas y los cultivos se incubaron en el mismo medio a 370C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se chequeó la pureza de los aislados mediante la tinción de Gram, según Harrigan y Mc Cance.⁸

Las características macroscópicas se determinaron en medio agar nutriente a las 24 horas de cultivo según Holt y colaboradores.⁹ Las cepas aisladas se conservaron a 40C por 30 días, en tubos de cultivos que contenían medio para BDS.

Caracterización fisiológica de los aislados.

La caracterización fisiológica de los aislados, se realizó según las pruebas bioquímicas recomendadas y descritas por el Manual de Identificación de Bacterias:⁹ determinación de las enzimas catalasa y oxidasa, fermentación de glucosa y lactosa, producción de ácido sulfhídrico (H_2S) y gas en medio de cultivo Kligler, así como la utilización de manitol como única fuente de carbono.

Cinética de crecimiento en medio BDS modificado con diferentes fuentes de azufre

La cinética de crecimiento de los aislados se realizó en el medio de BDS modificado según se describió anteriormente. Para ello se prepararon los precultivos a partir de cada aislado en frascos con 100 mL de medio con dos fuentes de azufre diferentes: tiosulfato de sodio y sulfuro de dibutilo 0,5% en parafina líquida; y se incubaron en agitación de 150 r.min⁻¹ en zaranda reciprocante modelo GFL 3033 a 30°C durante 48 h.

Se inocularon posteriormente 50 mL del precultivo de acuerdo con su respectivo medio y se ajustó entre 0,4-0,7 la absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro GENESYS 10UV, de cada aislado en frascos de cristal que contenían 100 mL del mismo medio; y se incubaron en régimen agitado a 150 r.min⁻¹ a 37°C durante 64 h en medio suplementado con tiosulfato de sodio y 96 h en medio con sulfuro de dibutilo. En cada caso se prepararon 3 réplicas para un total de 32 experimentos, dos controles abióticos y se incubaron en iguales condiciones.

Para el monitoreo del crecimiento de las cepas durante el período de ensayo se tomaron muestras de los frascos inoculados y controles, y se midió la densidad óptica a 600 nm cada 4 h para el medio suplementado con tiosulfato de sodio y cada 24 h al medio con sulfuro de dibutilo. Las muestras se centrifugaron a 5000 r.min⁻¹ en una centrífuga modelo soviético ОПН-8-042 durante 15 min y al sobrenadante libre de células se le determinó la concentración de SO₄²⁻ según la Norma APHA 4500-E,¹⁰ como indicativo de la degradación del compuesto azufrado.¹¹

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento microbiológico de bacterias.

Las aguas de los pozos de petróleo constituyen a menudo ambientes extremos, cuyas condiciones resultan *a priori* poco favorables para el desarrollo de la vida. Sin embargo, dichos ambientes resguardan una comunidad rica y variada de bacterias entre ellas, las bacterias que oxidan los sulfuros presentes en las aguas.³ En este estudio, se obtuvieron tres aislados bacterianos del agua de capa, los cuales se codificaron como: Ny 2a, Ny 3a y Ny 3b (Fig. 1).

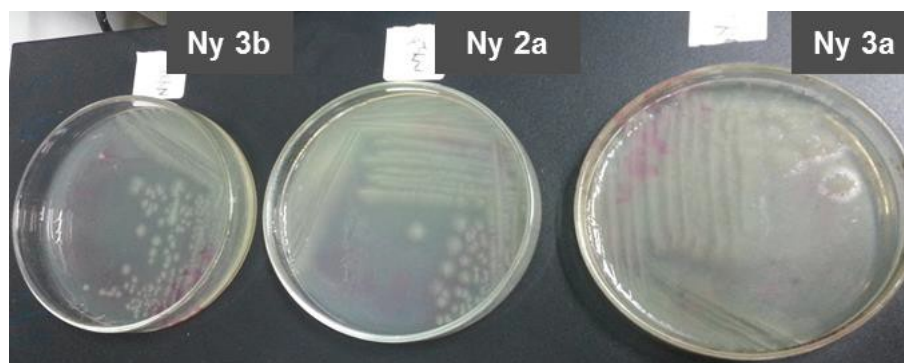


Figura. 1
Crecimiento en medio BDS de los aislados bacterianos Ny 2a, Ny 3a y Ny 3b.

De manera general, se observó el predominio de la morfología bacilar. Los aislados respondieron de forma negativa a la tinción de Gram, pues un aspecto rosado fue detectado en la observación al microscopio óptico, como consecuencia de la decoloración de la capa fina de peptidoglucano que rodea la célula.¹² La gran mayoría las bacterias presentes en sistemas contaminados con hidrocarburos se encuentran en el grupo de las bacterias gram negativas.¹³ Este hecho se debe posiblemente a que los lipopolisacáridos presentes en sus membranas ayudan en la formación y estabilización de emulsiones de hidrocarburos en sistemas acuosos. Esto posibilita el aumento de la superficie de contacto con esos compuestos de baja solubilidad para facilitar para favorecer su biodegradación y posterior asimilación.

A su vez los resultados de las pruebas bioquímicas tributaron al agrupamiento de los aislados como bacilos no fermentadores y productores de citocromo c oxidasa (poseen enzima oxidasa), y además utilizaron el manitol como fuente de carbono. A lo anterior se suma la producción de pigmento verde fluorescente en los tres casos, de modo que tales características sugieren que los aislados pertenezcan a *Pseudomonas sp.*⁹ En la literatura se informa que el citado género es el que se aísla con mayor frecuencia de ambientes contaminados con hidrocarburos.¹³ Además existen numerosos estudios de desulfurización de compuestos orgánicos azufrados como el dibenzotiofeno, que utilizan diferentes especies de dicho género.^{14,15}

La selección del sulfuro de dibutilo como compuesto orgánico azufrado para el experimento se basa en su frecuente utilización como patrón para ensayos de determinación de azufre en hidrocarburos. En condiciones de laboratorio se demostró que algunos microorganismos, bajo condiciones óptimas remueven compuestos azufrados de algunas fracciones de petróleo como n alcanos.⁵ En este sentido, la habilidad de la cepa *Pseudomona fluorescens* 76, para utilizar dimetil disulfuro (DMDS) fue estudiada a pesar de la presencia de otras fuentes de azufre y carbono, como sulfato de sodio (Na_2SO_4) y glucosa, respectivamente. Además, se observó una alta resistencia de la bacteria al DMDS hasta concentraciones por encima de 9,04 mM.¹⁷ De igual forma, el microorganismo se utilizó

en la remoción de compuestos inorgánicos azufrados, tal es el caso de H_2S y NH_3 en biofiltros empacados con carbón activado.¹⁸

No obstante, para llegar a una identificación certera de la especie se requiere de la realización de otros ensayos bioquímicos y fisiológicos en combinación con métodos moleculares que complementen la metodología convencional desarrollada.

En el seguimiento de la dinámica del crecimiento en el medio BDS con los diferentes aislados se detectó un cambio en la apariencia de los cultivos a las 48 h (Fig. 2) mostrando marcada diferencia en cuanto a la turbidez en los frascos inoculados respecto al frasco control, lo que manifiesta desarrollo microbiano.



Figura. 2

Cultivos microbianos con los aislados a las 48 horas de crecimiento en medio BDS suplementado con sulfuro de dibutilo. De izquierda a derecha: control, Ny 2a, Ny 3a y Ny 3b.

La Figura 3a muestra el perfil crecimiento las cepas en medio líquido suplementado con tiosulfato de sodio. Los datos obtenidos mostraron que la fase de adaptación para *Pseudomonassp.* Ny 3b se entendió hasta las 16 h e a partir de ese tiempo comenzó a crecer aceleradamente. En los tres casos las cepas exhibieron un comportamiento diáuxico relacionado a la presencia de dos sustratos diferentes que pueden ser utilizados como fuente de carbono, en este caso la parafina y el glicerol. De esa forma, los microorganismos metabolizan primero la fuente de carbono que permite un crecimiento más rápido, y una vez agotado comienzan a metabolizar el otro. En el caso de *Pseudomonas sp.* Ny 3a y *Pseudomonassp.* Ny 3b el crecimiento se mantuvo exponencial hasta el final del experimento lo que sugiere un estudio con un tiempo más prolongado. Sin embargo, para *Pseudomonassp.* Ny 2a, la fase de muerte comenzó a partir de las 44 h. Un comportamiento similar fue observado en los estudios de Ito y colaboradores,¹⁷ pero utilizando glucosa como fuente de carbono.

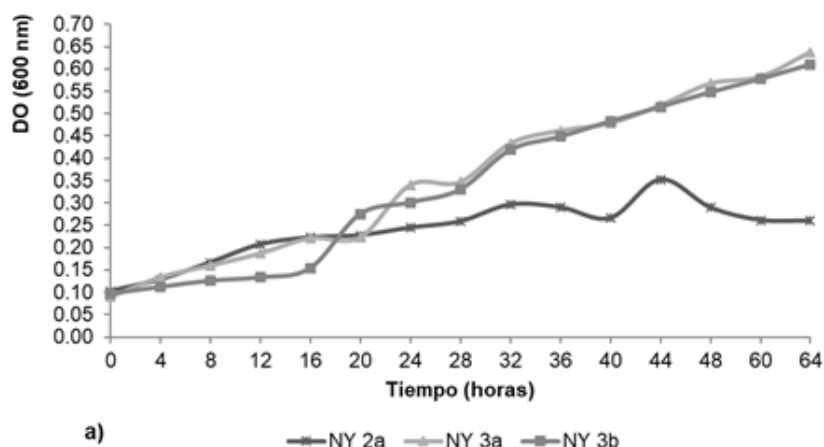


Figura. 3

Dinámica de crecimiento de los aislados del agua de capa durante el cultivo en medio BDS suplementado con: a) tiosulfato de sodio. b) sulfuro de dibutilo 0.5%.

En el caso de la figura 3b el comportamiento fue similar para las tres cepas pues se observó una tendencia de crecimiento diáuxico. Sin embargo, un período superior a las 120 h sería necesario para definir mejor las fases de este tipo de crecimiento. En este ensayo, la fase de adaptación para *Pseudomonas* sp. Ny 2a. alcanzó las 24 horas, y para *Pseudomonas* sp. Ny 3a y *Pseudomonas* sp. Ny 3b 48 h. Esto sugiere que estos microorganismos demoran más en metabolizar compuestos orgánicos azufrados en relación a los inorgánicos. En los estudios con la *Pseudomona fluorescens* 76 también se detectó que el crecimiento con la fuente de azufre del compuesto inorgánico Na_2SO_4 fue mejor que con la del compuesto orgánico DMDS, aunque se mostró alta resistencia y degradabilidad del mismo.¹⁷

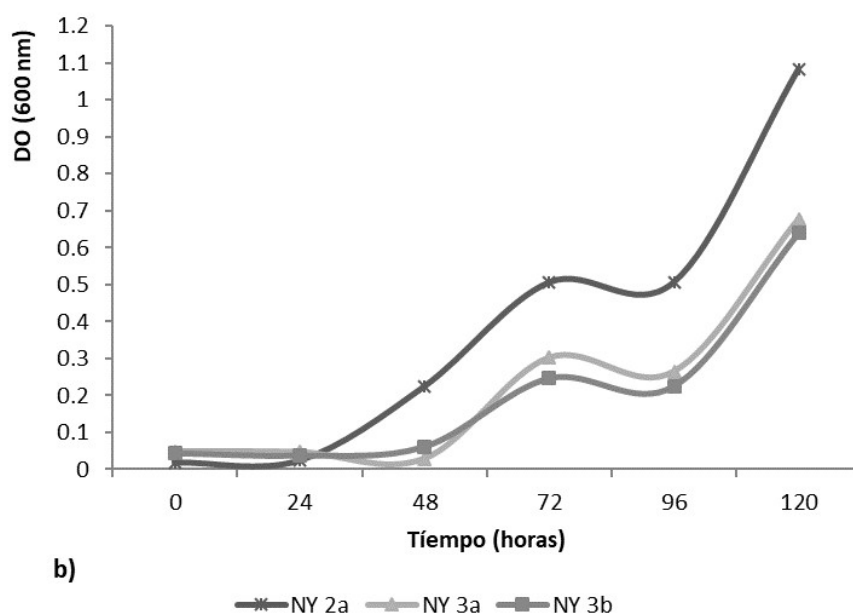


Figura. 3
Dinámica de crecimiento de los aislados del agua de capa durante el cultivo en medio BDS suplementado con: a) tiosulfato de sodio. b) sulfuro de dibutilo 0.5%.

Determinación del contenido de sulfato (SO_4^{2-})

Simultáneamente se realizó la determinación del contenido de sulfato (SO_4^{2-}), como forma indirecta de determinar la biodegradación de los compuestos azufrados. En este sentido se destacó como mayor degradador en medio BDS con tiosulfato a la cepa Ny 3b, con una formación de $1528,8 \pm 110 \text{ mg.L}^{-1}$ de sulfato como producto de la degradación (Fig. 4a). Por otro lado en el medio modificado con sulfuro de dibutilo se observó que la mayor concentración de sulfato producto de la oxidación corresponde al aislado NY 2a con $94,88 \pm 7 \text{ mg.L}^{-1}$ (Fig. 4b).

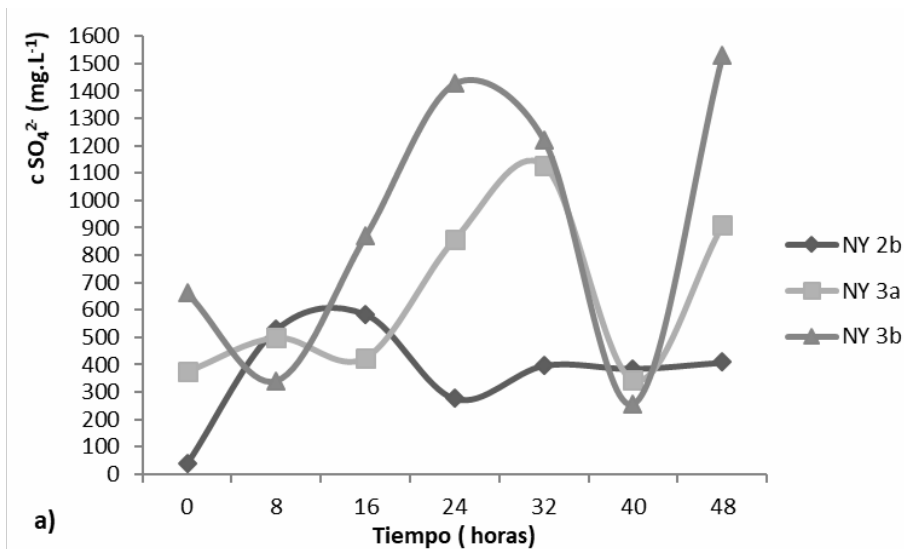


Figura. 4

Seguimiento de la concentración de sulfato producto de la degradación de compuestos azufrados a) tiosulfato de sodio. b) sulfuro de dibutilo.

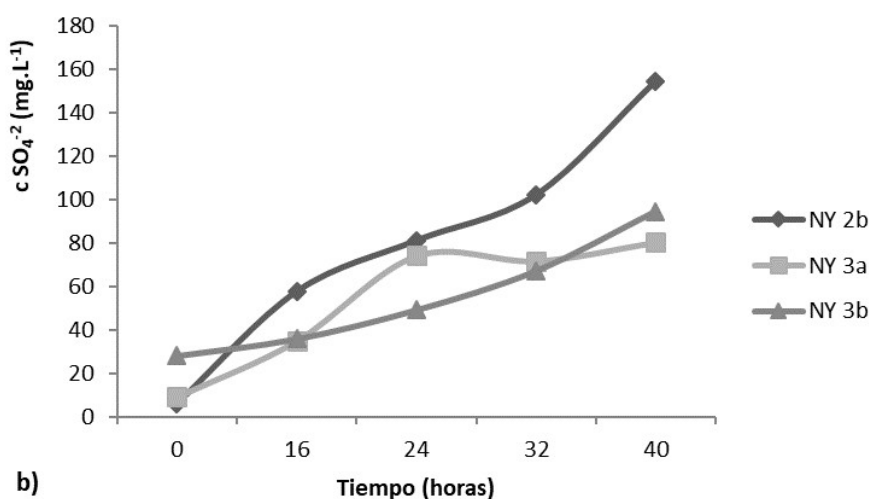


Figura. 4

Seguimiento de la concentración de sulfato producto de la degradación de compuestos azufrados a) tiosulfato de sodio. b) sulfuro de dibutilo.

Las evidencias experimentales sugirieron que los microorganismos aislados de agua de capa poseen las enzimas necesarias para metabolizar compuestos azufrados y por tanto podrían catalizar la remoción selectiva del azufre presente en derivados del petróleo.^{3,19} Así mismo, estudios posteriores serán necesarios para confirmar género y especie de las cepas, así como la potencialidad para biodesulfurizar diferentes fracciones del petróleo.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron tres aislados Ny 2a, Ny 3a y Ny 3b de agua de capa pertenecientes probablemente al género *Pseudomonas* promisorios para la biodesulfurización. Los aislados se adaptaron rápidamente y crecieron en el medio BDS modificado con tiosulfato de sodio como única fuente de azufre destacándose la cepa Ny 3b entre las cepas de mayor crecimiento y consecuentemente como mayor productor de sulfato producto de la degradación. El aislado Ny 2a alcanzó buen crecimiento en medio BDS modificado con sulfuro de dibutilo 0.5% como única fuente de azufre, aun cuando el período de adaptación fue de 24 h, superior al observado en medio con tiosulfato de sodio. Todos los aislados mostraron ser degradadores potenciales de compuestos azufrados a partir de la consecuente formación de sulfato como producto de la degradación; aunque se destacaron Ny 3b en medio modificado con tiosulfato y Ny 2a en medio con sulfuro de dibutilo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Linares E., García DE, Delgado O, López JG, Strazhevich V. Yacimientos y manifestaciones de hidrocarburos de la República de Cuba. Fermín Romero Alfau. Ceinpet. 2011: p. 29-32. ISBN 978-959-7117-33-9.
- Duque Z. A review of corrosion by biogenic sulphide in the oil industry. Revista Técnica de Ingeniería. Universidad de Zulia. 2007; Vol. 30, (Ed. Especial): 146–156.
- Valbuena O., Pereira, J. C., Daza R., González F., Hernández A., Morales G., Medina L. Actividades sulforeductora y desulfurizadora por bacterias termófilas aisladas de lodos hidrotermales de las trincheras, Venezuela. Rev. Interciencia. 2010; 35(6): 414-419.
- Vargas MJ y Ramón AJ. Biodesulfuración de carbón: una alternativa ambientalmente viable en la reducción de azufre del carbón. Revista Ambiental: Agua, Aire y Suelo. Universidad de Pamplona. 2007; 2(2): 31-37.
- Bravo E. Los impactos de la explotación petrolera en ecosistemas tropicales y la biodiversidad. Acción Ecológica 2007 (consultado: 14 de enero de 2014). Available: http://www.inredh.org/archivos/documentos_ambiental/impactos_explotacion_petrolera_esp.pdf
- Cueli A, Adames Y, Rivera Y, Davis J. Efecto corrosivo del agua acompañante del petróleo, contaminada con H₂S, sobre el acero (API 5L X₅₂). *Revista Cubana de Química*. 2013; 25(2): 154-156.
- Kilbane JJ. Mutant microorganisms useful for cleavage of Organic C – S Bonds. *United States Patent*. Patent Number: 5. 1992; 104, 801.
- Harrigan W, McCance M. Métodos de laboratorio de Microbiología. Editorial Academia. 1ra ed. Madrid, España. 1968.
- Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J, Williams S. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins: Ninth Edition. Baltimore, USA. 1994: p.787.

- APHA 4500-SO₄-E: 2005: A.P.H. ASSOCIATION. Standard Methods for the examination of water and wastewater. APHA-AWWA-WEF.
- Rincón Á, Baquero J E, Flórez H. Manejo de la nutrición mineral en sistemas ganaderos de los Llanos Orientales de Colombia. Villavicencio (Meta), Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). 2012; p. 25-56. ISBN 978- 958-740-115-8.
- Sanchez J. Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas. Seminarios de Biología Celular y Molecular. Universidad de San Martín de Porres, Chiclayo, Perú. 2010 (consultado: 25 de septiembre de 2015). Available: <http://biologia.medica.blogspot.com/2010/09/bacterias-gram-positivas-y-gram.html>
- Narváez S, Gómez ML, Martínez MM. Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del Caribe colombiano. *Boletín del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras, INVEMAR*. 2008; 37(1): 61-75.
- Soleimani M, Bassi A, Margaritis A. Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels. *Biotechnology Advances*. 2007; 25: 570-596.
- Raheb J, Hajipour MJ, Mojtaba S, Behnam R, Memari B. The Enhancement of Biodesulfurization Activity in a Novel Indigenous Engineered *Pseudomonas putida*. *Iranian Biomedical Journal*. 2009; 13(4): 207-213.
- Berreta A, Marbec E R. Análisis cuantitativo por fluorescencia de Rayos X. Jornadas de Desarrollo e Innovación. Centro de Investigación y Desarrollo en Química y Petroquímica. Buenos Aires. Argentina. 2010.
- Ito T, Miyaji T, Nakagawa T, Tomizuka N. Degradation of Dimethyl Disulfide by *Pseudomonas fluorescens* Strain 76. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2007;71 (2):366-370.
- Chung YC, Lin YY, Tseng CP. Operational characteristics of effective removal of H₂S and NH₃ waste gases by activated carbon biofilter. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 2004; 54(9):450-8.
- Calzada J. Desulfuración de dibenzotiofeno con "*Pseudomonas putida*" CECT5279: formas de operación [Tesis en opción del título de Ingeniero Químico]. Madrid, España, Universidad Complutense de Madrid Facultad de Ciencias Químicas; diciembre; 2010.